

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 990 992**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/81** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2018** **PCT/GB2018/051855**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2019** **WO19008335**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2018** **E 18740273 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024** **EP 3649151**

54 Título: **Proteínas de andamiaje**

30 Prioridad:

**07.07.2017 GB 201710973**

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

**02.12.2024**

73 Titular/es:

**AVACTA LIFE SCIENCES LIMITED (100.0%)**  
**Unit 20, Ash Way, Thorp Arch Estate**  
**Wetherby, Yorkshire LS23 7FA, GB**

72 Inventor/es:

**PLATT, GEOFF WILLIAM y**  
**SPENCE, GRAHAM ROBERT PYE-SMITH**

74 Agente/Representante:

**BERTRÁN VALLS, Silvia**

ES 2 990 992 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Proteínas de andamiaje

5 **Antecedentes de la invención**

El documento WO 2009/136182 divulga la mutación de STM de andamiaje de la técnica anterior usando D48L y G50S, que se divulga que conduce a una expresión aumentada en el sistema bacteriano (página 22, líneas 12 a 13).

10 El documento WO 2009/136182 así como el documento WO 2006/131749 han divulgado anteriormente, cada uno, la mutación del sitio V48 de estefina A de tipo natural, en particular para dar V48D que es útil para la eliminación de la dimerización por intercambio de dominio (documento WO 2006/131749, página 35, línea 25).

15 Se ha divulgado la mutación simultánea de E78A y L80R para SQT de andamiaje en el documento WO 2009/136182, así como se divulga la mutación simultánea de L82R y T83S en el andamiaje de SQM (párrafo que conecta las páginas 22 a 23 del documento WO 2009/136182). Se ha divulgado que estos pares de mutaciones simultáneas muestran una alta expresión en *E. coli*.

20 El documento WO 2009/136182 divulga proteínas de andamiaje de estefina A modificadas. En particular, las divulgaciones en este documento se centran en la "mutación en la posición 4", que corresponde al sitio G4 de la estefina A o al sitio W4 de STM. En particular, este documento enseña las ventajas especiales de un mutante de G4R. Este documento no enseña nada en absoluto referente a la alteración de la estabilidad térmica de la proteína de andamiaje. La estabilidad térmica sólo se menciona en un párrafo en este documento, simplemente como una de varias propiedades que pueden medirse con el fin de evaluar la resistencia de una proteína de andamiaje a deformarse por un péptido diana (documento WO 2009/136182, página 13, primer párrafo).

25 El documento WO 2006/131749 divulga el uso de estefina A como proteína de andamiaje, y divulga varias mutaciones útiles para garantizar la neutralidad biológica del andamiaje. Este documento divulga un ensayo de termoestabilidad (página 32, primer párrafo) y muestra datos sobre la estabilidad térmica de STM (página 35, líneas 9 a 12). La termoestabilidad en este documento se divulga únicamente como propiedad que puede medirse con el fin de evaluar la resistencia de la proteína de andamiaje a deformarse por el péptido diana (véase el párrafo que conecta las páginas 6 a 7 del documento WO 2006/131749). No hay ninguna enseñanza en absoluto referente a la variación o modulación de la estabilidad térmica en este documento.

30 El documento WO 2014/125290 divulga proteínas de andamiaje derivadas de cistatinas vegetales. En particular, este documento divulga tres proteínas sintéticas preferidas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 del documento WO 2014/125290. Este documento divulga la medición de la estabilidad térmica de su andamiaje preferido mediante calorimetría diferencial de barrido (página 48, líneas 31 a 32 y figura 7a). No hay ninguna divulgación en ninguna parte de este documento sobre mutaciones que puedan realizarse para afectar a la estabilidad térmica. De hecho, los inventores no comentan sobre ninguna manera de afectar a la estabilidad térmica de sus proteínas de andamiaje. Afirman que la estabilidad térmica de su andamiaje preferido es "alta", pero atribuyen esto a la naturaleza compacta de su andamiaje:

35 *"Parece probable que la naturaleza compacta del andamiaje, que es más pronunciada de lo que se observa en otras estructuras de estefinas o cistatinas, contribuya a su alta estabilidad térmica"* (documento WO 2014/125290, página 53, líneas 17 a 19).

40 No hay ninguna enseñanza en este documento sobre cómo puede modularse o alterarse la estabilidad térmica. Además, la única discusión sobre mutaciones en este documento es en relación con mutaciones de la técnica anterior, o con la necesidad de usar inserciones o deleciones de trímeros para no producir mutaciones por desplazamiento de marco. El enfoque científico de este documento se centra en diseñar una secuencia consenso derivada de proteínas de cistatina vegetales, no hay ninguna divulgación sobre la manipulación de una secuencia para influir en la estabilidad térmica.

55 **Sumario de la invención**

Los inventores estudiaron la proteína de andamiaje estefina A con el objetivo de mejorar sus propiedades tales como su estabilidad térmica. Basándose en su conocimiento sobre la estructura y función de proteína, diseñaron una gama de cambios y sustituciones para mejorar esas propiedades. Esto condujo a diversos resultados sorprendentes incluyendo anomalías imprevistas en las que, por ejemplo, puede haberse esperado que la proteína se comporte de una determinada manera, pero para las que los hallazgos objetivos no concordaban con las predicciones (por ejemplo, la anomalía Q42D/E comentada en detalle a continuación). El resultado de esta investigación sustancial y el esfuerzo intelectual son unas enseñanzas exhaustivas sobre cómo alterar la estabilidad térmica de la proteína de estefina A y cómo esos cambios en la estabilidad térmica proporcionan beneficios para su uso como proteína de andamiaje.

Por tanto, la invención se refiere a un polipéptido, tal como un polipéptido de tipo Affimer, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 % de identidad con respecto a los residuos de aminoácido 1 a 11, 13 a 15, 17 a 19, 21 a 25, 27 a 28, 35 a 37, 39, 41, 43 a 44, 46 a 47, 49 a 50, 52 a 53, 55 a 58, 63 a 64, 66, 68 a 82, 84 a 85, y 87 a 98 de SEQ ID NO: 1;

caracterizado porque dicho polipéptido comprende una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionadas del grupo que consiste en:

T51L, T51V, M65V, N32G, A59I, L38A, V20I, A40I, L38V, A12I, A12V, I16L, V20L, Q26E, E29M, T31K, N32D, N32H, T34V, T34R, T34D, T34P, A40V, Q42D, T45I, T45V, V48E, V48G, V48A, T51F, T51A, A59L, L67I, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (E29K, K30E, E33K), (Y54D, T83D, Q86E), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, ΔD61), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y (T83D, Q86E).

La invención se refiere a un polipéptido, tal como un polipéptido de tipo Affimer, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 % de identidad con respecto a SEQ ID NO: 1;

*"Parece probable que la naturaleza compacta del andamiaje, que es más pronunciada de lo que se observa en otras estructuras de estefinas o cistatinas, contribuya a su alta estabilidad térmica"* (documento WO 2014/125290, página 53, líneas 17 a 19).

No hay ninguna enseñanza en este documento sobre cómo puede modularse o alterarse la estabilidad térmica. Además, la única discusión sobre mutaciones en este documento es en relación con mutaciones de la técnica anterior, o con la necesidad de usar inserciones o deleciones de trímeros para no producir mutaciones por desplazamiento de marco. El enfoque científico de este documento se centra en diseñar una secuencia consenso derivada de proteínas de cistatina vegetales, no hay ninguna divulgación sobre la manipulación de una secuencia para influir en la estabilidad térmica.

Stadler LK, *et al.* (Protein Eng Des Sel., septiembre de 2011, 24(9): 751-63) se refiere a estudios de estructura-función de una proteína de andamiaje diseñada por ingeniería derivada de estefina A. II: desarrollo y aplicaciones de la variante de SQT.

Cualquier referencia a métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia debe interpretarse como referencia a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en esos métodos.

## Sumario de la invención

Los inventores estudiaron la proteína de andamiaje estefina A con el objetivo de mejorar sus propiedades tales como su estabilidad térmica. Basándose en su conocimiento sobre la estructura y función de proteína, diseñaron una gama de cambios y sustituciones para mejorar esas propiedades. Esto condujo a diversos resultados sorprendentes incluyendo anomalías imprevistas en las que, por ejemplo, puede haberse esperado que la proteína se comporte de una determinada manera, pero para las que los hallazgos objetivos no concordaban con las predicciones (por ejemplo, la anomalía Q42D/E comentada en detalle a continuación). El resultado de esta investigación sustancial y el esfuerzo intelectual son unas enseñanzas exhaustivas sobre cómo alterar la estabilidad térmica de la proteína de estefina A y cómo esos cambios en la estabilidad térmica proporcionan beneficios para su uso como proteína de andamiaje.

La invención se define en las reivindicaciones.

Las referencias en el presente documento a métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos para su uso en esos métodos.

En particular, la invención se refiere a:

Un polipéptido que es adecuado para su uso como proteína de andamiaje y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 % de identidad con respecto a los residuos de aminoácido 1 a 98 de SEQ ID NO: 1;

caracterizado porque dicho polipéptido comprende una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionadas del grupo que consiste en:

N32G, T51L, T51V, M65V, A59I, E29M, T34V, T34R, T45I, T45V, T51F, A59L, L67I, (E29K, K30E, E33K), (A59L,

G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, ΔD61), L38A, V20I, A40I, L38V, A12I, A12V, I16L, V20L, Q26E, T31K, N32D, N32H, T34D, T34P, A40V, Q42D, V48E, V48G, V48A, T51A, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (Y54D, T83D, Q86E), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y (T83D, Q86E);

en el que dicho polipéptido tiene una Tf superior a la Tf del polipéptido con la secuencia MIPRGLSEAK PATPEIQEIV DKVKPQLEEK TNETYGKLEA VQYKTQVLAS TNYIKVRAG DNKYMHLKVF NGPPGQNADR VLTGYQVQDN KDELDTGF.

La invención se refiere a un polipéptido tal como se define en las reivindicaciones, tal como un polipéptido de tipo Affimer, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 % de identidad con respecto a SEQ ID NO: 1;

caracterizado porque dicho polipéptido comprende una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionadas del grupo que consiste en:

T51L, T51V, M65V, N32G, A59I, L38A, V20I, A40I, L38V, A12I, A12V, I16L, V20L, Q26E, E29M, T31K, N32D, N32H, T34V, T34R, T34D, T34P, A40V, Q42D, T45I, T45V, V48E, V48G, V48A, T51F, T51A, A59L, L67I, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (E29K, K30E, E33K), (Y54D, T83D, Q86E), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, ΔD61), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y (T83D, Q86E).

La invención se refiere a un polipéptido tal como se define en las reivindicaciones, tal como un polipéptido de tipo Affimer, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 % de identidad con respecto a los residuos de aminoácido 1 a 98 de SEQ ID NO: 1;

caracterizado porque dicho polipéptido comprende una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionadas del grupo que consiste en:

T51L, T51V, M65V, N32G, A59I, L38A, V20I, A40I, L38V, A12I, A12V, I16L, V20L, Q26E, E29M, T31K, N32D, N32H, T34V, T34R, T34D, T34P, A40V, Q42D, T45I, T45V, V48E, V48G, V48A, T51F, T51A, A59L, L67I, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (E29K, K30E, E33K), (Y54D, T83D, Q86E), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, ΔD61), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y (T83D, Q86E).

De manera adecuada, dichas una o más mutaciones según la invención tal como se definen en las reivindicaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 se selecciona o se seleccionan del grupo que consiste en:

T51L, T51V, M65V, N32G, A59I, E29M, T34V, T34R, T45I, T45V, T51F, A59L, L67I, (E29K, K30E, E33K), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), y (A59V, ΔD61);

preferiblemente en las que dicho polipéptido tiene una Tf superior a la Tf de SEQ ID NO: 1.

De manera adecuada, dichas una o más mutaciones según la invención tal como se definen en las reivindicaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 se selecciona o se seleccionan del grupo que consiste en:

L38A, V20I, A40I, L38V, A12I, A12V, I16L, V20L, Q26E, T31K, N32D, N32H, T34D, T34P, A40V, Q42D, V48E, V48G, V48A, T51A, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (Y54D, T83D, Q86E), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y (T83D, Q86E);

preferiblemente en las que dicho polipéptido tiene una Tf inferior a la Tf de SEQ ID NO: 1.

Otro aspecto de la invención tal como se define en las reivindicaciones proporciona un polipéptido, tal como un polipéptido de tipo Affimer, que comprende una secuencia de aminoácidos representada en la fórmula general:



MIP-Xaa1-GLSEAKPA<sup>12</sup>TPEI<sup>16</sup>QEIV<sup>20</sup>DKVKPQ<sup>26</sup>LEE<sup>29</sup>K<sup>30</sup>T<sup>31</sup>N<sup>32</sup>E<sup>33</sup>T<sup>34</sup>YGKL<sup>38</sup>EA<sup>40</sup>VQ<sup>42</sup>  
YKT<sup>45</sup>QVV<sup>48</sup>A-(Xaa)n-Xaa2-T<sup>51</sup>NY<sup>54</sup>IKVRA<sup>59</sup>G<sup>60</sup>D<sup>61</sup>N<sup>62</sup>KYM<sup>65</sup>HL<sup>67</sup>KVF-Xaa3-Xaa4-  
Xaa5-(Xaa)m-Xaa6-D-Xaa7-VLT<sup>83</sup>GYQ<sup>86</sup>VDKNKDDELTGF

en el que

- 5 Xaa, de manera individual para cada caso, es un residuo de aminoácido;  
n y m son cada uno, independientemente, un número entero de desde 3 hasta 20;
- 10 Xaa1 es Gly, Ala, Val, Arg, Lys, Asp, o Glu;  
Xaa2 es Gly, Ala, Val, Ser o Thr;  
Xaa3 es Arg, Lys, Asn, Gln, Ser, Thr;
- 15 Xaa4 es Gly, Ala, Val, Ser o Thr;  
Xaa5 es Ala, Val, Ile, Leu, Gly o Pro;  
Xaa6 es Gly, Ala, Val, Asp o Glu; y
- 20 Xaa7 es Ala, Val, Ile, Leu, Arg o Lys;
- y en el que al menos una de las siguientes posiciones de aminoácido se selecciona de un residuo de amino  
alternativo mencionado
- 25 A<sup>12</sup> es Ala, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Val, Ile o Leu, y preferiblemente de Ile o Val;  
I<sup>16</sup> es Ile o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Val o Leu, preferiblemente Leu;
- 30 V<sup>20</sup> es Val o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Ala, Ile o Leu, preferiblemente Ile o Leu;  
Q<sup>26</sup> es Gln o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Asp o Glu, preferiblemente Glu;
- 35 E<sup>29</sup> es Glu, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Asp o Met, preferiblemente Met;  
K<sup>30</sup> es Lys, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Arg, His, Glu o Asp, preferiblemente Glu;  
T<sup>31</sup> es Thr, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Ser, Arg o Lys, preferiblemente Lys;
- 40 N<sup>32</sup> es Asn, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Gly, Asp, Glu o His, preferiblemente Gly, Asp o His;  
E<sup>33</sup> es Glu, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Arg, His, Lys o Asp, preferiblemente Lys;
- 45 T<sup>34</sup> es Thr, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Ser, Ala, Val, Ile, Leu, Arg, Lys, Asp, Glu o Pro, preferiblemente Val, Arg, Asp o Pro;  
L<sup>38</sup> es Leu, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Gly, Ala o Val, preferiblemente Ala o Val;
- 50 A<sup>40</sup> es Ala, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Gly, Val, Leu o Ile, preferiblemente Ile o Val;  
Q<sup>42</sup> es Gln, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Asp, Glu, o Asn, preferiblemente Asp;
- 55 T<sup>45</sup> es Thr, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Ser, Ala, Val, Ile o Leu, preferiblemente Ile o Val;  
V<sup>48</sup> es Val, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Gly, Ala, Ile, Leu, Glu o Asp, preferiblemente Gly, Ala o Glu;
- 60 T<sup>51</sup> es Thr, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Ser o Phe, preferiblemente Phe, Ala, Val o Leu;  
Y<sup>54</sup> es Tyr, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Asp o Glu, preferiblemente Asp;

- A<sup>59</sup> es Ala, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Gly, Val, Ile o Leu, preferiblemente Ile, Leu o Val;
- 5 G<sup>60</sup> es Gly, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Asn, Gln, Gly o Pro, preferiblemente Asn o Pro;
- D<sup>61</sup> es Asp, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de ΔD61 (ausente), Gly, Pro, Glu, Asn o Gln, preferiblemente ΔD61 (ausente), Gly, Pro o Asn;
- 10 N<sup>62</sup> es Asn, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Gln, Lys, Arg, His, Gly o Pro, preferiblemente Lys, Pro o Gly;
- M<sup>65</sup> es Met, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Ala, Val, Ile, Leu, preferiblemente Val;
- 15 L<sup>67</sup> es Leu, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Ala, Val o Ile, preferiblemente Ile;
- T<sup>83</sup> es Thr, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Ser, Asp o Glu, preferiblemente Asp; y
- Q<sup>86</sup> es Gln, o un residuo de aminoácido alternativo seleccionado de Asn, Glu o Asp, preferiblemente Glu.
- 20 En un aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido tal como se describió anteriormente,
- en el que dicho polipéptido comprende además al menos una inserción de péptido heterólogo,
- 25 en el que dicha inserción de péptido heterólogo comprende un péptido heterólogo insertado en una de las siguientes posiciones con respecto a SEQ ID NO: 1:
- a) 47-<péptido heterólogo>-55
- 30 b) 46-<péptido heterólogo>-54
- c) 46-<péptido heterólogo>-50
- d) 48-<péptido heterólogo>-50
- 35 e) 49-<péptido heterólogo>-51
- f) 50-<péptido heterólogo>-52
- 40 g) 66-<péptido heterólogo>-85
- h) 67-<péptido heterólogo>-84
- i) 70-<péptido heterólogo>-74
- 45 j) 72-<péptido heterólogo>-74
- k) 71-<péptido heterólogo>-73
- 50 l) 72-<péptido heterólogo>-81
- m) 73-<péptido heterólogo>-80
- n) 79-<péptido heterólogo>-81
- 55 o) 80-<péptido heterólogo>-81
- p) 82-<péptido heterólogo>-83
- 60 q) 72-<péptido heterólogo>-77
- r) 73-<péptido heterólogo>-78
- s) 74-<péptido heterólogo>-79
- 65 t) 4-<péptido heterólogo>-5.

De manera adecuada, dicho polipéptido comprende dos inserciones de péptido heterólogo, una primera inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (a) a (f), y una segunda inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (g) a (s).

5 De manera adecuada, dicho polipéptido comprende dos inserciones de péptido heterólogo, una primera inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (a) a (f), y una segunda inserción de péptido heterólogo en la posición (t).

10 De manera adecuada, dicho polipéptido comprende dos inserciones de péptido heterólogo, una primera inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (g) a (s), y una segunda inserción de péptido heterólogo en la posición (t).

15 De manera adecuada, dicho polipéptido comprende tres inserciones de péptido heterólogo, una primera inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (a) a (f), y una segunda inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (g) a (s), y una tercera inserción de péptido heterólogo en la posición (t).

20 En un aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido, tal como un polipéptido de tipo Affimer, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 % de identidad con respecto a los residuos de aminoácido 1 a 98 de SEQ ID NO: 1;

en el que dicho polipéptido comprende al menos una inserción de péptido heterólogo;

25 caracterizado porque dicho polipéptido comprende una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionadas del grupo que consiste en:

30 M65I, T51I, T51L, T51V, M65V, A59V, N32G, A59I, L38A, V20A, V20I, A40I, L38V, G50S, L38F, A12I, A12V, I16L, V20L, Q26E, E29M, T31K, N32D, N32H, T34V, T34R, T34K, T34D, T34P, A40V, Q42E, Q42D, T45I, T45V, V48E, V48D, V48G, V48A, V48L, T51F, T51A, A59L, K63R, L67I, N90T, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (E29K, K30E, E33K), (Y54D, T83D, Q86E), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, ΔD61), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K), y (T83D, Q86E);

35 en el que dicha inserción de péptido heterólogo comprende un péptido heterólogo insertado en una de las siguientes posiciones con respecto a SEQ ID NO: 1:

d) 48-<péptido heterólogo>-50,

40 e) 49-<péptido heterólogo>-51,

f) 50-<péptido heterólogo>-52,

45 g) 72-<péptido heterólogo>-77,

r) 73-<péptido heterólogo>-78; o

s) 74-<péptido heterólogo>-79.

50 En un aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido, tal como un polipéptido de tipo Affimer, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 % de identidad con respecto a SEQ ID NO: 1;

en el que dicho polipéptido comprende al menos una inserción de péptido heterólogo;

55 caracterizado porque dicho polipéptido comprende una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionadas del grupo que consiste en:

60 M65I, T51I, T51L, T51V, M65V, A59V, N32G, A59I, L38A, V20A, V20I, A40I, L38V, G50S, L38F, A12I, A12V, I16L, V20L, Q26E, E29M, T31K, N32D, N32H, T34V, T34R, T34K, T34D, T34P, A40V, Q42E, Q42D, T45I, T45V, V48E, V48D, V48G, V48A, V48L, T51F, T51A, A59L, K63R, L67I, N90T, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (E29K, K30E, E33K), (Y54D, T83D, Q86E), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, ΔD61), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K), y (T83D, Q86E);

en el que dicha inserción de péptido heterólogo comprende un péptido heterólogo insertado en una de las siguientes posiciones con respecto a SEQ ID NO: 1:

d) 48-<péptido heterólogo>-50,

e) 49-<péptido heterólogo>-51,

f) 50-<péptido heterólogo>-52,

q) 72-<péptido heterólogo>-77,

r) 73-<péptido heterólogo>-78; o

s) 74-<péptido heterólogo>-79.

En un aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido, tal como un polipéptido de tipo Affimer, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 % de identidad con respecto a los residuos de aminoácido 1 a 98 de SEQ ID NO: 1;

en el que dicho polipéptido comprende al menos una inserción de péptido heterólogo;

caracterizado porque dicho polipéptido comprende una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionadas del grupo que consiste en:

M65I, T51I, T51L, T51V, M65V, A59V, N32G, A59I, L38A, V20A, V20I, A40I, L38V, G50S, L38F, A12I, A12V, I16L, V20L, Q26E, E29M, T31K, N32D, N32H, T34V, T34R, T34K, T34D, T34P, A40V, Q42E, Q42D, T45I, T45V, V48E, V48D, V48G, V48A, V48L, T51F, T51A, A59L, K63R, L67I, N90T, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (E29K, K30E, E33K), (Y54D, T83D, Q86E), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, ΔD61), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K), y (T83D, Q86E);

en el que dicha inserción de péptido heterólogo comprende un péptido heterólogo insertado en una de las siguientes posiciones con respecto a SEQ ID NO: 1:

d) 48-<péptido heterólogo>-50,

e) 49-<péptido heterólogo>-51,

f) 50-<péptido heterólogo>-52,

q) 72-<péptido heterólogo>-77,

r) 73-<péptido heterólogo>-78; o

s) 74-<péptido heterólogo>-79.

De manera adecuada, dicho polipéptido comprende dos inserciones de péptido heterólogo, una primera inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (d) a (f), y una segunda inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (q) a (s).

De manera adecuada, dichas una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 se selecciona o se seleccionan del grupo que consiste en:

M65I, T51I, T51L, T51V, M65V, A59V, N32G, A59I, E29M, T34V, T34R, T34K, Q42E, T45I, T45V, T51F, A59L, K63R, L67I, N90T, (E29K, K30E, E33K), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), y (A59V, ΔD61);

preferiblemente en las que dicho polipéptido tiene una Tf superior a la Tf de SEQ ID NO: 1.

De manera adecuada, dichas una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 se selecciona o se seleccionan del grupo que consiste en:

L38A, V20A, V20I, A40I, L38V, G50S, L38F, A12I, A12V, I16L, V20L, Q26E, T31K, N32D, N32H, T34D, T34P, A40V, Q42D, V48E, V48D, V48G, V48A, V48L, T51A, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (Y54D,

T83D, Q86E), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y (T83D, Q86E);

preferiblemente en las que dicho polipéptido tiene una Tf inferior a la Tf de SEQ ID NO: 1.

De manera adecuada, dichas una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 se selecciona o se seleccionan del grupo que consiste en:

T51L, T51V, M65V, N32G, A59I, L38A, V20I, A40I, L38V, A12I, A12V, I16L, V20L, Q26E, E29M, T31K, N32D, N32H, T34V, T34R, T34D, T34P, A40V, Q42D, T45I, T45V, V48E, V48G, V48A, T51F, T51A, A59L, L67I, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (E29K, K30E, E33K), (Y54D, T83D, Q86E), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, ΔD61), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y (T83D, Q86E).

De manera adecuada, dichas una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 se selecciona o se seleccionan del grupo que consiste en:

T51L, T51V, M65V, N32G, A59I, E29M, T34V, T34R, T45I, T45V, T51F, A59L, L67I, (E29K, K30E, E33K), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), y (A59V, ΔD61);

preferiblemente en las que dicho polipéptido tiene una Tf superior a la Tf de SEQ ID NO: 1.

De manera adecuada, dichas una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 se selecciona o se seleccionan del grupo que consiste en:

L38A, V20I, A40I, L38V, A12I, A12V, I16L, V20L, Q26E, T31K, N32D, N32H, T34D, T34P, A40V, Q42D, V48E, V48G, V48A, T51A, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (Y54D, T83D, Q86E), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y (T83D, Q86E);

preferiblemente en las que dicho polipéptido tiene una Tf inferior a la Tf de SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido tal como se describió anteriormente en el que dicho polipéptido tiene una Tf superior a la Tf de SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido tal como se describió anteriormente en el que dicho polipéptido tiene una Tf inferior a la Tf de SEQ ID NO: 1.

De manera adecuada, dicho polipéptido comprende además una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionadas del grupo que consiste en: G4R, G4W, V48D, V48E, G50S, Y35W, Y43W, Y53W, Y54W, Y64W, F70W, Y85W, F98W, (K71N S72G L73P), o (E78A L80R).

De manera adecuada, el polipéptido tal como se describió anteriormente comprende cinco o menos mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1.

De manera adecuada, dichas cinco o menos mutaciones se seleccionan del grupo que consiste en Y35W, N32G, V48D, M65I, Q42E y T51L.

En un aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido tal como se describió anteriormente en el que dichas cinco o menos mutaciones se seleccionan del grupo que consiste en N32G, V48D, M65I, Q42E y T51L.

En una realización, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido tal como se describió anteriormente que tiene cada una de las mutaciones en uno de los siguientes grupos:

i) N32G V48D

ii) N32G V48D M65I

iii) N32G V48D M65I T51L

iv) N32G V48D M65I Q42E

v) N32G V48D M65I Q42E T51L.

En una realización, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido tal como se describió anteriormente que tiene cada una de las mutaciones en uno de los siguientes grupos:

i) N32G V48D

ii) N32G V48D M65I

iii) N32G V48D M65I T51L

iv) N32G V48D M65I Q42E

v) N32G V48D M65I Q42E T51L, y que no tiene ninguna mutación adicional con respecto a SEQ ID NO: 1.

En una realización, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido tal como se describió anteriormente que tiene cada una de las mutaciones iv) N32G, V48D, M65I y Q42E.

En una realización, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido tal como se describió anteriormente que tiene cada una de las mutaciones iv) N32G, V48D, M65I y Q42E, y que no tiene ninguna mutación adicional con respecto a SEQ ID NO: 1.

En una realización, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido tal como se describió anteriormente que tiene cada una de las mutaciones en uno de los siguientes grupos:

a) Y35W N32G V48D M65I Q42E T51L (A59V ΔD61) (E29K K30E E33K)

b) Y35W N32G V48D M65I Q42E T51L (A59V G60N ΔD61 N62G) (E29K K30E E33K).

En una realización, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido tal como se describió anteriormente que tiene cada una de las mutaciones en uno de los siguientes grupos:

a) Y35W N32G V48D M65I Q42E T51L (A59V ΔD61) (E29K K30E E33K)

b) Y35W N32G V48D M65I Q42E T51L (A59V G60N ΔD61 N62G) (E29K K30E E33K), y que no tiene ninguna mutación adicional con respecto a SEQ ID NO: 1.

En una realización, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido tal como se describió anteriormente que tiene cada una de las mutaciones b) Y35W N32G V48D M65I Q42E T51L (A59V G60N ΔD61 N62G) (E29K K30E E33K).

En una realización, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido tal como se describió anteriormente que tiene cada una de las mutaciones b) Y35W N32G V48D M65I Q42E T51L (A59V G60N ΔD61 N62G) (E29K K30E E33K), y que no tiene ninguna mutación adicional con respecto a SEQ ID NO: 1.

De manera adecuada, dicho péptido heterólogo tiene de 6 a 36 aminoácidos de longitud.

En un aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a una proteína de fusión que comprende:

- un polipéptido tal como se describió anteriormente; y

- una o más secuencias de aminoácidos adicionales seleccionadas del grupo que consiste en: secuencias de señal de secreción, secuencias de ligador peptídico, etiquetas de afinidad, dominios transmembrana, secuencia de retención en superficie celular, secuencias de reconocimiento de sustrato para modificaciones postraduccionales, dominios de multimerización para crear estructuras multiméricas de la proteína agregando mediante interacciones proteína-proteína, restos de polipéptido de prolongación de la semivida, secuencias de polipéptido para alterar la localización tisular y el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, uno o más polipéptidos adicionales tal como se describieron anteriormente que se unen a la misma diana o a dianas diferentes, y una o más secuencias de polipéptido de tipo Affimer adicionales que se unen a la misma diana o a dianas diferentes.

De manera adecuada, dicha proteína de fusión comprende uno o más restos de polipéptido de prolongación de la semivida seleccionados del grupo que consiste en un dominio Fc o porción del mismo, una proteína de albúmina o porción de la misma, un resto de polipéptido de unión a albúmina, transferrina o porción de la misma, un resto de polipéptido de unión a transferrina, fibronectina o porción de la misma, o un resto de polipéptido de unión a fibronectina.

De manera adecuada, el dominio Fc o una porción del mismo conserva unión a FcN.

De manera adecuada, el dominio Fc o una porción del mismo es de IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM o una subclase (isotipo) de las mismas tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 o IgA2.

De manera adecuada, el dominio Fc o una porción del mismo conserva función efectora seleccionada de unión a C1q, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptor de células B, o una combinación de las mismas.

De manera adecuada, el resto de polipéptido de prolongación de la semivida aumenta la semivida en suero de la proteína en al menos 5 veces con respecto a su ausencia de la proteína.

De manera adecuada, el polipéptido es un afímero o un polipéptido de afímero. Los afímeros / polipéptidos de afímero se describen en más detalle a continuación.

En un aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido tal como se describió anteriormente.

En un aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico tal como se describió anteriormente.

En un aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a una biblioteca que comprende una población de polipéptidos tal como se describió anteriormente, en la que al menos dos polipéptidos individuales dentro de dicha población comprenden inserciones de péptido heterólogo diferentes.

En un aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a una biblioteca que comprende una población de ácidos nucleicos, comprendiendo dichos ácidos nucleicos secuencias de nucleótidos que codifican para una población de polipéptidos tal como se describió anteriormente. De manera adecuada, cada ácido nucleico codifica para un único polipéptido tal como se describió anteriormente.

En un aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a una célula huésped que comprende un polipéptido tal como se describió anteriormente, un ácido nucleico tal como se describió anteriormente, o una biblioteca tal como se describió anteriormente.

En un aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido tal como se describió anteriormente para su uso en medicina.

En un aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un método para identificar un péptido capaz de unirse a una estructura de interés, comprendiendo dicho método:

(i) proporcionar un polipéptido tal como se describió anteriormente que comprende una inserción de péptido heterólogo;

(ii) poner en contacto dicho polipéptido con dicha estructura de interés; y

(iii) monitorizar la asociación entre el polipéptido y la estructura de interés;

en el que la asociación del polipéptido con la estructura de interés identifica el péptido como péptido candidato capaz de unirse a dicha estructura.

En un aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere al uso de un polipéptido tal como se describió anteriormente como proteína de andamiaje.

De manera más adecuada, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido tal como se describió anteriormente en el que dicha inserción de péptido heterólogo comprende un péptido heterólogo insertado en una de las siguientes posiciones con respecto a SEQ ID NO: 1:

d) 48-<péptido heterólogo>-50

e) 49-<péptido heterólogo>-51

f) 50-<péptido heterólogo>-52

g) 72-<péptido heterólogo>-77

r) 73-<péptido heterólogo>-78

s) 74-<péptido heterólogo>-79

t) 4-<péptido heterólogo>-5.

De manera más adecuada, dicho polipéptido comprende dos inserciones de péptido heterólogo, una primera inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (d) a (f), y una segunda inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (q) a (s).

De manera más adecuada, dicho polipéptido comprende dos inserciones de péptido heterólogo, una primera inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (d) a (f), y una segunda inserción de péptido heterólogo en la posición (t).

De manera más adecuada, dicho polipéptido comprende dos inserciones de péptido heterólogo, una primera inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (q) a (s), y una segunda inserción de péptido heterólogo en la posición (t).

De manera más adecuada, dicho polipéptido comprende tres inserciones de péptido heterólogo, una primera inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (d) a (f), y una segunda inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (q) a (s), y una tercera inserción de péptido heterólogo en la posición (t).

De manera adecuada, el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 1 a 98 de SEQ ID NO: 1, que comprende mutación/mutaciones tal como se describe. Un pequeño número de mutaciones descritas son delecciones, por ejemplo el aminoácido correspondiente al aminoácido 61 de SEQ ID NO: 1 puede mutarse mediante sustitución o mediante delección. Si se muta mediante delección, el polipéptido resultante final puede comprender únicamente 97 aminoácidos correspondientes a SEQ ID NO: 1, dicho de otro modo, cuando se deleciona D61 entonces  $\Delta$ D61 corresponde a D61 de SEQ ID NO: 1, el experto interpretará tal característica en consecuencia. De la manera más adecuada, las mutaciones son sustituciones.

En un aspecto amplio, también se divulga un polipéptido, tal como un polipéptido de tipo Affimer, que comprende una secuencia de aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 1 a 98 de SEQ ID NO: 1, comprendiendo dicho polipéptido una mutación con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionada del grupo que consiste en

M65I, T51I, T51L, T51V, M65V, A59V, N32G, A59I, L38A, V20A, V20I, A40I, L38V, G50S, L38F, A12I, A12V, I16L, V20L, Q26E, E29M, T31K, N32D, N32H, T34V, T34R, T34K, T34D, T34P, A40V, Q42E, Q42D, T45I, T45V, V48E, V48D, V48G, V48A, V48L, T51F, T51A, A59L, K63R, L67I, N90T, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (E29K, K30E, E33K), (Y54D, T83D, Q86E), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N,  $\Delta$ D61, N62G),  $\Delta$ D61, (A59L, G60N,  $\Delta$ D61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N,  $\Delta$ D61, N62G), (A59V, G60N,  $\Delta$ D61, N62G), (A59V,  $\Delta$ D61), (G60P,  $\Delta$ D61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P,  $\Delta$ D61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K), y (T83D, Q86E);

y que comprende además una inserción de péptido heterólogo. De manera adecuada, dicha inserción de péptido heterólogo comprende un péptido heterólogo insertado en una de las siguientes posiciones con respecto a SEQ ID NO: 1:

d) 48-<péptido heterólogo>-50,

e) 49-<péptido heterólogo>-51,

f) 50-<péptido heterólogo>-52,

q) 72-<péptido heterólogo>-77,

r) 73-<péptido heterólogo>-78, o

s) 74-<péptido heterólogo>-79.

Un compuesto de tipo Affimer® es una proteína de unión distinta de anticuerpo diseñada por ingeniería (es decir, un reactivo de afinidad de polipéptido). Affimer (AFFIMER) es una marca registrada.

Tal como se conoce en la técnica, los aptámeros y reactivos de tipo Affimer® no son lo mismo. La tecnología Affimer se ha diseñado por ingeniería para superar muchos de los problemas asociados con aptámeros o con anticuerpos y presenta varios beneficios. Por ejemplo, se ha mejorado la sensibilidad al entorno de ensayo porque los andamiajes



de Affimer® son resistentes a un amplio intervalo de pH, haciendo que sean adecuados para un amplio intervalo de condiciones de ensayo. Además, las moléculas de tipo Affimer® no son sensibles a EDTA (un problema para los aptámeros que requieren Mg++ para plegarse y funcionar). Un aptámero no está restringido, mientras que una proteína de tipo Affimer® restringe el péptido heterólogo presentado.

De manera adecuada, los reactivos de tipo Affimer® tales como andamiajes/polipéptidos de tipo Affimer® descritos en el presente documento se basan en, o se derivan de, la proteína de estefina A humana. Esto se describe en más detalle a continuación.

De manera adecuada, el polipéptido es un polipéptido de estefina A.

En un aspecto la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido de estefina A que tiene una combinación de una o más mutaciones de un conjunto de mutaciones definidas, todas las cuales comparten la característica técnica común de que se demuestra que cada una afecta a la estabilidad tal como la estabilidad térmica (Tf) del polipéptido y una inserción de péptido heterólogo. Según el conocimiento y la creencia de los inventores en la fecha de presentación, estas combinaciones son novedosas.

Un pequeño número de los aminoácidos en posiciones particulares enseñadas por los inventores pueden haberse producido anteriormente en la técnica (por ejemplo, como residuo que se produce de manera natural en un homólogo de estefina A con relación lejana, es decir sin una inserción de péptido heterólogo y, por tanto, que no se produce en la combinación novedosa anteriormente descrita); o en combinación con una inserción de péptido heterólogo, por ejemplo en STM de andamiaje de la técnica anterior. Los ejemplos de tales mutaciones (sustituciones) que pueden haberse producido anteriormente en la técnica incluyen:

V20A, T34K, L38F, Q42E, V48D, G50S, T51I, A59V, K63R, M65I, y N90T. En una realización, de manera adecuada el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones no comprende una mutación seleccionada de este grupo. De manera adecuada, cuando el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones tiene una mutación seleccionada de este grupo, también tiene al menos una inserción de péptido heterólogo, de la manera más adecuada en una o más de las siguientes posiciones con respecto a SEQ ID NO: 1:

d) 48-<péptido heterólogo>-50,

e) 49-<péptido heterólogo>-51,

f) 50-<péptido heterólogo>-52,

g) 72-<péptido heterólogo>-77,

r) 73-<péptido heterólogo>-78, o

s) 74-<péptido heterólogo>-79.

De manera adecuada, cuando el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones tiene una mutación seleccionada de este grupo, también tiene al menos una mutación adicional seleccionada de la tabla A.

Tabla A - mutaciones novedosas para modular la estabilidad térmica de polipéptidos de estefina A

A12I, A12V, I16L, V20I, V20L, Q26E, E29M, T31K  
 N32G, N32D, N32H, T34V, T34R, T34D, T34P, L38A  
 L38V, A40I, A40V, Q42O, T45I, T45V, V48E, V48G  
 V48A, T51F, T51V, T51L, T51A, A59L, A59I, M65V  
 L67I  
 (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V)  
 (E29K, K30E, E33K), (Y54D, T83D, Q86E)  
 (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K)  
 (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G)  
 ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G)  
 (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K)  
 (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G)  
 (A59V, ΔD61), (G60P, ΔD61, N62P)  
 (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G)  
 (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y  
 (T83D, Q86E)

Con referencia a aumentar la Tf del polipéptido de estefina A, los ejemplos de tales mutaciones (sustituciones) que pueden haberse producido anteriormente en la técnica incluyen:

T34K, Q42E, G50S, T51I, A59V, K63R, M65I, y N90T. En una realización, de manera adecuada el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones no comprende una mutación seleccionada de este grupo. De manera adecuada, cuando el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones tiene una mutación seleccionada de este grupo, también tiene al menos una inserción de péptido heterólogo, de la manera más adecuada en una o más de las siguientes posiciones con respecto a SEQ ID NO: 1:

d) 48-<péptido heterólogo>-50,

e) 49-<péptido heterólogo>-51,

f) 50-<péptido heterólogo>-52,

q) 72-<péptido heterólogo>-77,

r) 73-<péptido heterólogo>-78, o

s) 74-<péptido heterólogo>-79.

De manera adecuada, cuando el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones tiene una mutación seleccionada de este grupo, también tiene al menos una mutación adicional seleccionada de la tabla B.

Tabla B - mutaciones novedosas para aumentar la estabilidad térmica de polipéptidos de estefina A

E29M, N32G, T34V, T34R, T45I, T45V, T51F, T51V  
T51L, A59L, A59I, M65V, L67I  
(E29K, K30E, E33K), (A59L, G60N, D61G, N62K)  
(A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K)  
(G60N, ΔD61, N62G), ΔD61  
(A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K)  
(A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G)  
(A59V, G60N, ΔD61, N62G), y (A59V, ΔD61)

Con referencia a reducir la Tf del polipéptido de estefina A, ejemplos de tales mutaciones (sustituciones) que pueden haberse producido anteriormente en la técnica incluyen: V20A, L38F, y V48D. En una realización, de manera adecuada el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones no comprende una mutación seleccionada de este grupo. De manera adecuada, cuando el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones tiene una mutación seleccionada de este grupo, también tiene al menos una inserción de péptido heterólogo, de la manera más adecuada en una o más de las siguientes posiciones con respecto a SEQ ID NO: 1:

d) 48-<péptido heterólogo>-50,

e) 49-<péptido heterólogo>-51,

f) 50-<péptido heterólogo>-52,

q) 72-<péptido heterólogo>-77,

r) 73-<péptido heterólogo>-78, o

s) 74-<péptido heterólogo>-79.

De manera adecuada, cuando el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones tiene una mutación seleccionada de este grupo, también tiene al menos una mutación adicional seleccionada de la tabla C.

Tabla C - mutaciones novedosas para reducir la estabilidad térmica de polipéptidos de estefina A

A12I, A12V, I16L, V20I, V20L, Q26E, T31K, N32D  
N32H, T34D, T34P, L38A, L38V, A40I, A40V, Q42D  
V48E, V48G, V48A, T51A  
(V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V)  
(Y54D, T83D, Q86E), (G60P, ΔD61, N62P)  
(G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G)  
(G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y  
(T83D, Q86E)

De manera adecuada, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 1 a 98 de SEQ ID NO: 1, que comprende mutación/mutaciones tal como se describió anteriormente.

Por tanto, en un aspecto la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido, tal como un polipéptido de tipo Affimer, que comprende una secuencia de aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 1 a 98 de SEQ ID NO: 1,

en el que dicha secuencia de aminoácidos tiene al menos el 80 % de identidad con respecto a los residuos de aminoácido 1 a 98 de SEQ ID NO: 1;

caracterizado porque dicho polipéptido comprende una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionadas de un grupo divulgado anteriormente.

De manera adecuada, el polipéptido comprende al menos 80 aminoácidos; de manera adecuada al menos 81 aminoácidos, de manera adecuada al menos 82 aminoácidos, de manera adecuada al menos 83 aminoácidos, de manera adecuada al menos 84 aminoácidos, de manera adecuada al menos 85 aminoácidos, de manera adecuada al menos 86 aminoácidos, de manera adecuada al menos 87 aminoácidos, de manera adecuada al menos 88 aminoácidos, de manera adecuada al menos 89 aminoácidos, de manera adecuada al menos 90 aminoácidos, de manera adecuada al menos 91 aminoácidos, de manera adecuada al menos 92 aminoácidos, de manera adecuada al menos 93 aminoácidos, de manera adecuada al menos 94 aminoácidos, de manera adecuada al menos 95 aminoácidos, de manera adecuada al menos 96 aminoácidos; de manera más adecuada al menos 97 aminoácidos; de la manera más adecuada 98 aminoácidos (excluyendo cualquier inserción de péptido heterólogo). De manera adecuada, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos correspondientes a hSteA de longitud completa. De manera adecuada, hSteA de longitud completa significa 98 aa, de la manera más adecuada correspondientes a los mostrados en SEQ ID NO: 1.

#### Andamiaje

Tal como se conoce en la técnica, el término "andamiaje" se refiere a una proteína que puede presentar péptido(s) diana a disolvente sin que su propia estructura se deforme por el péptido diana.

Con respecto a la presentación de péptido a disolvente, esto puede someterse a prueba usando experimentos de inmunoprecipitación. Por ejemplo, puede obtenerse una indicación de que un péptido está presentándose a disolvente mediante su disponibilidad para un anticuerpo capaz de reconocerlo. Por tanto, con el fin de someter a prueba la capacidad de una proteína de andamiaje para presentar un péptido a disolvente, se expresará el andamiaje que comprende el péptido y se usará un anticuerpo que reconoce el péptido para intentar inmunoprecipitar la fusión de andamiaje-péptido. Si esta proteína puede inmunoprecipitarse o capturarse en el anticuerpo, esto muestra que el péptido se presentó a disolvente tal como se requiere por una proteína de andamiaje. Otra indicación, o una alternativa, de que un péptido está presentándose a disolvente puede obtenerse mediante estudios de fosforilación. Incorporando un sitio aceptor de fosfato en el péptido diana, y después poniendo en contacto la fusión de andamiaje-péptido con la cinasa relacionada en condiciones que permiten la fosforilación, entonces puede verificarse la presentación del péptido a disolvente. La fosforilación del péptido indica la correcta presentación a disolvente.

Una proteína de andamiaje debe ser capaz de aceptar una inserción de péptido, es decir una inserción de péptido heterólogo (péptido "diana") tal como se enseña en el presente documento. Preferiblemente, la inserción de péptido tiene 36 aminoácidos o menos, preferiblemente 20 aminoácidos o menos. Preferiblemente la inserción de péptido tiene 12 aminoácidos o menos.

Con respecto a la resistencia de una proteína de andamiaje a deformarse por el péptido diana que porta, puede someterse a prueba usando técnicas tales como dicroísmo circular. Específicamente, un análisis de dicroísmo circular de una proteína de andamiaje sin péptido diana insertado en la misma debe ser sustancialmente igual a las características de dicroísmo circular de la misma proteína de andamiaje cuando porta un péptido diana. Esto proporciona una demostración de que la presencia del péptido diana en la proteína de andamiaje no ha comprometido o deformado la estructura de la proteína de andamiaje que la porta.

Por ejemplo, los espectros de CD de UV cercano informan sobre el entorno de las cadenas laterales aromáticas. Los picos, positivos o negativos, en un espectro de CD de UV cercano indican que el entorno alrededor de los residuos aromáticos es fijo. Esto se interpreta como una proteína que tiene una estructura terciaria fija. Incorporar péptidos heterólogos en sitio(s) de inserción tal como se enseña en el presente documento da de manera adecuada como resultado espectros de CD de UV cercano con la misma forma que los andamiajes "vacíos", indicando que la adición de péptidos heterólogos no ha perturbado la estructura terciaria de las proteínas de andamiaje. Tal como constatará el experto en la técnica, los espectros pueden tener diferentes magnitudes, por ejemplo los picos pueden ser más altos y/o los valles pueden ser más bajos, pero la conservación de los espectros con la misma forma es el factor importante.

Por ejemplo, los espectros de CD de UV lejano informan sobre la estructura secundaria bruta. La hélice alfa, la cadena beta y la espiral aleatoria tienen todos ellos espectros de CD de UV lejano claramente diferentes. Incorporar péptidos heterólogos en sitio(s) de inserción tal como se enseña en el presente documento da de manera adecuada como resultado espectros de CD de UV lejano con la misma forma que los andamiajes "vacíos", indicando que la adición de péptidos heterólogos no ha perturbado la estructura secundaria bruta de las proteínas de andamiaje. Tal como constatará el experto en la técnica, los espectros pueden tener magnitudes diferentes, por ejemplo los picos pueden ser más altos y/o los valles pueden ser más bajos, pero la conservación de los espectros con la misma forma es el factor importante.

De manera adecuada, una proteína de andamiaje restringe el péptido diana. La presencia de un efecto restringido en una proteína de andamiaje puede demostrarse comparando la afinidad de una entidad que se une al péptido diana cuando el péptido diana está en la proteína de andamiaje con la afinidad cuando el péptido no está en la proteína de andamiaje. Una diferencia en estas dos afinidades indica que la proteína de andamiaje está restringiendo el péptido para adoptar una conformación tridimensional particular. De manera adecuada, una proteína de andamiaje restringe un péptido de modo que demuestra una afinidad de unión aumentada cuando está presente en el contexto de la proteína de andamiaje. Dicho de otro modo, de manera adecuada la proteína de andamiaje reduce el coste entrópico de la unión y, por tanto, aumenta la afinidad medida en comparación con la unión de un péptido libre.

De manera adecuada, una proteína de andamiaje es biológicamente neutra. Por "biológicamente neutra" quiere decirse que se han eliminado interacciones conocidas con otras proteínas. Además, preferiblemente se elimina cualquier capacidad de señalización que presenta la proteína. Se conocen mutaciones para neutralidad biológica de andamiajes basados en estefina A, y se comentan ejemplos preferidos en el presente documento.

Se contempla expresamente la combinación de tales mutaciones para neutralidad biológica con las mutaciones enseñadas en el presente documento para la modulación de estabilidad térmica.

De manera adecuada, el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones es una proteína de andamiaje.

En otro aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere al uso de un polipéptido tal como se divulga en el presente documento como proteína de andamiaje.

#### Estabilidad térmica

Una parte clave de la invención tal como se define en las reivindicaciones es la modulación de la estabilidad térmica. Sin conocimiento de la invención, en principio mutar cualquier residuo en el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede conducir a un cambio en la estabilidad térmica. Sin embargo, los inventores estudiaron la proteína en detalle a todos los niveles de su estructura y diseñaron cambios particulares en la proteína con el fin de influir en la estabilidad térmica. De manera sorprendente, no todas las mutaciones que diseñaron los inventores produjeron los efectos esperados. Por tanto, existe un gran grado de imprevisibilidad asociado con la realización de mutaciones para influir en la estabilidad térmica en una proteína de andamiaje. Como resultado de un esfuerzo intelectual significativo y experimentación, los inventores han obtenido unas enseñanzas muy detalladas presentadas en el presente documento referentes a qué residuos pueden usarse para influir en la estabilidad térmica.

También se incluyen con el propósito de comparación diversos datos que muestran sorprendentemente residuos sin efecto o con efecto neutro sobre la estabilidad tal como Tf, esos datos ilustran adicionalmente cómo no podría haberse llegado a la invención tal como se define en las reivindicaciones mediante predicción a partir de la técnica.

La estabilidad térmica puede evaluarse mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica. De la manera más adecuada, la estabilidad térmica se lee o se evalúa de manera adecuada midiendo la Tf. Por tanto, de manera adecuada, las referencias a "estabilidad térmica" pueden entenderse como referencias a "Tf". A menos que resulte evidente lo contrario a partir del contexto, una estabilidad térmica/Tf "mejorada" significa una estabilidad térmica/Tf aumentada. "Mejorado" es un término relativo, a menos que resulte evidente lo contrario a partir del contexto, "aumentado" significa "aumentado con respecto a estefina A de tipo natural". Dicho de otro modo, con respecto a estefina A que tiene el residuo de aminoácido de tipo natural en la posición mencionada; de la manera más adecuada con respecto a estefina A de tipo natural que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Debe observarse que la mayoría de las mediciones presentadas en el presente documento son con respecto a hSteA Y35W; la misma diferencia relativa con respecto a hSteA es una suposición científica.

Además de proporcionar una evaluación de la estabilidad térmica, la Tf es un buen sustituto para evaluar lo fácil que resulta realizar la proteína de andamiaje, los andamiajes con Tf superiores son ventajosamente más fáciles de realizar. Además, un aumento de la Tf puede mostrar que la proteína es "más rígida" y, por tanto, más adecuada para aceptar inserciones de péptido heterólogo. Además, la Tf es una buena indicación de estabilidad, por ejemplo

la vida útil de almacenamiento de una proteína puede aumentarse ventajosamente cuando es más estable, es decir que tiene una Tf superior. Además, una Tf aumentada puede proporcionar ventaja(s) adicional(es) tal(es) como un rendimiento mejorado en el formateo posterior, estabilidad a largo plazo, y/o flexibilidad en el diseño de ensayos.

5 La Tf de proteínas también se conoce como el punto medio de desnaturalización, y se define como la temperatura a la que están presentes los estados tanto plegado como no plegado en cantidades o poblaciones iguales en equilibrio. Tf se determina de esta manera suponiendo un plegamiento de proteína en dos estados.

10 Los valores de Tf facilitados en el presente documento se refieren al polipéptido "vacío" de la invención tal como se define en las reivindicaciones/proteína de andamiaje, es decir proteína de andamiaje sin inserciones de péptido heterólogo (a menos que se indique lo contrario). La inserción de secuencia(s) heterólogas puede reducir, y con frecuencia reduce, la estabilidad térmica tal como Tf y, por tanto, el valor más significativo se obtiene cuando se comparan proteínas de andamiaje vacías.

15 La temperatura de fusión es un indicador particularmente útil de estabilidad de proteína. Tal como se usa en el presente documento, la temperatura de fusión significa el punto medio evidente de una transición de despliegue térmico. Las proporciones relativas de proteínas plegadas y no plegadas pueden determinarse mediante cualquier técnica conocida por el experto, incluyendo calorimetría diferencial de barrido, espectroscopía por diferencia de UV, fluorescencia, dicroísmo circular (CD), o RMN (por ejemplo, véase Pace, C. Nick, y J. Martin Scholtz. "Measuring the conformational stability of a protein", Protein structure: A practical approach 2 (1997): 299-321).

#### Técnicas de medición

25 Es posible usar técnicas de medición alternativas para evaluar la misma propiedad tal como Tf. Las técnicas preferidas para medir Tf incluyen Optim (de la manera más adecuada, Optim 2) y/o calorimetría diferencial de barrido (DSC). De la manera más adecuada, la evaluación de la estabilidad térmica tal como Tf se lleva a cabo mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) usando cualquier instrumento comercialmente disponible, y/o usando un instrumento de estabilidad de proteína de alto rendimiento "Optim 2" (también conocido como UNit) disponible de Avacta Analytical (Unit 20, Ash Way Thorp Arch Estate, Wetherby LS23 7FA, R.U.) y/o de Unchained Labs (6870 Koll Center Parkway, Pleasanton, CA 94566, EE. UU.).

35 En más detalle, cualquier científico/experto en la técnica apreciará que no es probable producir el mismo valor absoluto cuando se mide una propiedad mediante dos técnicas diferentes. Teniendo esto en cuenta, la Tf medida mediante Optim y medida mediante DSC produce valores muy similares, pero algunas veces no precisamente idénticos. Las Tf medidas mediante DSC y las Tf medidas mediante Optim producen la misma indicación de cambios. Por tanto, si la Tf de un polipéptido se mide mediante Optim y la Tf del mismo polipéptido se mide mediante DSC, pueden no producir de manera precisa los mismos valores absolutos, pero ambas darán la misma indicación de cambio, por ejemplo, de +10 °C. Además, la clasificación de polipéptidos individuales es la misma usando cualquier técnica. Por tanto, debe tenerse en cuenta que, según la práctica científica normal, los valores absolutos mencionados pueden variar ligeramente dependiendo de la técnica usada para realizar la medición. A menos que se mencione lo contrario, los valores en el presente documento se determinan de manera adecuada mediante Optim. Las ventajas de Optim incluyen que es rápido, y que resulta fiable usando muy poco material de entrada. Una limitación de Optim es que las mediciones son las más fiables cuando la Tf está por debajo de 95 °C, de manera adecuada por debajo de 92 °C, de la manera más adecuada por debajo de 90 °C. Una ventaja de DSC es que funciona muy bien a temperaturas superiores, y puede ser ligeramente mejor para evitar efectos de interferencia. Por tanto, si se desea intentar determinar las Tf absolutas, entonces la DSC será la técnica de medición de elección. Sin embargo, como cuestión práctica cuando se miden "deltas" o diferencias entre polipéptidos individuales, entonces Optim es una técnica muy conveniente y muy fiable y robusta de usar. A menos que se mencione lo contrario, los valores proporcionados en el presente documento se determinan usando Optim.

50 En todas las circunstancias, una buena práctica científica es comparar mediciones entre polipéptidos individuales que se determinaron usando la misma técnica de medición. De manera adecuada, la Tf es la Tf cuando se determina mediante DSC o Optim. De la manera más adecuada, la Tf es la Tf cuando se determina mediante Optim.

55 De la manera más adecuada, la estabilidad tal como Tf se evalúa para estefina A de tipo natural de la misma manera que se evalúa la estabilidad tal como Tf para los polipéptidos/proteínas de andamiaje que portan mutaciones tal como se divulga en el presente documento. Con propósitos de referencia, la Tf de estefina A de tipo natural cuando se evalúa mediante DSC (r/t) es de 89,0 °C.

60 Con propósitos de comparación, la proteína de andamiaje de SQT de la técnica anterior tiene una Tf de 64,6 °C cuando se evalúa mediante las mismas técnicas.

A continuación se comentan en más detalle técnicas de medición.

65 De manera similar, la SteA humana es el punto de partida preferido para los andamiajes antes de mutar y/o insertar péptidos heterólogos tal como se describe. Ventajosamente, la mutación Y35W se incluye para dar una señal que puede medirse para monitorizar fácilmente la estabilidad térmica. Por tanto, muchas o la mayor parte de las

mediciones proporcionadas se han realizado en andamiajes que incluyen Y35W. Por ejemplo, cuando se muestran datos para N32G que aumentan la estabilidad en 3 grados, se realizó la medición de que hSteA Y35W N32G aumenta la estabilidad en 3 grados con respecto a hSteA Y35W.

- 5 Una expectativa científica razonable y robusta es que el efecto de una mutación tal como se mide en hSteA Y35W tiene el mismo efecto sobre hSteA. Esto se ha validado cuidadosamente y se presentan datos para respaldarlo: se llevó a cabo un experimento de DSC con varias mutaciones tanto en hSteA como en hSteA Y35W. Se incluyen estos datos a continuación, proporcionando la diferencia en la estabilidad con respecto a hSteA / hSteA Y35W y mostrando que esta expectativa es científicamente aceptable:

10

Diferencia en la estabilidad con respecto a hSteA / hSteA Y35W:

N23G	3,3 / 2,1
M65I	7,6 / 6,6
Q42E	10 / 9,6
T51L	14,4 / 12,4
A59V dD61	13,6 / 11,6
A59V dD61 G60N N62G	17,1 / 13,6

15

De manera adecuada, el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones/proteína de andamiaje tiene una temperatura de fusión (Tf) de al menos 90 °C, más preferiblemente al menos 91 °C, más preferiblemente al menos 92 °C, más preferiblemente al menos 94 °C, más preferiblemente al menos 95 °C, más preferiblemente al menos 98 °C, y lo más preferiblemente al menos 100 °C.

20

En un aspecto, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a aumentar la estabilidad térmica de un polipéptido de estefina A tal como una proteína de andamiaje de estefina A mediante el uso de mutaciones tal como se enseñan en el presente documento.

25

En otro aspecto, la invención es útil en la reducción de la estabilidad térmica de un polipéptido de estefina A tal como una proteína de andamiaje de estefina A mediante el uso de mutaciones tal como se enseñan en el presente documento.

30

Por tanto, en un aspecto la invención es útil en un método de aumentar la estabilidad térmica de un polipéptido de estefina A tal como una proteína de andamiaje de estefina A realizando una o más mutaciones en dicho polipéptido de estefina A tal como una proteína de andamiaje de estefina A, mutación/mutaciones que se selecciona(n) del grupo que consiste en:

35

E29M, N32G, T34V, T34R, T34K, Q42E, T45I, T45V, T51F, T51V, T51L, T51I, A59L, A59I, A59V, K63R, M65V, M65I, L67I, N90T, (E29K, K30E, E33K), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), y (A59V, ΔD61);

de manera más adecuada seleccionadas del grupo que consiste en:

40

E29M, N32G, T34V, T34R, T45I, T45V, T51F, T51V, T51L, A59L, A59I, M65V, L67I, (E29K, K30E, E33K), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), y (A59V, ΔD61).

45

Por tanto, en un aspecto la invención es útil en un método de reducir la estabilidad térmica de un polipéptido de estefina A tal como una proteína de andamiaje de estefina A realizando una o más mutaciones en dicho polipéptido de estefina A tal como una proteína de andamiaje de estefina A, mutación/mutaciones que se selecciona(n) del grupo que consiste en:

50

A12I, A12V, I16L, V20A, V20I, V20L, Q26E, T31K, N32D, N32H, T34D, T34P, L38A, L38V, L38F, A40I, A40V, Q42D, V48E, V48D, V48G, V48A, V48L, T51A, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (Y54D, T83D, Q86E), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y (T83D, Q86E);

de manera más adecuada seleccionadas del grupo que consiste en:

55

A12I, A12V, I16L, V20I, V20L, Q26E, T31K, N32D, N32H, T34D, T34P, L38A, L38V, A40I, A40V, Q42D, V48E, V48G, V48A, T51A, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (Y54D, T83D, Q86E), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y (T83D, Q86E).

60

La invención tal como se define en las reivindicaciones es notable ya que las mutaciones que se enseñan no son

interdependientes (a menos que se mencione lo contrario en el texto). Dicho de otro modo, las mutaciones (o grupos de mutaciones si se menciona lo contrario en el texto) enseñadas en el presente documento para influir en la estabilidad térmica son independientes, pueden combinarse en diferentes permutaciones para lograr el mismo beneficio técnico de la invención tal como se define en las reivindicaciones, es decir para aumentar (o reducir) la estabilidad térmica. Por tanto, si se desea usar un subconjunto particular de mutaciones en un polipéptido según la invención, tal como se define en las reivindicaciones, entonces el subconjunto puede elegirse de la colección global de mutaciones divulgadas en el presente documento, dado que ventajosamente esas mutaciones no se basan en otras partes de la proteína con el fin de proporcionar sus efectos ventajosos. Por tanto, si se requiere un gran cambio en la estabilidad térmica, entonces un experto en la técnica seleccionará un mayor número de mutaciones tal como se divulga. Si se requiere un aumento de la estabilidad térmica, entonces el experto en la técnica puede seleccionar mutaciones divulgadas en el presente documento que aumentan la estabilidad térmica, o puede seleccionar cualquier subconjunto de esas mutaciones combinadas con el fin de proporcionar el nivel deseado de aumento de la estabilidad térmica.

Asimismo, si se requiere una reducción de la estabilidad térmica, entonces el experto en la técnica puede seleccionar mutaciones divulgadas en el presente documento que reducen la estabilidad térmica, o puede seleccionar cualquier subconjunto de esas mutaciones combinadas con el fin de proporcionar el nivel deseado de reducción de la estabilidad térmica.

Cada una de las mutaciones divulgadas en el presente documento como útiles en la manipulación o modulación de la estabilidad térmica (tal como Tf) del polipéptido de la invención puede usarse de manera independiente. Tal como se explica, en algunas realizaciones el operario experto puede buscar elegir cada una de las mutaciones útiles para aumentar la Tf con el fin de proporcionar un polipéptido con una estabilidad térmica superior (a menos que se mencione lo contrario, superior/aumentado o inferior/reducido son con respecto a la estabilidad térmica de la estefina A de tipo natural, cuya secuencia ya se proporciona en el presente documento). En otro conjunto de realizaciones, el operario experto puede elegir cada una de las mutaciones divulgadas para disminuir o reducir la estabilidad térmica (por ejemplo Tf) del polipéptido tal como proteína de andamiaje con respecto a estefina A de tipo natural. En otro conjunto de realizaciones, el operario experto puede seleccionar mutaciones de aquellas que aumentan la estabilidad térmica y de aquellas que reducen la estabilidad térmica, tales realizaciones "mixtas" pueden permitir ventajosamente al operario experto obtener una estabilidad térmica preseleccionada más precisa (tal como Tf) para el polipéptido/proteína de andamiaje producido de esta manera. Por ejemplo, si se desea una estabilidad térmica particular (tal como Tf), entonces al seleccionar qué mutantes particulares usar el experto llevará a cabo una aritmética con el fin de seleccionar mutaciones que pueden (por ejemplo) aumentar la estabilidad térmica hacia el valor deseado. Sin embargo, dado que cada mutación contribuye con un valor ligeramente diferente al aumento de la estabilidad térmica (tal como Tf), entonces puede ser necesario elegir también una o más mutaciones de las que reducen la estabilidad térmica con el fin de "equilibrar" el valor de estabilidad térmica seleccionado deseado global. Por ejemplo, si la estabilidad térmica deseada es 6° superior a la de estefina A de tipo natural, puede ser posible seleccionar dos mutaciones diferentes que aumentan, cada una, la estabilidad térmica en 4°, y una mutación adicional que reduce la estabilidad térmica en 2°, obteniendo de ese modo un efecto global de estabilidad térmica aumentada con respecto a estefina A de tipo natural en 6° (+4, +4, -2). Cualquier combinación de mutaciones de este tipo puede usarse por el operario experto, incluyendo expresamente combinaciones de mutaciones que se seleccionan tanto de las que aumentan la Tf como de las que reducen la Tf con respecto a estefina A de tipo natural. Esto puede ser importante cuando se diseñan andamiajes que incorporan mutaciones adicionales, por ejemplo las mutaciones útiles para lograr neutralidad biológica. En particular, cuando se desea usar una mutación de V48 tal como V48D, esto inhibe la dimerización por intercambio de dominio y, por tanto, es extremadamente útil para proporcionar neutralidad biológica. Sin embargo, esta mutación también tiene un efecto desestabilizante (reduciendo la estabilidad térmica tal como Tf) sobre el polipéptido/proteína de andamiaje. Por tanto, con el fin de afectar a la estabilidad térmica y llegar al valor deseado, será importante seleccionar mutaciones con el fin de "equilibrar" el efecto de seleccionar la mutación de neutralidad biológica V48D. Un polipéptido/proteína de andamiaje a modo de ejemplo diseñado de esta manera puede tener las siguientes mutaciones: V48D, N32G, M65I (denominado en el presente documento 3 T2).

Por tanto, los andamiajes de la serie 3t a modo de ejemplo son ejemplos de realizaciones "mixtas". Tienen la mutación V48D desestabilizante, más diferentes números de mutaciones estabilizantes para "recuperar" (es decir, volver hacia la Tf de tipo natural aumentando la Tf a partir del mutante V48D de Tf inferior desestabilizado) y después aumentar adicionalmente la Tf. Datos que demuestran la Tf de diferentes ejemplos de tales realizaciones mixtas son los siguientes:

hSteA N32G V48D = 3t1 = 85,6 °C

hSteA N32G V48D M65I = 3t2 = 89,2 °C

hSteA N32G V48D M65I T51L = 3t3 = 91,6 °C

hSteA N32G V48D M65I Q42E = 3t4 = 92,4 °C

hSteA N32G V48D Q42E T51L M65I = 3t5 = 94,7 °C

Evidentemente, será posible producir polipéptidos/proteínas de andamiaje según la invención tal como se define en las reivindicaciones con mutaciones combinadas que dan como resultado un cambio final moderado en la estabilidad térmica, por ejemplo Tf con respecto a estefina A de tipo natural. Por ejemplo, una realización de este tipo puede comprender un polipéptido/proteína de andamiaje que tiene una mutación V48D, que reduce la Tf, y también tener una o más mutaciones según la presente invención tal como se define en las reivindicaciones que aumentan la Tf, de modo que la Tf final de ese polipéptido/proteína de andamiaje puede ser superior o inferior a la Tf de estefina A de tipo natural dependiendo de las mutaciones seleccionadas. Por tanto, de manera adecuada el cambio de Tf con respecto a estefina A de tipo natural no es determinante con respecto a si una proteína de andamiaje es o no una proteína de andamiaje de la invención (eso será tal como se define en las reivindicaciones) pero es importante que una proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones comprenda al menos una mutación tal como se enseña en el presente documento para afectar a la Tf tal como aumentarla o reducirla con respecto a estefina A. Si esa(s) mutación/mutaciones se usa(n) en un polipéptido/proteína de andamiaje en combinación con otras mutaciones tales como la mutación V48D conocida, entonces el polipéptido/proteína de andamiaje resultante todavía se considera como parte de la invención tal como se define en las reivindicaciones debido a incluir la(s) mutación/mutaciones divulgada(s) en el presente documento para influir en la estabilidad térmica tal como Tf, ya tenga o no el producto final una Tf superior o inferior a la de estefina A de tipo natural.

La evaluación de si la mutación aumenta o reduce la Tf con respecto a estefina A de tipo natural se determina de manera adecuada para la mutación (o grupo de mutaciones interdependientes según sea apropiado tal como resulta evidente a partir del contexto) de manera aislada, es decir cuando se realiza de manera individual (o como un único grupo de mutaciones interdependientes según sea apropiado, tal como resulta evidente a partir del contexto) y cuando el polipéptido/proteína de andamiaje mutado de ese modo se compara con estefina A de tipo natural.

No obstante, en realizaciones preferidas de la invención tal como se define en las reivindicaciones, el polipéptido/proteína de andamiaje tiene una estabilidad térmica aumentada con respecto a estefina A de tipo natural. Por tanto, de manera adecuada cuando el polipéptido/proteína de andamiaje comprende mutaciones que reducen su estabilidad térmica tal como Tf con respecto a estefina A de tipo natural (por ejemplo, la mutación V48D), de manera adecuada dicho polipéptido/proteína de andamiaje comprende además mutaciones tal como se divulgan en el presente documento suficientes para compensar la reducción de la estabilidad térmica tal como Tf provocada por esa mutación o mutaciones (por ejemplo, la mutación V48D) y de ese modo todavía dar como resultado un polipéptido/proteína de andamiaje con estabilidad térmica aumentada con respecto a estefina A de tipo natural.

Por tanto, de manera adecuada, el polipéptido/proteína de andamiaje tiene una Tf aumentada en al menos +1 °C con respecto a estefina A de tipo natural, de manera adecuada aumentada en al menos +2 °C, de manera adecuada aumentada en al menos +3 °C, de manera adecuada aumentada en al menos +4 °C, de manera adecuada aumentada en al menos +5 °C, de manera adecuada aumentada en al menos +6 °C, de manera adecuada aumentada en al menos +7 °C, de manera adecuada aumentada en al menos +10 °C, de manera adecuada aumentada en al menos +13 °C, de manera adecuada aumentada en al menos +14 °C, de manera adecuada aumentada en al menos +17 °C, con respecto a estefina A de tipo natural.

Los ejemplos de tales valores para mutaciones particulares o combinaciones de mutaciones incluyen:

hSteA N32G M65I +7,6 °C

hSteA N32G M65I Q42E +10,0 °C

hSteA N32G M65I Q42E T51L +14,4 °C

hSteA N32G M65I Q42E T51L A59V dD61 +13,6 °C

hSteA N32G M65I Q42E T51L A59V G60N dD61 N62G +17,1 °C

Pueden realizarse ejemplos de realizaciones mixtas (es decir, secuencias que incluyen una mutación desestabilizante pero con mutaciones estabilizantes de compensación). Como ejemplos, se realizan andamiajes que incluyen V48D y a continuación se muestran sus valores determinados de Tf:

hSteA N32G V48D M65I = 3t2; Tf 89,2 °C

hSteA N32G V48D M65I T51L = 3t3; Tf 91,6 °C

hSteA N32G V48D M65I Q42E = 3t4; Tf 92,4 °C

hSteA N32G V48D Q42E T51L M65I = 3t5; Tf 94,7 °C



hSteA Y35W V48D N32G Q42E T51L M65I (A59V ΔD61) (E29K K30E E33K) = 3r1; Tf 95,1 °C

hSteA Y35W V48D N32G Q42E T51L M65I (A59V G60N ΔD61 N62G) (E29K K30E E33K) = 3r2; Tf >98,3 °C

5 Los andamiajes a modo de ejemplo tales como 3t1 pueden ser ligeramente menos estables que hSteA de tipo natural y 3t2 es aproximadamente tan estable como hSteA (ligeramente más estable que hSteA) pero tales andamiajes todavía son útiles. Por ejemplo, 3t1 tiene muy pocas mutaciones en comparación con el tipo natural (sólo 3 mutaciones) y, por tanto, representa un compromiso excelente entre mantener una secuencia próxima al tipo natural al tiempo que todavía se diseña un andamiaje útil con buena estabilidad. En 3t1, V48D desestabilizante se  
10 compensa fuertemente mediante las dos mutaciones estabilizantes adicionales, dando como resultado un andamiaje muy estable pero que todavía porta la mutación V48D útil para neutralidad biológica.

De manera adecuada, el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones comprende D en la posición 48, tal como V48D.

#### Reducir la estabilidad térmica

Asimismo, en determinadas realizaciones periféricas de la invención tal como se define en las reivindicaciones, el polipéptido/proteína de andamiaje puede tener una estabilidad térmica reducida con respecto a estefina A de tipo natural. Por tanto, de manera adecuada, cuando el polipéptido/proteína de andamiaje comprende mutaciones que aumentan su estabilidad térmica tal como Tf con respecto a estefina A de tipo natural (por ejemplo, la mutación N32G), de manera adecuada dicho polipéptido/proteína de andamiaje comprende además mutaciones tal como se divulgan en el presente documento suficientes para compensar el aumento de la estabilidad térmica tal como Tf provocado por esa mutación o mutaciones (por ejemplo, la mutación N32G) y todavía dar como resultado de ese modo un polipéptido/proteína de andamiaje con estabilidad térmica reducida con respecto a estefina A de tipo natural.

Para referencia, la estefina A humana de tipo natural tiene una Tf de 89,0 °C.

30 Por tanto, en algunas realizaciones, de manera adecuada el polipéptido/proteína de andamiaje tiene una Tf reducida en al menos -1 °C con respecto a estefina A de tipo natural, de manera adecuada reducida en al menos -2 °C, de manera adecuada reducida en al menos -3 °C, de manera adecuada reducida en al menos -4 °C, de manera adecuada reducida en al menos -5 °C, de manera adecuada reducida en al menos -6 °C, de manera adecuada reducida en al menos -7 °C, de manera adecuada reducida en al menos -8 °C, de manera adecuada reducida en al menos -9 °C, de manera adecuada reducida en al menos -10 °C, de manera adecuada reducida en al menos -11 °C, de manera adecuada reducida en al menos -12 °C, de manera adecuada reducida en al menos -13 °C, de manera adecuada reducida en al menos -15 °C, de manera adecuada reducida en al menos -16 °C, de manera adecuada reducida en al menos -21 °C, con respecto a estefina A de tipo natural.

40 Los ejemplos de tales valores para mutaciones particulares o combinaciones de mutaciones incluyen:

hSteA Y35W V20I L38A -16,7 °C

hSteA Y35W V20L L38A -15,3 °C

hSteA Y35W Y54D T83D Q86E -21,1 °C

Ejemplos más adecuados son:

hSteA N32D V48D Y54D T83D Q86E (Tf de aproximadamente 58 °C)

hSteA V48D Y35W V20A L38A (Tf de aproximadamente 57 °C)

hSteA V48D Y35W A40I T31K A12I V20I (Tf de aproximadamente 50 °C)

55 El experto en la técnica será consciente de que deben elegirse mutaciones desestabilizantes al tiempo que se mantiene una proteína de andamiaje que se pliega correctamente, por ejemplo a temperatura ambiente, por ejemplo a 18-24 °C. Evidentemente, si se introducen simultáneamente todas las mutaciones desestabilizantes enseñadas en el presente documento en un polipéptido de SteA, ese polipéptido puede tener una Tf inferior a la temperatura ambiente y presentará un uso práctico limitado. Por tanto, en esta realización, de manera adecuada se usan mutaciones tal como se enseñan en el presente documento en combinaciones que dan como resultado un polipéptido con una Tf no inferior a 25 °C, de manera adecuada no inferior a 30 °C, de manera adecuada no inferior a 40 °C, de manera adecuada no inferior a 50 °C. Por tanto, en esta realización, de manera adecuada se usan mutaciones tal como se enseñan en el presente documento en combinaciones que dan como resultado un polipéptido con una Tf de 25 °C o más, de manera adecuada 30 °C o más, de manera adecuada 40 °C o más, de manera adecuada 50 °C o más. Por tanto, en esta realización, de manera adecuada se usan mutaciones tal como se

enseñan en el presente documento en combinaciones que dan como resultado un polipéptido con una Tf de 25-88 °C o más, de manera adecuada 30-88 °C o más, de manera adecuada 40-88 °C o más, de manera adecuada 50-88 °C o más.

5 En el presente documento se enseña la evaluación del plegamiento correcto (por ejemplo, estructura o conformación), por ejemplo usando espectros de CD de UV cercano y lejano. Por tanto, si queda cualquier duda, el experto sólo necesita comprobar la proteína con la combinación de mutaciones, y después evaluar el plegamiento correcto (por ejemplo, estructura o conformación), y/o medir la Tf tal como se enseña en el presente documento.

10 Las realizaciones más preferidas son aquellas con una estabilidad térmica aumentada con respecto a estefina A de tipo natural.

#### Sitio P25

15 P25 puede mutarse. Los mutantes de P25 tales como P25S pueden ser útiles para mejorar el polipéptido/proteína de andamiaje, por ejemplo haciendo que sea más rígido. El sitio P25 está ubicado en un rizo en la hélice de la proteína de andamiaje basada en estefina A. Mutar P25 para dar otro residuo (tal como P25S) conserva el rizo en la hélice. Los mutantes de P25, tales como P25S, no muestran ningún efecto significativo, o ningún efecto sobre la estabilidad térmica.

#### Sitio V48

V48 es importante para la dimerización por intercambio de dominio. De manera adecuada, se muta V48 para prevenir o inhibir la dimerización por intercambio de dominio. De la manera más adecuada, V48 es V48D.

25 V48 también es importante para la unión a cathepsina. Por tanto, para una neutralidad biológica superior, de manera adecuada se muta V48. De la manera más adecuada, se muta V48 para dar V48D.

Pueden usarse mutaciones V48G o V48D, de la manera más adecuada V48D.

#### Sitio N32

Ventajosamente, se muta el sitio N32. Por ejemplo, puede mutarse para dar N32G. Esto tiene un efecto ventajoso en el aumento de la estabilidad térmica del polipéptido/proteína de andamiaje. Además, esto tiene la propiedad ventajosa de eliminar un sitio de glicosilación a partir del polipéptido/proteína de andamiaje, ayudando de ese modo a garantizar la neutralidad biológica.

Pueden usarse otras mutaciones en el sitio N32. Por ejemplo, la mutación N32G evita la glicosilación eliminando el residuo que se glicosilará. Sin embargo, N sólo se glicosila cuando se reconoce en un motivo NXS/T en el que X es cualquier residuo excepto P. En hSteA, la secuencia en este sitio es NET. Puede evitarse la glicosilación o bien mutando N para dar cualquier otra cosa, o bien T para dar cualquier cosa menos S. N32G tiene la ventaja de una termoestabilidad adicional. De manera adecuada, se sustituye T34 por cualquier aminoácido excepto S. T34E tiene la propiedad de que no cambia la termoestabilidad. Mutaciones o bien de N32 o bien de T34 detendrán la glicosilación en N32 eliminando el motivo requerido.

45 N32G tiene un beneficio adicional en la ocupación de centros activos de hélice. G se encuentra con una frecuencia de más del doble del promedio en esta posición. El siguiente más favorecido es histidina, seguido de cerca por N. Todas las demás mutaciones están menos favorecidas que N para la ocupación de centros activos de hélice. De manera adecuada, no se usa la histidina en 32 (N32H), ya que este residuo de aminoácido añade una cadena lateral que puede valorarse que puede no ser deseable.

Una ventaja adicional de la mutación N32G es que optimiza la ocupación de centros activos en el extremo de la hélice en esta zona del polipéptido/proteína de andamiaje. Por tanto, aunque pueden usarse otros mutantes de N32, N32G proporciona ventajas particulares tal como se indicó anteriormente.

55 Por motivo de convenio, si algunas mutaciones se presentan juntas entre paréntesis, por ejemplo tal como se muestra en algunas de las figuras o tablas en el presente documento, esto indica que esas mutaciones se realizan de manera adecuada juntas, es decir en combinación. Por ejemplo "(T83D, Q86E)" significa "sustitución de T83D y sustitución de Q86E" en el mismo polipéptido. Dicho de otro modo, las mutaciones que se presentan juntas entre paréntesis se realizan de manera adecuada como grupo en un polipéptido/proteína de andamiaje según la invención tal como se define en las reivindicaciones. Esto puede ser importante, por ejemplo cuando se realiza un par de mutaciones en una disposición de "intercambio de carga", en este caso es importante mutar una primera posición para intercambiar la carga, y realizar la mutación de intercambio de carga opuesto correspondiente en el segundo sitio conservando de ese modo la interacción de carga-carga entre estos dos residuos en el polipéptido/proteína de andamiaje final. Por ejemplo, las mutaciones E29K K30E E33K son mutaciones de carga de superficie y se mutan de manera adecuada como grupo y, por tanto, se describen como una única opción juntas entre paréntesis: "(E29

K30 E33)", es decir, de manera adecuada, se realizan las tres mutaciones E29K K30E E33K o ninguna de las tres mutaciones en un polipéptido/proteína de andamiaje individual según la invención tal como se define en las reivindicaciones. Una ventaja del conjunto de mutaciones (E29K K30E E33K) es la formación de interacciones coulombicas favorables en la superficie del andamiaje.

#### Secuencia de referencia

De manera adecuada, todas las secuencias en el presente documento se comentan con referencia a estefina A de tipo natural humana (cistatina A) que tiene la secuencia Uniprot P01040 (de la manera más adecuada, Uniprot P01040-1). Para evitar cualquier duda, a continuación se presenta esta secuencia:

SEQ ID NO: 1 – Uniprot P01040 – cistatina A humana de tipo natural

```

10          10          20          30          40          50
MIPGGLSEAK PATPEIQEIV DKVKPQLEEK TNETYGKLEA VQYKTQVVAG
60          70          80          90
TNYIYIKVRAG DNKYMHLKVF KSLPGQNE DL VLTGYQVDKN KDDELTGF

```

Cuando se mencionan residuos de aminoácido particulares en el presente documento usando direcciones numéricas, la numeración se realiza con referencia a la secuencia de aminoácidos de estefina A de tipo natural (cistatina A) (o a la secuencia de polinucleótido que codifica para la misma si se hace referencia a ácido nucleico). Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica para estefina A de tipo natural (cistatina A) es:

SEQ ID NO: 2 (secuencia de ADN; artificial (no natural); la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 se usó para generar una secuencia de ADN con optimización de codones adecuada para su expresión en *E. coli*):

```

ATGATTCCTGGTGGTTTGTCCGGAAGCCAAACCGGCTACTCCGGAATCCAGGAGATTGTGGACAAAGT
CAAACCGCAACTGGAGGAAAAGACCAATGAAACCTATGGCAAACCTCGAAGCGGTACAGTACAAAACCC
AAGTCGTTGCGGGTACGAACTACTACATCAAAGTACGCGCAGGAGATAACAAGTATATGCATCTGAAA
GTGTTCAAAAGCTTACCAGGGCAGAATGAGGATCTGGTTCTTACGGGCTATCAGGTGGATAAGAACAA
AGACGATGAACTGACAGGCTTT

```

De manera adecuada, se hace referencia a la versión actual de la(s) base(s) de datos de secuencias. Alternativamente, se hace referencia a la versión en vigor en la fecha de presentación. Para evitar cualquier duda, se hace referencia a la versión de UniProt 2017\_02. En más detalle, se hace referencia a la versión 2017\_02 de UniProt Knowledgebase (UniProtKB) del consorcio UniProt del European Bioinformatics Institute (EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics y Protein Information Resource (PIR), publicada el 15 de febrero de 2017. UniProt (Universal Protein Resource) es un catálogo exhaustivo de información sobre proteínas ("UniProt: the universal protein knowledgebase" Nucleic Acids Res. 45: D158-D169 (2017)).

Debe usarse, tal como se entiende bien en la técnica, para localizar el residuo de interés. No siempre es un estricto ejercicio de recuento, debe prestarse atención al contexto. Por ejemplo, si la proteína de interés tiene una longitud ligeramente diferente, entonces la ubicación del residuo correcto en esa secuencia puede requerir alinear las secuencias y escoger el residuo equivalente o correspondiente. Esto se encuentra dentro del ámbito del lector experto.

La mutación tiene su significado normal en la técnica y puede referirse a la sustitución o truncamiento o delección de uno o más residuos, motivos o dominios. La mutación puede realizarse a nivel de polipéptido, por ejemplo, mediante síntesis de un polipéptido que tiene la secuencia mutada, o puede realizarse a nivel de nucleótidos, por ejemplo, realizando un polinucleótido que codifica para la secuencia mutada, polinucleótido que puede traducirse posteriormente para producir el polipéptido mutado. De manera adecuada, las mutaciones que van a usarse son tal como se exponen en el presente documento. A menos que resulte evidente lo contrario a partir del contexto, las mutaciones mencionadas en el presente documento son sustituciones. Por ejemplo "N32G" significa que el residuo correspondiente a "N32" en la estefina A de tipo natural (SEQ ID NO: 1) se sustituye por G.

#### Variación de secuencia

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden comprender cambios de secuencia con respecto a la secuencia de tipo natural además de las mutaciones clave descritas en el presente documento para modular la estabilidad térmica tal como Tf. Específicamente, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden comprender cambios de secuencia adicionales en sitios que no comprometen significativamente la función o el funcionamiento de los polipéptidos descritos en el presente documento. Los cambios de secuencia pueden ser a nivel de polipéptido o de nucleótidos.

La función de polipéptido puede someterse fácilmente a prueba usando los métodos tal como se exponen en la sección de ejemplos, por ejemplo con el fin de verificar que la estructura o conformación peptídica no se ha alterado significativamente. Por tanto, siempre que el polipéptido conserve su estructura o conformación, lo cual puede someterse fácilmente a prueba tal como se expone en el presente documento, pueden realizarse variaciones de secuencia en el polipéptido con respecto a la secuencia de referencia de tipo natural.

Por ejemplo, puede someterse a prueba un polipéptido para ver si conserva su estructura o conformación evaluando los espectros de CD de UV cercano y lejano; se registran en un tampón compatible (por ejemplo, fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4) a 0,6 mg/ml y 0,2 mg/ml, respectivamente. Se procesan los espectros restando un espectro de tampón a partir del espectro de muestra y convirtiendo las unidades en elipticidad molar (para espectros de CD de UV cercano) o elipticidad de residuo media (espectros de CD de UV lejano). Los espectros de CD de UV cercano deben tener un máximo a entre 275 nm - 280 nm, y un mínimo de adición a aproximadamente 295 nm si está presente un único triptófano en la posición 35. Esto puede ser un máximo si se elige una posición diferente para el triptófano. Los espectros de CD de UV lejano deben parecerse al de una proteína de lámina beta típica, que tiene un mínimo a aproximadamente 218 nm. Si se cumplen estas condiciones, el polipéptido ha conservado una estructura o conformación correcta. Si no hay ningún espectro de CD de UV cercano, o el espectro de CD de UV lejano tiene mínimos a 208 nm y 222 nm, o un mínimo a 198 nm, el polipéptido no ha conservado una estructura o conformación correcta y puede haberse alterado significativamente.

Los polipéptidos incluyen variantes producidas introduciendo cualquier tipo de alteración adicional (por ejemplo, inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; cambios en los estados de glicosilación; cambios que afectan al repliegamiento o isomerizaciones, estructuras tridimensionales o estados de autoasociación), que pueden diseñarse deliberadamente por ingeniería. La variante puede tener alteraciones que producen un cambio silencioso y dan como resultado un polipéptido funcionalmente equivalente. Pueden realizarse sustituciones de aminoácido deliberadas basándose en similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y la naturaleza anfipática de los residuos siempre que se conserve la estructura o conformación del polipéptido. Por ejemplo, los aminoácidos negativamente cargados incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos positivamente cargados incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polares sin carga que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina, y tirosina.

Pueden realizarse sustituciones conservativas, por ejemplo, según la siguiente tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y de manera adecuada en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

ALIFÁTICOS	No polares	G A P
		I L V
	Polares – sin carga	C S T M
		N Q
	Polares – con carga	D E
		K R
AROMÁTICOS		H F W Y

Teniendo en cuenta qué mutaciones, sustituciones u otros cambios pueden realizarse con respecto a la secuencia de tipo natural, la conservación de la estructura o conformación del polipéptido es importante. Normalmente será menos probable que las sustituciones de aminoácido conservativas afecten de manera adversa a la función.

Cuando se modifica por ingeniería el polipéptido para modular la estabilidad térmica tal como se enseña en el presente documento, deben sustituirse uno o más de aminoácidos

A12I, A12V, I16L, V20A, V20I, V20L, Q26E, E29M, T31K, N32G, N32D, N32H, T34V, T34R, T34K, T34D, T34P, L38A, L38V, L38F, A40I, A40V, Q42E, Q42D, T45I, T45V, V48E, V48D, V48G, V48A, V48L, G50S, T51F, T51V, T51L, T51I, T51A, A59L, A59I, A59V, K63R, M65V, M65I, L67I, N90T, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (E29K, K30E, E33K), (Y54D, T83D, Q86E), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, ΔD61), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K), y (T83D, Q86E);

tal como se enseña en el presente documento, o si no se sustituyen deben corresponder de manera adecuada a SEQ ID NO: 1. De manera adecuada no se usan residuos distintos de los mostrados en SEQ ID NO: 1 o sustituciones distintas de las enseñadas en el presente documento en esas posiciones.

Cuando se modifica por ingeniería el polipéptido para aumentar la estabilidad térmica tal como se enseña en el presente documento, deben sustituirse uno o más de aminoácidos

E29M, N32G, T34V, T34R, T34K, Q42E, T45I, T45V, T51F, T51V, T51L, T51I, A59L, A59I, A59V, K63R, M65V, M65I, L67I, N90T, (E29K, K30E, E33K), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), y (A59V, ΔD61);

tal como se enseña en el presente documento, o si no se sustituyen deben corresponder de manera adecuada a SEQ ID NO: 1. De manera adecuada no se usan residuos distintos de los mostrados en SEQ ID NO: 1 o sustituciones distintas de las enseñadas en el presente documento en esas posiciones.

Cuando se modifica por ingeniería el polipéptido para reducir la estabilidad térmica tal como se enseña en el presente documento, deben sustituirse uno o más de aminoácidos

A12I, A12V, I16L, V20A, V20I, V20L, Q26E, T31K, N32D, N32H, T34D, T34P, L38A, L38V, L38F, A40I, A40V, Q42D, V48E, V48D, V48G, V48A, V48L, G50S, T51A, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (Y54D, T83D, Q86E), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y (T83D, Q86E);

tal como se enseña en el presente documento, o si no se sustituyen deben corresponder de manera adecuada a SEQ ID NO: 1. De manera adecuada no se usan residuos distintos de los mostrados en SEQ ID NO: 1 o sustituciones distintas de las enseñadas en el presente documento en esas posiciones.

Cuando se modifica por ingeniería el polipéptido para proporcionar residuo(s) aromático(s) para fluorescencia/absorbancia tal como se enseña en el presente documento, deben sustituirse uno o más de aminoácidos Y35W, Y43W, Y53W, Y54W, Y64W, F70W o Y85W tal como se enseña en el presente documento, o si no se sustituyen deben corresponder de manera adecuada a SEQ ID NO: 1. De manera adecuada no se usan residuos distintos de los mostrados en SEQ ID NO: 1 o sustituciones distintas de las enseñadas en el presente documento en esas posiciones.

De manera adecuada, el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones comprende W en la posición 35, por ejemplo Y35W.

Debe observarse que Y85W presenta una clara transición tras el despliegue tal como se evalúa mediante BCM de espectros de emisión de fluorescencia intrínseca y propiedades de absorbancia mejoradas en comparación con hSteA, pero ninguna mejora evidente en la amplitud de los espectros de emisión de fluorescencia sin procesar. Para evitar cualquier duda, todavía puede usarse Y85W para transiciones en despliegue, se proporcionan pequeñas mejoras. Por tanto, esta mutación todavía es útil para observar transiciones, pero no aumenta la fluorescencia en gran medida, pero todavía funciona en esta configuración.

Cuando se modifica por ingeniería el polipéptido para neutralidad biológica tal como se enseña en el presente documento, deben sustituirse uno o más aminoácidos de la siguiente tabla tal como se enseña en el presente documento, o si no se sustituyen deben corresponder de manera adecuada a SEQ ID NO: 1. De manera adecuada no se usan residuos distintos de los mostrados en SEQ ID NO: 1 o sustituciones distintas de las enseñadas en el presente documento en esas posiciones:

SUSTITUCIÓN/SUSTITUCIONES PARA NEUTRALIDAD BIOLÓGICA			
Aminoácido (en SEQ ID NO: 1 - estefina A de tipo natural)	Sustitución(s)	Ventaja(s)	Notas
G4	R	aumenta la accesibilidad de la superficie de reconocimiento (unión a diana)	G4 también forma parte del motivo de secuencia inhibidora
	W		
V48	D	elimina la dimerización por intercambio de dominio	V48 también forma parte del motivo de secuencia inhibidora
	E		
G50	S	expresión aumentada en un sistema bacteriano	G50 también forma parte del motivo de secuencia inhibidora
Y35	W	introduce un fluoróforo	
Y43	W	introduce un fluoróforo	
Y53	W	introduce un fluoróforo	
Y54	W	introduce un fluoróforo	
Y64	W	introduce un fluoróforo	
F70	W	introduce un fluoróforo	

Y85	W	introduce un fluoróforo	
F98	W	introduce un fluoróforo	
<sup>71</sup> KSL	<sup>71</sup> NGP	bloquea que la secundaria de estructura a partir del bucle 4 se propague al interior del andamiaje	
<sup>78</sup> EDL	<sup>78</sup> ADR		lo más adecuado para andamiajes de investigación; presente en el andamiaje de SQT de la técnica anterior
71KSLPGQNEDL	71NGPPGQNADR		lo más adecuado para andamiajes de investigación; presente en el andamiaje de SQT de la técnica anterior

Los residuos que están menos conservados entre proteínas es más probable que toleren una mutación.

En total, pueden realizarse hasta 15 sustituciones con respecto a SEQ ID NO: 1 para aumentar la estabilidad térmica.

Además, pueden realizarse hasta 2 sustituciones con respecto a SEQ ID NO: 1 para neutralidad biológica.

Además, puede realizarse hasta 1 sustitución con respecto a SEQ ID NO: 1 para proporcionar residuo(s) aromático(s) para fluorescencia/absorbancia.

Por tanto, en una realización, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a polipéptido(s) que tiene(n) hasta 18 sustituciones con respecto a SEQ ID NO: 1.

A modo de ejemplo, en una realización, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a un polipéptido que tiene las siguientes sustituciones con respecto a SEQ ID NO: 1:

1 para fluorescencia (por ejemplo Y35W); 2 para neutralidad biológica (por ejemplo N32G, V48D); 15 para Tf (T34, Q42, T45, T51, K63, M65, L67, N90 (todas ellas son mutaciones individuales), E29K K30E E33K (interacciones de carga), A59 G60 D61 N62 (el giro b).

Puede realizarse una mutación adicional, de la manera más adecuada sustitución, de uno o más residuos distintos de los mencionados anteriormente de manera expresa, siempre que se conserve la estructura o conformación del polipéptido. Por tanto, en una realización, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a polipéptido(s) que tiene(n) hasta 25 mutaciones, de la manera más adecuada sustituciones, con respecto a SEQ ID NO: 1.

Por ejemplo (1 – novedoso y Tf aumentada o reducida):

MIPGGLSEAK PX1TPEX2QEIX3 DKVKPX4LEX5X6 X7X8X9X10YGKX11EX12  
VX13YKX14QVX15AG X16NYX17IKVRX18X19 X20X21KYX22HX23KVF  
KSLPGQNEDL VLX24GYX25V DKN KDELDTGF

X1 en el que el tipo natural es A y las mutaciones son I, V

X2 en el que el tipo natural es I y las mutaciones son L

X3 en el que el tipo natural es V y las mutaciones son I, L

X4 en el que el tipo natural es Q y las mutaciones son E

X5 en el que el tipo natural es E y las mutaciones son M

X7 en el que el tipo natural es T y las mutaciones son K

X8 en el que el tipo natural es N y las mutaciones son G, D, H

X10 en el que el tipo natural es T y las mutaciones son V, R, D, P

- X11 en el que el tipo natural es L y las mutaciones son A, V
- X12 en el que el tipo natural es A y las mutaciones son I, V
- 5 X13 en el que el tipo natural es Q y las mutaciones son D
- X14 en el que el tipo natural es T y las mutaciones son I, V
- X15 en el que el tipo natural es V y las mutaciones son E, G, A
- 10 X16 en el que el tipo natural es T y las mutaciones son F, V, L, A
- X18 en el que el tipo natural es A y las mutaciones son L, I
- 15 X20 en el que el tipo natural es D y las mutaciones son  $\Delta$
- X22 en el que el tipo natural es M y las mutaciones son V
- X23 en el que el tipo natural es L y las mutaciones son I
- 20 (X3, X11) en los que el tipo natural es (V, L) y las mutaciones son (I, A), (L, A), (I, V), (L, V)
- (X5, X6, X9) en los que el tipo natural es (E, K, E) y las mutaciones son (K, E, K)
- 25 (X17, X24, X25) en los que el tipo natural es (Y, T, Q) y las mutaciones son (D, D, E)
- (X18, X19, X20, X21) en los que el tipo natural es (A, G, D, N) y las mutaciones son (L, N, G, K), (L, N,  $\Delta$ , G), (V, N, G, K), (I, N, G, K), (I, N,  $\Delta$ , G), (V, N,  $\Delta$ , G)
- 30 (X18, X20, X21) en los que el tipo natural es (A, D, N) y las mutaciones son (V, N, K)
- (X18, X20) en los que el tipo natural es (A, D) y las mutaciones son (V,  $\Delta$ )
- (X19, X20, X21) en los que el tipo natural es (G, D, N) y las mutaciones son (N, G, K), (N,  $\Delta$ , G), (P,  $\Delta$ , P), (P, P, K), (P,  $\Delta$ , G), (P, G, K)
- 35 (X24, X25) en los que el tipo natural es (T, Q) y las mutaciones son (D, E)
- (X20, X21) en los que el tipo natural es (D, N) y las mutaciones son (N, K).
- 40 Por tanto, en una realización, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a polipéptido(s) que tiene(n) hasta 13 mutaciones, de la manera más adecuada sustituciones, con respecto a SEQ ID NO: 1. Por ejemplo (2 – novedoso y Tf aumentada):
- MIPGGLSEAK PATPEIQEIV DKVKPQLEX1X2 TX3X4X5YGKLEA VQYKX6QVVAG
- 45 X7NYYIKVRX8X9 X10X11KYX12HX13KVF KSLPGQNE~~D~~L VLTGYQVDKN K~~D~~DEL~~T~~GF
- X1 en el que el tipo natural es E y las mutaciones son M
- X3 en el que el tipo natural es N y las mutaciones son G
- 50 X5 en el que el tipo natural es T y las mutaciones son V, R
- X6 en el que el tipo natural es T y las mutaciones son I, V
- 55 X7 en el que el tipo natural es T y las mutaciones son F, V, L
- X8 en el que el tipo natural es A y las mutaciones son L, I
- X10 en el que el tipo natural es D y las mutaciones son  $\Delta$
- 60 X12 en el que el tipo natural es M y las mutaciones son V
- X13 en el que el tipo natural es L y las mutaciones son I

(X1, X2, X4) en los que el tipo natural es (E, K, E) y las mutaciones son (K, E, K)

(X8, X9, X10, X11) en los que el tipo natural es (A, G, D, N) y las mutaciones son (L, N, G, K), (L, N, Δ, G), (V, N, G, K), (I, N, G, K), (I, N, Δ, G), (V, N, Δ, G)

5

(X8, X10, X11) en los que el tipo natural es (A, D, N) y las mutaciones son (V, N, K)

(X9, X10, X11) en los que el tipo natural es (G, D, N) y las mutaciones son (N, G, K), (N, Δ, G)

10

(X8, X10) en los que el tipo natural es (A, D) y las mutaciones son (V, Δ).

Por tanto, en una realización, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a polipéptido(s) que tiene(n) hasta 18 mutaciones, de la manera más adecuada sustituciones, con respecto a SEQ ID NO: 1. Por ejemplo (3 – novedoso y Tf reducida):

15

MIPGGLSEAK PX1TPEX2QEIX3 DKVKPX4LEEK X5X6EX7YGKX8EX9  
VX10YKTQVX11AG X12NYX13IKVRAXX14 X15X16KYMHLKVF KSLPGQNE~~DL~~  
 VLX17GYX18V~~DKN~~ K~~DEL~~TGF

X1 en el que el tipo natural es A y las mutaciones son I, V

20

X2 en el que el tipo natural es I y las mutaciones son L

X3 en el que el tipo natural es V y las mutaciones son I, L

X4 en el que el tipo natural es Q y las mutaciones son E

25

X5 en el que el tipo natural es T y las mutaciones son K

X6 en el que el tipo natural es N y las mutaciones son D, H

30

X7 en el que el tipo natural es T y las mutaciones son D, P

X8 en el que el tipo natural es L y las mutaciones son A, V

X9 en el que el tipo natural es A y las mutaciones son I, V

35

X10 en el que el tipo natural es Q y las mutaciones son D

X11 en el que el tipo natural es V y las mutaciones son E, G, A

40

X12 en el que el tipo natural es T y las mutaciones son A

(X3, X8) en los que el tipo natural es (V, L) y las mutaciones son (I, A), (L, A), (I, V), (L, V)

(X13, X17, X18) en los que el tipo natural es (Y, T, Q) y las mutaciones son (D, D, E)

45

(X14, X15, X16) en los que el tipo natural es (G, D, N) y las mutaciones son (P, Δ, P), (P, P, K), (P, Δ, G), (P, G, K)

(X15, X16) en los que el tipo natural es (D, N) y las mutaciones son (N, K)

50

(X17, X18) en los que el tipo natural es (T, Q) y las mutaciones son (D, E).

Por tanto, en una realización, la invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a polipéptido(s) que tiene(n) hasta 28 mutaciones, de la manera más adecuada sustituciones, con respecto a SEQ ID NO: 1, de manera adecuada junto con inserción de péptido heterólogo en el que dicha inserción de péptido heterólogo comprende un péptido heterólogo insertado en una de las siguientes posiciones con respecto a SEQ ID NO: 1:

55

d) 48-<péptido heterólogo>-50,

e) 49-<péptido heterólogo>-51,

60

f) 50-<péptido heterólogo>-52,

g) 72-<péptido heterólogo>-77,



r) 73-<péptido heterólogo>-78; o

s) 74-<péptido heterólogo>-79. Por ejemplo (9 – Tf aumentada o reducida):

- 5 MIPGGLSEAK PX1TPEX2QEIX3 DKVKPX4LEX5X6 X7X8X9X10YGKX11EX12  
VX13YKX14QVX15AX16 X17NYX18IKVRX19X20 X21X22X23YX24HX25KVF  
KSLPGQNEDL VLX26GYX27VDKX28 KDELTGF
- X1 en el que el tipo natural es A y las mutaciones son I, V
- 10 X2 en el que el tipo natural es I y las mutaciones son D
- X3 en el que el tipo natural es V y las mutaciones son A, I, L
- X4 en el que el tipo natural es Q y las mutaciones son E
- 15 X5 en el que el tipo natural es E y las mutaciones son M
- X7 en el que el tipo natural es T y las mutaciones son K
- 20 X8 en el que el tipo natural es N y las mutaciones son G, D, H
- X10 en el que el tipo natural es T y las mutaciones son V, R, K, D, P
- X11 en el que el tipo natural es L y las mutaciones son A, V, F
- 25 X12 en el que el tipo natural es A y las mutaciones son I, V
- X13 en el que el tipo natural es Q y las mutaciones son E, D
- 30 X14 en el que el tipo natural es T y las mutaciones son I, V
- X15 en el que el tipo natural es V y las mutaciones son E, D, G, A, L
- X16 en el que el tipo natural es G y las mutaciones son S
- 35 X17 en el que el tipo natural es T y las mutaciones son F, V, L, I, A
- X19 en el que el tipo natural es A y las mutaciones son L, I, V
- 40 X21 en el que el tipo natural es D y las mutaciones son  $\Delta$
- X23 en el que el tipo natural es K y las mutaciones son R
- X24 en el que el tipo natural es M y las mutaciones son V, I
- 45 X25 en el que el tipo natural es L y las mutaciones son I
- X28 en el que el tipo natural es N y las mutaciones son T
- 50 (X3, X11) en los que el tipo natural es (V, L) y las mutaciones son (I, A), (L, A), (I, V), (L, V)
- (X5, X6, X9) en los que el tipo natural es (E, K, E) y las mutaciones son (K, E, K)
- (X18, X26, X27) en los que el tipo natural es (Y, T, Q) y las mutaciones son (D, D, E)
- 55 (X19, X20, X21, X22) en los que el tipo natural es (A, G, D, N) y las mutaciones son (L, N, G, K), (L, N,  $\Delta$ , G), (V, N, G, K), (I, N, G, K), (I, N,  $\Delta$ , G), (V, N,  $\Delta$ , G)
- (X19, X21, X22) en los que el tipo natural es (A, D, N) y las mutaciones son (V, N, K)
- 60 (X20, X21, X22) en los que el tipo natural es (G, D, N) y las mutaciones son (N, G, K), (N,  $\Delta$ , G), (P,  $\Delta$ , P), (P, P, K), (P,  $\Delta$ , G), (P, G, K)

(X19, X21) en los que el tipo natural es (A, D) y las mutaciones son (V, Δ)

(X21, X22) en los que el tipo natural es (D, N) y las mutaciones son (N, K)

5 (X26, X27) en los que el tipo natural es (T, Q) y las mutaciones son (D, E).

De manera adecuada, cuando se considera la identidad de secuencia, no se consideran los aminoácidos marcados como "X"; de manera adecuada la identidad de secuencia se evalúa a través de los residuos de aminoácido especificados o definidos como anteriormente (es decir, los residuos distintos de X).

10 En caso de requerirse cualquier orientación adicional, para evaluar la identidad de secuencia cuando la secuencia de referencia tiene residuos variables (por ejemplo, "X") en la misma, la identidad de secuencia se calcula usando el servidor Protein BLAST de NIH (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La secuencia de consulta es la secuencia de referencia de aminoácidos con todas las X (Xn) retiradas. La secuencia objeto es la secuencia de interés que va a compararse con la secuencia de consulta con residuos equivalentes retirados. Entonces se ejecuta el análisis y se toma el valor de Ident como resultado.

Por ejemplo:

20 se alinea la secuencia de hSteA que contiene X1 - X25 (secuencia de referencia) con la secuencia de interés, en este ejemplo SteA canina (cSteA):

hSteA (SEQ ID NO: 1)

MIPGGLSEAKPX1TPEX2QEIX3DKVKPX4LEX5X6X7X8X9X10YGKX11EX12VX13YKX14QVX15AGX16

25 NYX17IKVRX18X19X20X21KYX22HX23KVFSLPGQNEDLVX24GYX25VDKNKDELTGF

cSteA (SEQ ID NO: 3)

MMPGGLTEAKPA TPEV QEIA NEVKPQ LEE K T N E T YQEF EA VE YKT QVV AGI NYY IKVRV G

30 D N SYI HL KIFKGLPGQNPTLTLT GYQ TDKSKDELTGF

Se retiran todos los Xn, al igual que los residuos correspondientes en la secuencia de interés cSteA:

hSteA – Secuencia de consulta

MIPGGLSEAKPTPEQEIDKVKPLEYKGVEYKQVAGNYIKVRKYHKVFKSLPGQNEDLVLGVDKNKDELTG

35 F

cSteA – Secuencia objeto

MMPGGLTEAKPTPEQEINEVKPLEYQEEYKQVAGNYIKVRSYHKIFKGLPGQNPTLTLTGYTDKSKDELTG

40 F

Esta secuencia de consulta y secuencia objeto se comparan usando Protein BLAST. El resultado es que estas secuencias tienen 59 de 73 residuos idénticos, dando el 81 % de identidad de secuencia.

45 De manera similar, cuando una secuencia de interés tiene "huecos" o truncamientos, por ejemplo es más corta que la secuencia de referencia tal como SEQ ID NO: 1, tales huecos o truncamientos se evalúan mediante la comparación de secuencias y contribuyen a un valor de identidad de secuencia correspondientemente más bajo. Con respecto a esto, la identidad de secuencia debe evaluarse de manera adecuada a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 1. Por convenio, puede compararse una secuencia más corta con la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 1) únicamente a lo largo de la longitud de la secuencia de interés más corta. Sin embargo, a menos que resulte evidente lo contrario a partir del contexto, la discusión / determinación de identidad de secuencia (y valores de identidad de secuencia mencionados en el presente documento) tratan de manera adecuada los truncamientos como "huecos". Por dar un ejemplo práctico, si una secuencia de interés sólo tiene 49 aminoácidos de longitud y se compara con SEQ ID NO: 1 (que tiene 98 aminoácidos de longitud) entonces la puntuación de identidad de secuencia máxima será del 50 % (y cualquier sustitución con respecto a SEQ ID NO: 1 reducirá adicionalmente la puntuación de identidad de secuencia). Por tanto, una puntuación de identidad de secuencia para un polipéptido de interés en comparación con SEQ ID NO: 1 del 50 % implica la presencia de al menos 49 residuos de aminoácido en el polipéptido de interés, 49 de los cuales son idénticos a sus residuos correspondientes en SEQ ID NO: 1.

60 De manera adecuada, cuando un residuo no está mutado como anteriormente, es "de tipo natural" como anteriormente. Dicho de otro modo, de manera adecuada cuando un residuo no está mutado como anteriormente, es

tal como se muestra en hSteA (SEQ ID NO: 1).

#### Identidad de secuencia

Para precisión, se han comentado relaciones de secuencias en cuanto a sustituciones con respecto a SEQ ID NO: 1 (estefina A humana de tipo natural). Sin embargo, puede desearse considerar las relaciones de secuencias en cuanto a la identidad de secuencia.

Pueden llevarse comparaciones de secuencias a simple vista o, más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles para el público y comercialmente pueden calcular el porcentaje de homología (tal como porcentaje de identidad) entre dos o más secuencias.

El porcentaje de identidad puede calcularse a lo largo de secuencias contiguas, es decir, se alinea una secuencia con la otra secuencia y se compara directamente cada aminoácido en una secuencia con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se denomina alineación "sin huecos". Normalmente, tales alineaciones sin huecos sólo se realizan a lo largo de un número relativamente corto de residuos (por ejemplo, menos de 50 aminoácidos contiguos).

Aunque esto es un método muy sencillo y sistemático, no logra tener en cuenta que, por ejemplo en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o delección provocará que los siguientes residuos de aminoácido queden desalineados, dando por tanto posiblemente una gran reducción en el porcentaje de homología (porcentaje de identidad) cuando se realiza una alineación global (una alineación a lo largo de toda la secuencia). Por consiguiente, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineaciones óptimas que tienen en cuenta posibles inserciones y delecciones sin penalizar excesivamente la puntuación de homología (identidad) global. Esto se logra insertando "huecos" en la alineación de secuencias para intentar maximizar la homología/identidad local.

Estos métodos más complejos asignan "penalizaciones de hueco" a cada hueco que se produce en la alineación de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de secuencias con los menos huecos posibles (que refleja una relación superior entre las dos secuencias comparadas) logrará una puntuación superior a una con muchos huecos. Normalmente se usan "costes de huecos afines" que cargan un coste relativamente alto por la existencia de un hueco y una penalización menor por cada residuo posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más habitualmente usado. Evidentemente, altas penalizaciones de hueco producirán alineaciones optimizadas con menos huecos. La mayoría de los programas de alineación permiten modificar las penalizaciones de hueco. Sin embargo, se prefiere usar los valores por defecto cuando se usa tal software para comparaciones de secuencias. Por ejemplo, cuando se usa el paquete GCG Wisconsin Bestfit (véase a continuación) la penalización de hueco por defecto para secuencias de aminoácidos es de -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

Por tanto, el cálculo del porcentaje de homología máximo requiere en primer lugar la producción de una alineación óptima, teniendo en cuenta penalizaciones de hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo una alineación de este tipo es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Universidad de Wisconsin, EE. UU.; Devereux *et al.*, 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Los ejemplos de otros software que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen el, pero no se limitan al, paquete BLAST, FASTA (Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410) y la serie GENEWORKS de herramientas de comparación.

Aunque el porcentaje de homología final puede medirse en cuanto a la identidad, el propio procedimiento de alineación normalmente no se basa en una comparación por parejas de todo o nada. En vez de eso, generalmente se usa una matriz de puntuación de similitud ajustada a escala que asigna puntuaciones a cada comparación por parejas basándose en similitud química o distancia evolutiva. Un ejemplo de una matriz de este tipo habitualmente usada es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto para la serie de programas BLAST. Los programas de GCG Wisconsin generalmente usan o bien los valores por defecto públicos o bien una tabla de comparaciones de símbolos personalizada si se suministra. Se prefiere usar los valores por defecto públicos para el paquete de GCG, o, en el caso de otro software, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62. Una vez que el software ha producido una alineación óptima, es posible calcular el porcentaje de homología, preferiblemente el porcentaje de identidad de secuencia. El software normalmente hace esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

El polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones tiene al menos el 80 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO: 1, de manera más adecuada el 85 %, de manera más adecuada el 88 %, de manera más adecuada el 90 %, de manera más adecuada el 92 %, de manera más adecuada el 94 %, de manera más adecuada el 95 %, de manera más adecuada el 96 %, de manera más adecuada el 97 %, de manera más adecuada el 98 %, de manera más adecuada el 99 % de identidad con respecto a SEQ ID NO: 1.

De manera adecuada, cualquier inserción de péptido heterólogo se excluye de los cálculos de porcentaje de

identidad.

En una realización, de manera adecuada las sustituciones y cualquier inserción de péptido heterólogo son tal como se definen, y la identidad de secuencia se evalúa con respecto a la secuencia de “fondo” o de “estructura principal” restante del polipéptido en comparación con los residuos correspondientes de SEQ ID NO: 1.

En todas las discusiones de identidad de secuencia, se observará que la SEQ ID NO: 1 tiene 98 aminoácidos de longitud. Por tanto, cada sustitución individual es equivalente a un cambio del 1,020408 % en la identidad si se consideran los 98 aminoácidos. Los valores anteriores se facilitan redondeados al punto de porcentaje entero más próximo y deben entenderse en consecuencia dado que no es posible sustituir aminoácidos parciales dentro de una secuencia de polipéptido. Evidentemente, cuando se consideran menos de 98 aminoácidos (por ejemplo, cuando se considera la identidad de secuencia con respecto a los residuos de SEQ ID NO: 1 que son distintos de los que se menciona específicamente que están sustituidos cuando se define el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones que están considerándose) entonces cada sustitución de aminoácido individual puede corresponder a un cambio de más del 1,020408 % en la identidad; el lector experto puede interpretar los valores en consecuencia dado que no es posible sustituir aminoácidos parciales dentro de una secuencia de polipéptido.

En caso de necesitarse cualquier orientación adicional, la siguiente tabla muestra cómo varía el valor de porcentaje de identidad de secuencia teniendo en cuenta el número de residuos comparados y el número de sustituciones de aminoácido realizadas dentro de ese número de residuos comparados. Cualquier valor adicional fuera de los ejemplos en la tabla puede calcularse fácilmente por el experto.

Valores de porcentaje de identidad de secuencia									
aminoácidos totales comparados	número de sustituciones								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	%	%	%	%	%	%	%	%	%
98	98,98	97,96	96,94	95,92	94,90	93,88	92,86	91,84	90,82
97	98,97	97,94	96,91	95,88	94,85	93,81	92,78	91,75	90,72
96	98,96	97,92	96,88	95,83	94,79	93,75	92,71	91,67	90,63
95	98,95	97,89	96,84	95,79	94,74	93,68	92,63	91,58	90,53
94	98,94	97,87	96,81	95,74	94,68	93,62	92,55	91,49	90,43
93	98,92	97,85	96,77	95,70	94,62	93,55	92,47	91,40	90,32
92	98,91	97,83	96,74	95,65	94,57	93,48	92,39	91,30	90,22
91	98,90	97,80	96,70	95,60	94,51	93,41	92,31	91,21	90,11
90	98,89	97,78	96,67	95,56	94,44	93,33	92,22	91,11	90,00
89	98,88	97,75	96,63	95,51	94,38	93,26	92,13	91,01	89,89
88	98,86	97,73	96,59	95,45	94,32	93,18	92,05	90,91	89,77
87	98,85	97,70	96,55	95,40	94,25	93,10	91,95	90,80	89,66
86	98,84	97,67	96,51	95,35	94,19	93,02	91,86	90,70	89,53
85	98,82	97,65	96,47	95,29	94,12	92,94	91,76	90,59	89,41
84	98,81	97,62	96,43	95,24	94,05	92,86	91,67	90,48	89,29
83	98,80	97,59	96,39	95,18	93,98	92,77	91,57	90,36	89,16
82	98,78	97,56	96,34	95,12	93,90	92,68	91,46	90,24	89,02
81	98,77	97,53	96,30	95,06	93,83	92,59	91,36	90,12	88,89
80	98,75	97,50	96,25	95,00	93,75	92,50	91,25	90,00	88,75
79	98,73	97,47	96,20	94,94	93,67	92,41	91,14	89,87	88,61
78	98,72	97,44	96,15	94,87	93,59	92,31	91,03	89,74	88,46

Cuando se facilita un valor de identidad de secuencia de aminoácidos para un polipéptido particular, el lector experto será consciente de que este polipéptido particular también puede comprender una inserción de péptido heterólogo, y esto debe tenerse en cuenta cuando se evalúa la identidad de secuencia. De manera adecuada, la identidad de secuencia se evalúa a lo largo de los residuos de aminoácido correspondientes a aquellos en la secuencia de estefina A de tipo natural de SEQ ID NO: 1. Dicho de otro modo, de manera adecuada la evaluación de la identidad de secuencia no incluye inserciones de péptido heterólogo (o ausencia de inserciones) sino que se considera a lo largo de los aminoácidos correspondientes a los presentes en SEQ ID NO: 1.

En una realización, de manera más adecuada se considera la identidad de secuencia a lo largo de los aminoácidos correspondientes a los presentes en SEQ ID NO: 1 pero excluyendo cualquier inserción de péptido heterólogo y excluyendo cualquier sustitución ya definida en la reivindicación que está considerándose.

De la manera más adecuada, el porcentaje de identidad de secuencia se calcula para residuos de aminoácido excluyendo los sustituidos por motivos de estabilidad térmica.

Para algunas aplicaciones, por ejemplo para aplicaciones terapéuticas pretendidas, es deseable minimizar el número de mutaciones en el polipéptido/proteína de andamiaje usado. Por tanto, en algunas realizaciones, de

manera adecuada el polipéptido/proteína de andamiaje comprende cinco o menos mutaciones en comparación con estefina A humana de tipo natural, de manera adecuada cuatro o menos, de manera adecuada tres o menos, de manera adecuada dos o menos mutaciones. En este contexto, "mutaciones" se refiere a mutaciones puntuales, o inserción o delección de un pequeño número tal como cinco o menos aminoácidos. La inserción de péptidos heterólogos en el polipéptido/proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones se comenta por separado. La inserción de uno o más péptidos heterólogos no se cuenta como una "mutación" en este contexto. De la manera más adecuada, mutación/mutaciones significa sustitución/sustituciones.

Debe observarse que el patrón en la técnica es la proteína de andamiaje de SQT tal como se comenta en el documento WO 2009/136182. Tiene una baja estabilidad térmica/Tf de 64,6 °C. De manera adecuada, el andamiaje de SQT es un andamiaje que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 24 del documento WO 2009/136182 (SQT): MIPRGLSEAK PATPEIQEIV DKVKPQLEEK TNETYGKLEA VQYKTQVLAS TNYYIKVRAG DNKYMHLKVF NGPPGQNADR VLTGYQVDKN KDELDTGF.

Por tanto, realizaciones de la invención tal como se define en las reivindicaciones muestran ventajas significativas en comparación con el andamiaje de SQT de la técnica anterior. Sin embargo, debe observarse que valores comparativos expresados en el presente documento son con respecto a estefina A de tipo natural a menos que resulte evidente lo contrario a partir del contexto. Por tanto, es posible tener un polipéptido/proteína de andamiaje tal como se divulga en el presente documento que tiene una Tf reducida (inferior) en comparación con estefina A de tipo natural, pero que no obstante ofrece la ventaja de una Tf mejorada (superior) con respecto a SQT. Todos los valores se expresan con respecto a estefina A de tipo natural (a menos que resulte evidente lo contrario a partir del contexto) por facilidad de comprensión y sistematicidad, pero las ventajas de la invención tal como se define en las reivindicaciones pueden obtenerse modulando la Tf ya sea la Tf resultante superior o inferior a la de estefina A de tipo natural. La Tf deseada por el operario de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede ser superior o inferior a la de estefina A de tipo natural. La ventaja clave es que ahora el lector experto puede alterar/modular la Tf del polipéptido/proteína de andamiaje tal como se enseña en el presente documento.

El andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones tiene una Tf superior a SQT, es decir superior a 64,6 °C. De la manera más adecuada, el andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones tiene una Tf superior a estefina A de tipo natural, es decir superior a 89,0 °C.

Una ventaja de la invención tal como se define en las reivindicaciones es que se proporciona un polipéptido/proteína de andamiaje que es biológicamente neutro.

Una ventaja de la invención tal como se define en las reivindicaciones es que se proporciona un polipéptido/proteína de andamiaje que carece de sitios de glicosilación.

Una ventaja de la invención tal como se define en las reivindicaciones es que se proporcionan polipéptidos/proteínas de andamiaje con propensión reducida o mejorada a la dimerización. Esto resulta ventajoso porque la dimerización puede cambiar la farmacocinética cuando el andamiaje es un fármaco. Esto también resulta ventajoso porque la dimerización puede afectar a la afinidad y, por tanto, puede afectar a la interacción con la diana. Esto también resulta ventajoso porque la dimerización puede afectar a la inmunogenicidad. La dimerización también puede cambiar el efecto de determinadas moléculas de agonista a antagonista (o viceversa). Además, en algunos casos la dimerización puede fomentar formaciones de estructuras de orden superior e inestabilidad a lo largo del tiempo. Además, hay ciertas ventajas en tener monómeros (es decir, reducir la dimerización), por ejemplo los monómeros son pequeños (por ejemplo, mejorando la penetración tumoral).

Evidentemente, si el operario experto desea dímeros, entonces pueden tratarse residuos de dimerización en consecuencia, por ejemplo conservarse como tipo natural tal como V48, para permitir/fomentar la dimerización por intercambio de dominio si se considera que esto es ventajoso para aplicaciones particulares.

#### Inserciones de péptido heterólogo

De manera adecuada, el péptido heterólogo comprende 36 aminoácidos o menos, de manera más adecuada 20 aminoácidos o menos, de manera más adecuada 12 aminoácidos o menos.

De manera adecuada, el péptido heterólogo comprende 3 aminoácidos o más, de manera más adecuada 12 aminoácidos o más, de manera más adecuada 20 aminoácidos o más, de manera más adecuada hasta 36 aminoácidos.

De manera adecuada, el péptido heterólogo comprende de 3 a 36 aminoácidos, de manera más adecuada de 3 a 20 aminoácidos, de manera más adecuada de 3 a 12 aminoácidos, de manera más adecuada de 3 a 9 aminoácidos, de manera más adecuada de 6 a 36 aminoácidos, de manera más adecuada de 6 a 20 aminoácidos, de manera más adecuada de 6 a 12 aminoácidos, de manera más adecuada de 6 a 9 aminoácidos, de la manera más adecuada 9 aminoácidos.

Una ventaja de la invención tal como se define en las reivindicaciones es que se observa un pequeño aumento de la estabilidad térmica cuando se incluyen inserciones de péptido heterólogo en el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones tal como se enseña en el presente documento.

## 5 Ubicación de Inserciones de péptido heterólogo

Puede insertarse una secuencia de péptido heterólogo entre los aminoácidos 46 a 54 incluidos (por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 2006/131749 (que describe andamiajes tales como "STM") o por ejemplo el documento WO 2009/136182 (que describe andamiajes tales como "SQT")), de manera más adecuada entre los aminoácidos 46 a 50 incluidos, de manera más adecuada entre los aminoácidos 48 a 50 incluidos. En este contexto "entre...incluidos" significa que los aminoácidos indicados pueden delecionarse a favor de la inserción de péptido heterólogo, es decir que cualquiera o la totalidad del/de los aminoácido(s) de (por ejemplo) 46-54 puede delecionarse y añadirse la inserción de péptido heterólogo en su lugar. Por tanto, una inserción que deleciona los aminoácidos 46-54 y los sustituye queda abarcada por la expresión "entre los aminoácidos 46 a 54". No hay ningún requisito para conservar el aminoácido 46 y el aminoácido 54, el péptido se inserta entre esas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 1 en vez de requerir la presencia real del aminoácido 46 y el aminoácido 54 para estar "entre" los mismos. Cuando se delecionan todos los aminoácidos 46-54, esto puede representarse como "45-<péptido heterólogo>-55".

Puede insertarse una secuencia de péptido heterólogo entre los aminoácidos 67 a 84 incluidos. Puede insertarse una secuencia de péptido heterólogo entre los aminoácidos 71 a 73 incluidos. Puede insertarse una secuencia de péptido heterólogo entre los aminoácidos 82 a 83 incluidos. El sitio "Leu 73" es un sitio de inserción para péptidos heterólogos (algunas veces denominados "péptidos diana"). Esto representa un bucle expuesto a disolvente de la proteína de estefina A, y, por tanto, es propenso a la presentación de péptidos diana de una manera accesible para disolvente. El término "inserción de Leu73" se usa en el presente documento para describir la inserción de un péptido heterólogo cerca de, o de manera adecuada en (por ejemplo, dentro de), el bucle L73-L80 de SteA humana. El término puede referirse a adición/adiciones a, o inserción/inserciones en, o sustitución de, Leu 80 de estefina A humana. De manera más adecuada, el término se refiere a adición/adiciones a, o inserción/inserciones en, o sustitución de, Leu 73 de estefina A humana. En una realización, la mutación Leu73 puede comprender la sustitución de todo el bucle entre L73 y L80 con una secuencia de péptido heterólogo. Puede insertarse una secuencia de péptido heterólogo entre los aminoácidos 73 a 80 incluidos.

Por ejemplo, pueden realizarse inserciones como esta (usando la secuencia de SQT como ejemplo):

MIPRGLSEAK PATPEIQEIV DKVKPQLEEK TNETYGKLEA VQYKTQVLA[secuencia de péptido heterólogo en el bucle 2]S TNYIKVRAG DNKYMHLKVF NGP[secuencia de péptido heterólogo en el bucle 4] [ΔPGQN]ADR VLTGYQVDKN KDDELTF

Por tanto, de manera adecuada, el bucle 2 tiene una secuencia de péptido heterólogo insertada entre 49 y 50 (49-<péptido heterólogo>-50) y el bucle 4 tiene una secuencia de péptido heterólogo insertada entre 73 y 78 dado que se sustituyen los residuos 74-77 (73-<péptido heterólogo>-78).

Puede insertarse una secuencia de péptido heterólogo en el sitio G4. Puede insertarse una secuencia de péptido heterólogo en la posición 4. Puede insertarse una secuencia de péptido heterólogo de manera proximal a la posición 4, es decir entre la posición 4 y el centro del polipéptido tal como entre los aminoácidos 4 a 45 incluidos, o entre los aminoácidos 4 a 44 incluidos. De manera adecuada, se conserva el residuo G4. De la manera más adecuada, se muta el residuo G4 para dar G4R. Por tanto, de manera adecuada puede insertarse una secuencia de péptido heterólogo entre los aminoácidos 5 a 45 incluidos, o entre los aminoácidos 5 a 44 incluidos. De manera más adecuada, puede insertarse una secuencia de péptido heterólogo entre los aminoácidos 4 y 5 incluidos, de la manera más adecuada inmediatamente después del aminoácido 4, por ejemplo inserción en la posición 5.

Puede(n) insertarse péptido(s) heterólogo(s) en al menos una de las siguientes posiciones en la proteína (véase, por ejemplo, el documento WO2014/125290 (que describe andamiajes tales como "adhirones vegetales")): el bucle entre una primera y segunda cadena de lámina β (algunas veces conocido como bucle 1); y/o el bucle entre una tercera y cuarta cadena de lámina β (algunas veces conocido como bucle 2). En este contexto, primera, segunda, tercera y cuarta significan con respecto a la secuencia de proteína, es decir desde el extremo N hasta el C-terminal de la proteína. De manera adecuada, se insertan péptidos heterólogos en ambas de estas posiciones, es decir en el bucle 1 y el bucle 2.

## 60 *Nomenclatura de bucles*

La estructura secundaria del polipéptido/proteína de andamiaje puede modelarse usando software de código abierto, de la manera más adecuada usando "PPopen" disponible de la Universidad técnica de Múnich, Alemania. La numeración de estructuras tales como bucles en el polipéptido/proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones respeta la nomenclatura sistemática usando el software PPopen.

Debe observarse que los documentos de la técnica anterior han usado una nomenclatura informal. Por tanto, divulgaciones en documentos de la técnica anterior tales como el documento WO 2006/131749 y/o el documento WO 2009/136182 y/o el documento WO2014/125290 pueden mencionar el nombre informal "bucle 1", que se referirá en realidad al "bucle 2" usando la nomenclatura sistemática mediante el software POpen. La siguiente tabla establece la nomenclatura de las diferentes partes estructurales de la proteína, y se respetará esto a lo largo de todo el texto a menos que se indique lo contrario.

A menos que resulte evidente lo contrario a partir del contexto, se respeta la siguiente nomenclatura de bucles. Los números de residuos de aminoácido son como en, o corresponden a, SEQ ID NO: 1:

Nombre	Dirección de aminoácido (SEQ ID NO: 1)
Extremo N-terminal	1 - 13
Hélice 1	14 - 30
Bucle 1	31 - 37
Cadena 1	38 - 48
Bucle 2	49 - 51
Cadena 2	52 - 59
Bucle 3	60 - 62
Cadena 3	63 - 70
Bucle 4	71 - 78
Cadena 4	79 - 85
Extremo C-terminal	86 - 98 (sin incluir la etiqueta GH6)

Tal como se usa en este caso, el término "bucle" significa "estructura secundaria regular de conexión" (es decir, alfa/beta).

Ocasionalmente se usa una nomenclatura informal para referirse a realizaciones particulares de la invención tal como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, un andamiaje preferido puede denominarse "3 T" o "3 R". La constitución particular de realizaciones preferidas de la invención tal como se define en las reivindicaciones siempre se divulga con referencia específica a residuos mutados tal como se expone en el texto.

De manera adecuada, se crea una población de polipéptidos de andamiaje, cada uno con una secuencia de péptido heterólogo diferente (de la manera más adecuada, una por cada polipéptido de andamiaje), es decir, una biblioteca.

"Heterólogo" tiene su significado natural, es decir, el polipéptido insertado tiene una secuencia de aminoácidos que es heteróloga con respecto a la secuencia de estefina A usada, por ejemplo, la secuencia derivada de o correspondiente a SEQ ID NO: 1. Por tanto, heterólogo puede significar de otra especie, y/o puede significar de un polipéptido distinto de estefina A de tipo natural humana (SEQ ID NO: 1). De la manera más adecuada, la inserción de polipéptido heterólogo comprende una secuencia de aminoácidos artificial, de la manera más adecuada una secuencia de aminoácidos artificial diseñada por el operario.

Pueden usarse inserciones de péptido heterólogo de prueba, por ejemplo pueden usarse repeticiones de GGS tales como un péptido noamérico que comprende GGSGGSGGS. Esto es un péptido particularmente exigente porque es entrópicamente muy difícil de cerrar. Por tanto, insertando esto como péptido heterólogo en un polipéptido/proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones se demuestra que el andamiaje funciona muy bien para presentar tal bucle soluble y entrópicamente difícil de cerrar. La capacidad para presentar tal bucle es un indicador muy fuerte de la estabilidad del polipéptido/proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

#### *Sitios especialmente adecuados para la inserción de péptido heterólogo*

Debe observarse que los sitios más preferidos para la inserción de péptido heterólogo en los polipéptidos/proteínas de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones son en sí mismos diferentes de los sitios divulgados para la inserción en divulgaciones de la técnica anterior de polipéptidos/proteínas de andamiaje basados en estefina A.

Inserciones individuales - Bucle 2

48-<péptido heterólogo>-50

49-<péptido heterólogo>-51

50-<péptido heterólogo>-52

Inserciones individuales - Bucle 4

72-<péptido heterólogo>-77

73-<péptido heterólogo>-78

74-<péptido heterólogo>-79

Para evitar cualquier duda, "48-<péptido heterólogo>-50" significa entre el aminoácido correspondiente a la posición 48 de SEQ ID NO: 1 y el aminoácido correspondiente a la posición 50 de SEQ ID NO: 1, y así sucesivamente. De manera similar, "72-<péptido heterólogo>-77" significa entre el aminoácido correspondiente a la posición 72 de SEQ ID NO: 1 y el aminoácido correspondiente a la posición 77 de SEQ ID NO: 1 (delecionándose con los aminoácidos intermedios (es decir, sustituyéndose por la inserción de péptido heterólogo)), y así sucesivamente.

Combinaciones – inserciones dobles

Pueden realizarse combinaciones de dos inserciones, una en el bucle 2 y una en el bucle 4, tal como se divulga en la figura 1.

Combinaciones adicionales

Además de los ejemplos de inserciones específicos mencionados anteriormente, pueden combinarse inserciones individuales o inserciones dobles con una inserción adicional en el extremo N-terminal de la proteína, por ejemplo en o de manera proximal al sitio G4 tal como se divulgó anteriormente, realizando de ese modo inserciones dobles (sitio G4 + bucle 2 o sitio G4 + bucle 4) o inserciones triples (sitio G4 + bucle 2 + bucle 4) según se desee.

De la manera más adecuada, se inserta un péptido heterólogo entre los residuos D48 y G50, delecionando el residuo A49 (denominado "48-<péptido heterólogo>-50").

De la manera más adecuada, se inserta un péptido heterólogo entre los residuos L73 y E78, delecionando los residuos P74, G75, Q76 y N77 (denominado "73-<péptido heterólogo>-78").

De la manera más adecuada, se realiza una inserción doble insertando un primer péptido heterólogo en 48-<primer péptido heterólogo>-50 y un segundo péptido heterólogo en 73-<segundo péptido heterólogo>-78.

De manera adecuada, el primer y segundo péptidos heterólogos son diferentes uno de otro.

De manera adecuada, el primer y segundo y tercer péptidos heterólogos son diferentes unos de otros.

A continuación se presentan secuencias a modo de ejemplo que muestran inserciones a modo de ejemplo (X=cualquier aminoácido; en estos ejemplos, las inserciones de péptido heterólogo tienen 9 aminoácidos de longitud):

andamiaje a modo de ejemplo 3r2

MIPGGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEKETGKTWGLEAVEYKTQVD48XXXXXXXXXXG50LNYIKVRVN-  
GKYIHLKVFksL73XXXXXXXXXE78DLVLTGYQVDKNKDELDTGF

andamiaje a modo de ejemplo 3t4

MIPGGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEKETGETYGKLEAVEYKTQVD48XXXXXXXXXXG50TNYIKVRAGD  
NKYIHLKVFksL73XXXXXXXXXE78DLVLTGYQVDKNKDELDTGF

Los puntos de inserción preferidos específicos enseñados en el presente documento proporcionan ciertas ventajas adicionales. Estas ventajas pueden atribuirse a la elección del sitio de inserción y, por tanto, pueden emplearse ventajosamente en polipéptidos/proteínas de andamiaje que tienen mutaciones diferentes de las divulgadas en el presente documento. Dicho de otro modo, la divulgación de los sitios de inserción específicos realizada en este documento es una divulgación diferenciada de una propiedad ventajosa proporcionada por una característica técnica. Por tanto, en un aspecto la invención tal como se define en las reivindicaciones puede referirse a un polipéptido/proteína de andamiaje tal como un polipéptido/proteína de andamiaje basado en estefina A que tiene un péptido heterólogo (o péptidos heterólogos) insertado en la posición (o posiciones) específicas tal como se divulga en el presente documento. Por ejemplo, pueden realizarse inserciones individuales - bucle 2: 48-<péptido heterólogo>-50; 49-<péptido heterólogo>-51; 50-<péptido heterólogo>-52; Inserciones individuales - bucle 4 - 72-<péptido heterólogo>-77; 73-<péptido heterólogo>-78; 74-<péptido heterólogo>-79; combinaciones - inserciones dobles - combinaciones de dos inserciones, una en el bucle 2 y una en el bucle 4, tal como se divulga en la figura 1.



Maduración por afinidad

Puede llevarse a cabo maduración por afinidad mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, puede construirse una "mini-biblioteca" manteniendo un péptido heterólogo de un agente de unión de interés constante mientras que sólo se hace variar la segunda inserción de péptido heterólogo o inserción/inserciones de péptido heterólogo adicionales.

Otro enfoque es realizar un barrido de alanina de las inserciones de péptido heterólogo con el fin de identificar el/los aminoácido(s) que es/son más importante(s) para la interacción con la diana.

Un enfoque alternativo es llevar a cabo "PCR resbaladiza" y volver a examinar las variantes resultantes de la(s) inserción/inserciones de péptido heterólogo con respecto a la diana.

En la estefina A de tipo natural, se entiende que una de sus parejas de unión (catepsina) se une mediante los tres bucles en la superficie relevante de la molécula de estefina A. Por tanto, otro enfoque para la maduración por afinidad es introducir péptido heterólogo en la tercera posición (la región que comprende el residuo G4 de la estefina A) en el extremo N-terminal de la proteína y volver a examinar las proteínas de andamiaje que portan ese conjunto de péptidos heterólogos con respecto a la diana.

Tal como se describe en el presente documento, "d" significa "delección de" (por ejemplo, "dD61" significa "delección de D61") esto se muestra habitualmente como "ΔD61" (es decir, delta D61), tal como resulta habitual en la técnica. La numeración de residuos sigue siempre SteA de tipo natural humana, es decir SEQ ID NO: 1.

Dicho de otro modo, cuando se realiza una mutación de delección en un polipéptido/proteína de andamiaje según la invención tal como se define en las reivindicaciones, entonces todavía se respeta la numeración según la proteína de estefina A de tipo natural humana. Por ejemplo, si se deleciona el aminoácido 61, la numeración de esa realización particular de un polipéptido/proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones pasará desde el aminoácido 60 directamente hasta el aminoácido 62, dicho de otro modo, se conserva la numeración de aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia de estefina A de tipo natural humana en vez de ajustarse al número consecutivo de cada uno de los aminoácidos presentes en la realización particular preferida del polipéptido/proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones. Esto resulta convencional y lo entiende fácilmente el experto en la técnica tal como resulta normal en el campo de la biología molecular.

Debe observarse que se divulgan múltiples sitios de inserción para péptidos heterólogos. Por tanto, el polipéptido/proteína de andamiaje puede comprender una única inserción de péptido heterólogo, puede comprender dos inserciones de péptido heterólogo en dos sitios de inserción diferentes (es decir, una única inserción en un primer y un segundo sitio representando en total dos inserciones de péptido heterólogo en total), o puede comprender tres inserciones de péptido heterólogo en tres sitios de inserción diferentes (es decir, una única inserción en un primer, segundo y tercer sitio representando en total tres inserciones de péptido heterólogo en total). Bibliotecas que comprenden polipéptidos/proteínas de andamiaje pueden comprender una única inserción de péptido heterólogo por cada polipéptido/proteína de andamiaje, pueden comprender dos inserciones de péptido heterólogo por cada polipéptido/proteína de andamiaje, o pueden comprender tres inserciones de péptido heterólogo por cada polipéptido/proteína de andamiaje.

Realizaciones de la invención tal como se define en las reivindicaciones que dan como resultado una termoestabilidad reducida encuentran aplicación en configuraciones en las que se desea retirar funcionalidad del polipéptido/proteína de andamiaje mediante tratamiento térmico. Un ejemplo es reducir la Tf de una proteína de tipo Affimer® diseñada para inhibir una enzima de tal manera que se permite que la enzima funcione calentándola hasta una temperatura establecida (por ejemplo, una polimerasa de inicio en caliente). Por ejemplo, pueden usarse reactivos de tipo Affimer® tales como un polipéptido/proteína de andamiaje que comprende una inserción de péptido heterólogo tal como se describe en el presente documento para inhibir la polimerasa de ácido nucleico termoestable. Esto encuentra aplicación en mezclas de reacción de PCR. Por ejemplo, puede ser útil producir un reactivo de tipo Affimer®, por ejemplo un polipéptido/proteína de andamiaje según la invención tal como se define en las reivindicaciones, que inhibe la función de exonucleasa de polimerasa de ácido nucleico termoestable. Esto es especialmente útil cuando se mezclan previamente cebadores en una mezcla de reacción de PCR y después se almacenan sin usarse. Si no se inhibe la función de exonucleasa de la polimerasa de ácido nucleico termoestable, entonces esa función de exonucleasa puede degradar los cebadores en la mezcla de reacción. Sin embargo, incluyendo un polipéptido/proteína de andamiaje según la invención tal como se define en las reivindicaciones capaz de inhibir la función de exonucleasa de esa polimerasa en la mezcla de reacción, puede evitarse este inconveniente en las mezclas de reacción de la técnica anterior. En esta situación, resulta importante que el polipéptido/proteína de andamiaje pueda desfuncionalizarse (tal como desnaturalizarse) con el fin de permitir que avance la reacción de PCR.

Por tanto, de manera adecuada, el polipéptido/proteína de andamiaje usado en esta aplicación tiene una estabilidad térmica reducida de modo que se degrada (tal como se desnaturaliza) durante un primer ciclo térmico de la reacción

de PCR y de ese modo se elimina la inhibición de la función de exonucleasa de la polimerasa termoestable permitiendo que avance la reacción.

- 5 Otro ejemplo es un ligando de afinidad que puede eluirse conjuntamente con la proteína diana pero después retirarse (o eliminarse su función) mediante una etapa de calentamiento en la que la proteína de tipo Affimer® está diseñada para tener una Tf inferior a la proteína diana.

#### Fluorescencia

- 10 Puede resultar útil intercambiar aminoácidos aromáticos en la proteína, tales como fenilalanina, por aminoácidos aromáticos alternativos que presentan propiedades de fluorescencia y/o absorbancia a 280 nm. Por ejemplo, puede mutarse fenilalanina para dar tirosina (que tiene propiedades de fluorescencia débiles) o puede mutarse para dar triptófano (que tiene propiedades de fluorescencia fuertes). Hay ocho sitios posibles para estas mutaciones dentro de la estefina A de tipo natural. Los inventores los han sometido a prueba. En la siguiente tabla se indican las mutaciones y su utilidad en estas aplicaciones.
- 15

Variantes de residuos aromáticos de estefina A humana

Variante	Absorbancia mejorada	Transición mejorada en propiedades de fluorescencia intrínseca tras el despliegue <sup>1</sup>	Estabilidad (Tf, °C) <sup>2</sup>
Y35W	Sí	Mejor	75
Y43W	Sí	Mejor	68
Y53W	Sí	Mejor	66
Y54W	Sí	Buena	71
Y64W	Sí	Buena	74
F70W	Sí	Buena	73
Y85W	Sí	Buena	75
F98W	Sí	No	N/A
F70Y	Marginal	No	N/A
F98Y	Marginal	No	N/A

<sup>1</sup> Tal como se evalúa mediante rampas térmicas de Optim.

<sup>2</sup> Medido usando la fluorescencia intrínseca durante rampa térmica de Optim.

- 20 A partir de esto puede concluirse que algunas de las mutaciones anteriores son útiles para la absorbancia a 280 nm, por ejemplo en la determinación de concentraciones de proteína. Además, algunas mutaciones pueden ser útiles para introducir fluorescencia, lo cual es útil para monitorizar cambios en la conformación de la proteína tales como despliegue de proteína.

- 25 De manera más adecuada, el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones comprende una sustitución con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionada del grupo que consiste en Y35W, Y43W, Y53W, Y54W, Y64W, F70W o Y85W. Todas ellas tienen buenas propiedades de fluorescencia.

- 30 De manera adecuada, el polipéptido de la invención tal como se define en las reivindicaciones comprende una sustitución con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionada del grupo que consiste en Y35W, Y43W y Y53W. Estas tienen las mejores propiedades de fluorescencia.

- 35 Según la tabla anterior, la mutación más preferida en un polipéptido/proteína de andamiaje según la invención tal como se define en las reivindicaciones será Y35W. Esto tiene las ventajas de ser la menos desestabilizante de las mutaciones y también ofrecer los mejores espectros para el análisis.

- 40 Debe observarse que cada triptófano introducido en el polipéptido/proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones es desestabilizante en cierto grado. Esto será ventajoso cuando se consideran realizaciones de la invención tal como se define en las reivindicaciones que dan como resultado una estabilidad térmica reducida. Alternativamente, el efecto de estabilidad reducida de estas mutaciones puede mejorarse realizando otras mutaciones para aumentar la estabilidad térmica tal como se enseña en detalle a lo largo de esta solicitud. Por tanto, en algunas realizaciones, el polipéptido/proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede comprender mutaciones tanto estabilizantes como desestabilizantes dependiendo de los objetivos o prioridades para ese polipéptido/proteína de andamiaje particular.

- 45 Una ventaja de la mutación N32G es que se proporciona un aumento particularmente fuerte de la estabilidad térmica, por ejemplo un aumento de aproximadamente 3 °C.

- 50 Una ventaja de la mutación M65I preferida es que se proporciona un aumento especialmente fuerte de la estabilidad térmica de +6 °C.

Se observa que la descripción de cada mutación descrita en el presente documento como que aumenta la

estabilidad térmica del polipéptido/proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones es en sí misma novedosa.

Debe observarse que la cistatina C sólo está relacionada de manera lejana con la secuencia de cistatina A (estefina A). La cistatina C es de manera natural un dímero, es una proteína más larga y tiene un bajo nivel de identidad de secuencia en comparación con estefina A. El pliegue de cistatina es similar entre la cistatina A y la cistatina C, pero estas proteínas sólo comparten una región de homología correspondiente a los aminoácidos 49 a 95 de la cistatina C que corresponden a las posiciones de aminoácido 16 a 60 de la cistatina A. A lo largo de esta región de relación, sólo 13/47 aminoácidos son idénticos, correspondiendo a una identidad de secuencia del 28 %.

#### Subconjuntos de mutaciones

Puede elegirse la mutación/mutaciones de un grupo para aumentar el empaquetamiento del núcleo hidrófobo.

Puede elegirse la mutación/mutaciones de un grupo para aumentar las interacciones de carga en la superficie del polipéptido/proteína de andamiaje.

Puede elegirse la mutación/mutaciones de un grupo para aumentar la geometría de un giro particular en la estructura de polipéptido. Por "aumentar" quiere decirse hacer que el giro sea energéticamente más favorable, por ejemplo energéticamente más estable. Un ejemplo de una mutación de este tipo es la delección de D61 ( $\Delta$ D61).

Puede elegirse la mutación/mutaciones de un grupo para aumentar la estabilidad al tiempo que todavía se funciona dentro de las restricciones de la estructura tridimensional, por ejemplo, en el extremo de giros  $\beta$ . Más específicamente, pueden elegirse cuidadosamente mutaciones para conservar las disposiciones de enlaces de hidrógeno I-I+4 en el extremo de determinados giros  $\beta$ .

Puede elegirse la mutación/mutaciones de un grupo para mejorar la estabilidad al tiempo que se cambia ventajosamente el tipo de giro en la estructura tridimensional de la proteína. Por ejemplo, pueden realizarse mutaciones para cambiar de un giro  $\beta$  de tipo 1 a uno de tipo 2 si se desea.

Debe observarse que hay enseñanzas exhaustivas en esta solicitud sobre las mutaciones que son útiles para proporcionar las características y ventajas técnicas divulgadas. Por ejemplo, con referencia a la mutación en la posición Q42, mutar de E a D se considera ampliamente como una sustitución conservativa dado que en realidad sólo elimina un único grupo metileno de la cadena lateral del aminoácido. Sin embargo, tal como puede observarse a partir de los datos incluidos en esta solicitud, una mutación Q42E proporciona un aumento de la estabilidad térmica de +3 °C, mientras que una mutación Q42D proporciona una reducción de la estabilidad térmica de -3 °C. Por tanto, una sustitución aparentemente conservativa que proporciona un cambio aparentemente diminuto en la estructura del residuo de aminoácido en esta posición puede proporcionar una diferencia drástica de 6 °C entre las  $T_f$  de las dos variantes de polipéptido/proteína de andamiaje. Por tanto, los datos en esta solicitud respaldan la unidad de invención entre cada una de las diferentes mutaciones divulgadas dado que se han elegido, diseñado y sometido a prueba cuidadosamente, así como se ha demostrado que cada una proporciona el mismo efecto técnico especial individual. Además, las reivindicaciones de esta solicitud se limitan únicamente a variantes conocidas y que se ha demostrado que tienen y proporcionan ese efecto técnico especial conocido. Por este motivo, las diversas mutaciones descritas en las reivindicaciones adjuntas se refieren en realidad tan sólo a una única invención y cumplen los requisitos de unidad.

En todos los casos, las menciones de "aumento" o "reducción" de la estabilidad, por ejemplo tal como se refleja por los aumentos o reducciones de la  $T_f$  de particular polipéptidos/proteínas de andamiaje, se mencionan con respecto a estefina A humana, es decir las propiedades del polipéptido de estefina A humana de tipo natural que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 1. De manera similar, todas las mutaciones se describen con referencia a la misma secuencia de estefina A humana de tipo natural SEQ ID NO: 1.

Los siguientes grupos de mutaciones son especialmente ventajosos por los siguientes motivos.

#### • Exposición a disolvente

Mutaciones en estas posiciones mejoran la red de cargas sobre la superficie de la proteína, ayudando a hacer que sea más estable. Puede ser más fácil realizar sustituciones de aminoácido de cambio de carga en la superficie de la proteína de estefina A, lo cual resulta ventajoso. Además, mutar residuos en la superficie de proteína puede permitir más libertad en la elección de sustituciones. Además, resulta ventajoso que los cambios estructurales correspondientes puedan ser más predecibles cuando se alteran residuos en la superficie de proteína en comparación con otras ubicaciones.

Pueden seleccionarse una o más sustituciones de residuos expuestos a disolvente del grupo que consiste en:

(E29K K30E E33K), N32G, N90T, K63R, T34V, T34K y T34R.

Debe observarse que, a lo largo de todo el texto, cuando un grupo de mutaciones se presentan juntas entre paréntesis (por ejemplo "(E29K K30E E33K)"), de manera adecuada esas mutaciones se realizan juntas, es decir simultáneamente como grupo / como una única opción de la lista dada.

En particular, N32G ofrece estabilidad mejorada de la hélice.

En particular, K63R extiende la cadena dando como resultado un resto hidrófobo aumentado, reposicionamiento de átomo cargado.

- Parcialmente enterrado

Mutar estos residuos añade ventajosamente masa/área hidrófoba adicional al núcleo de la proteína. Esto aumenta la cantidad de interacciones hidrófobas en el núcleo de la proteína. Esto tiene la ventaja de mejorar la estabilidad de la proteína.

Con respecto a mutaciones de "extensión de cadena alifática", ventajosamente añaden cadenas laterales más grandes, que de nuevo añaden ventajosamente masa hidrófoba adicional al núcleo de la proteína.

Pueden seleccionarse una o más sustituciones de residuos parcialmente enterrados del grupo que consiste en:

Q42E, T51I, T51V, T51L y T51F.

A continuación se exponen propiedades ventajosas adicionales compartidas por subgrupos particulares de sustituciones

*Extensión de cadena alifática*

T51I, T51L, T51F

*De anfipático a alifático*

T51I, T51V, T51L

*De anfipático a aromático*

T51F

*De amina a ácido*

Q42E

Con referencia a la mutación Q42E, esto mantiene ventajosamente la longitud de cadena del residuo de aminoácido igual, y ventajosamente permite un cambio en la química para aislarse del cambio en el tamaño global de la cadena lateral de aminoácido.

- Núcleo hidrófobo (estructura terciaria)

Estas mutaciones aumentan el enterramiento de restos hidrófobos y, por tanto, tienen la ventaja de aumentar la estabilidad de esta manera.

Pueden seleccionarse una o más sustituciones de residuos de núcleo hidrófobo (estructura terciaria) del grupo que consiste en:

T45V, T45I, A59V, A59I, A59L, M65V y M65I.

A continuación se exponen propiedades ventajosas adicionales compartidas por subgrupos particulares de sustituciones:

*Extensión de cadena*

T45I, A59V, A59I, A59L

*De anfipático a alifático*

T45V, T45I

*Ramificación beta*

5 M65V, M65I, A59V, A59I

Con respecto a mutaciones de "extensión de cadena", añaden contactos hidrófobos adicionales y, por tanto, ayudan a aumentar adicionalmente la estabilidad. Esto es especialmente cierto para cadenas laterales más largas y/o ramificadas en los aminoácidos que se introducen. Además, determinadas mutaciones eliminan grupos polares de los residuos de aminoácido y dan como resultado un residuo completamente hidrófobo mientras que el tipo natural puede ser anfipático.

Sin desear limitarse a la teoría, se cree que la ganancia en la estabilidad se debe a la inestabilidad relativa de restos hidrófobos expuestos en un estado desplegado en comparación con las cadenas laterales hidrófobas enterradas en el estado plegado. Por tanto, siempre que se produzca un correcto empaquetamiento en el núcleo del estado plegado, cuantas más partes hidrófobas haya más estable será el estado nativo con respecto al estado desplegado, que es lo que se mide con la Tf (un sustituto de la energía libre de Gibbs de plegamiento (DG)). Por tanto, la ganancia de estabilidad procede de maximizar la cantidad de restos hidrófobos que están enterrados mediante empaquetamiento con otros restos hidrófobos de manera eficiente.

Con respecto a grupos de mutaciones tanto parcialmente enterradas como de núcleo hidrófobo (estructura terciaria), comparten la propiedad común de una ventaja de tender a tener más contactos dentro de la estructura de proteína. El efecto de seleccionar como diana estos residuos es que pueden obtenerse efectos posiblemente mayores sobre la estabilidad de proteína mediante un número menor de sustituciones en comparación con seleccionar como diana otras partes de la proteína. Por tanto, estos grupos de mutaciones juntos forman un superconjunto de sustituciones que comparten todas ellas la misma característica técnica especial individual.

- Estructura secundaria

Debe observarse que la delección del aminoácido 61 convierte el fragmento de 5 aminoácidos desde el residuo 59 hasta el 63 en una secuencia compatible con un motivo de giro  $\beta$  canónico. Este motivo de 4 aminoácidos creado mediante la delección del aminoácido 61 presenta un motivo de giro  $\beta$  canónico. Este enfoque innovador tomado por los inventores aprovecha los residuos existentes en la proteína de tipo natural para realizar cambios considerables en la estabilidad al tiempo que todavía se permite una mutación mínima del polipéptido inicial. Una ventaja suministrada por el grupo de mutaciones es la ventaja de establecer giros en la proteína (y/o establecer la hélice en el caso de N32G). En cualquier caso, seleccionar como diana estos residuos proporciona la ventaja de fomentar la formación de enlaces de hidrógeno estables a lo largo de toda la región afectada de la proteína, y de ese modo aumentar ventajosamente la estabilidad.

Pueden seleccionarse una o más sustituciones de residuos de estructura secundaria del grupo que consiste en:

N32G, <sup>59</sup>AN-GK, <sup>59</sup>IN-GK, <sup>59</sup>VN-GK, <sup>59</sup>LN-GK, <sup>59</sup>AG-NK, <sup>59</sup>VG-NK, A59V, A59I, A59L, T34K y T34R.

Debe observarse que, a lo largo de todo el texto, cuando se presenta un grupo de mutaciones como un par (por ejemplo "<sup>59</sup>AN-GK"), de manera adecuada esas mutaciones se realizan juntas, es decir simultáneamente como un par / como una única opción de la lista dada.

A continuación se exponen propiedades ventajosas adicionales compartidas por subgrupos particulares de sustituciones:

*Caperuza de hélice C-terminal*

N32G, T34K, T34R

*Giros*

A59V, A59I, A59L, <sup>59</sup>AN-GK, <sup>59</sup>IN-GK, <sup>59</sup>VN-GK, <sup>59</sup>LN-GK, <sup>59</sup>AG-NK, <sup>59</sup>VG-NK

*Tipo I' (tipo 1 prima)*

<sup>59</sup>AN-GK, <sup>59</sup>IN-GK, <sup>59</sup>VN-GK, <sup>59</sup>LN-GK

*Tipo II' (tipo 2 prima)*

<sup>59</sup>AG-NK, <sup>59</sup>VG-NK

*Propensión de cadena aumentada*

T45V, T45I, M65V, M65I

5 • Carga – Interacciones de carga

Estas mutaciones proporcionan la ventaja técnica de mejorar las interacciones de carga y aumentar de ese modo la estabilidad.

10 Pueden seleccionarse una o más sustituciones de residuos de interacción carga-carga del grupo que consiste en:

Q42E, (E29K K30E E33K), T34K y T34R.

15 A continuación se exponen propiedades ventajosas adicionales compartidas por subgrupos particulares de sustituciones:

*Superficie*

(E29K K30E E33K), T34K, T34R

20

*Parcialmente enterrado*

Q42E

25 *De ácido a básico y viceversa*

(E29K K30E E33K)

*De amina a ácido*

30

Q42E

*De polar a básico*

35 T34R, T34K

En el caso particular de Q42E, esto mejora la red de carga de superficie. Sin desear limitarse a la teoría, Q42E añade carga y se cree que permite un puente de sal (lo más probablemente con un residuo de lisina) que de lo contrario está demasiado lejos en el espacio tridimensional de la proteína como para formar una interacción de este tipo. Normalmente se considera que un puente de sal es una interacción de carga-carga entre átomos separados por menos de o igual a 4 Å. Por tanto, se cree que esta mutación fomenta la formación de un puente de sal desde Q42E hasta una Lys.

40

45 • Ubicación

Resulta ventajoso que la gran mayoría de las sustituciones enseñadas en el presente documento son en la cara inversa del polipéptido/proteína de andamiaje basado en estefina A, es decir el extremo no de unión de la proteína. Esto resulta sorprendente para los inventores. La expectativa sería que las mutaciones estuvieran dispersadas a lo largo de toda la secuencia del polipéptido. Sin embargo, las enseñanzas presentadas son que, seleccionando como diana la cara inversa de la proteína, pueden realizarse ganancias significativas en la estabilidad al tiempo que se deja el extremo de unión de la proteína sin mutar o mutado tan sólo de manera mínima.

50

Pueden seleccionarse una o más sustituciones de residuos en ubicaciones particulares del grupo que consiste en:

55 T51, A59, M65, N32, Q42, N90, K63, <sup>59</sup>AN-GK, <sup>59</sup>IN-GK, <sup>59</sup>VN-GK, <sup>59</sup>LN-GK, <sup>59</sup>AG-NK, <sup>59</sup>VG-NK y T34.

Cuando se desea restringir las mutaciones a una ubicación particular dentro del polipéptido, esto puede lograrse ventajosamente seleccionando una(s) mutación/mutaciones de uno de los grupos individuales expuestos a continuación.

60

*Cara frontal (extremo de unión)*

T51.

65 *Cara inversa (extremo no de unión)*

A59, M65, N32, Q42, N90, K63, <sup>59</sup>AN-GK, <sup>59</sup>IN-GK, <sup>59</sup>VN-GK, <sup>59</sup>LN-GK, <sup>59</sup>AG-NK, <sup>59</sup>VG-NK y T34.

Con respecto a esto, debe observarse que, en el análisis exhaustivo llevado a cabo por los inventores, se estudiaron de manera individual todos los residuos en el núcleo hidrófobo de la proteína. Resulta sorprendente para los inventores que las mutaciones de potenciación de la estabilidad más útiles se concentran en la región de cara inversa de la proteína.

- Modificación postraducciona

Una ventaja adicional de algunas de estas mutaciones es fomentar la estabilidad química de la molécula. Por ejemplo, los residuos de metionina pueden oxidarse, mientras que los residuos de valina/isoleucina no. Por tanto, las mutaciones enseñadas por los inventores tienen la ventaja adicional de evitar la oxidación en este punto en la proteína, lo cual no es deseable, y, por tanto, proporcionan ventajosamente una molécula que es resistente a cambios que de lo contrario pueden provocarse por oxidación.

Pueden seleccionarse una o más sustituciones de residuos de modificación postraducciona del grupo que consiste en:

N32G, M65V, M65I, T34V, T34K, y T34R.

Cuando se desea eliminar un tipo particular de modificación postraducciona, esto puede lograrse ventajosamente seleccionando una(s) mutación/mutaciones de uno de los grupos individuales expuestos a continuación:

*Possible glicosilación*

N32G, T34V, T34K, T34R

*Possible oxidación*

M65V, M65I

Debe observarse además que el mutante N32G también elimina el riesgo de desamidación. La degradación de residuos de N mediante desamidación puede suponer un problema, esta mutación elimina ventajosamente tal problema. Lo mismo se aplica a Q42E, dado que los residuos de Q también son propensos a desamidación.

*Possible desamidación*

N32G, Q42E

- Diferencia entre hSteA y SQT

Debe observarse que N90T puede formar parte del giro en esta región de la proteína, y, por tanto, proporciona una ventaja adicional de estabilizar ese giro.

Andamiajes a modo de ejemplo

Andamiajes a modo de ejemplo para aplicaciones de investigación:

andamiajes denominados 3r (investigación):

3r1- hSteA Y35W N32G V48D M65I Q42E T51L (A59V ΔD61) (E29K K30E E33K)

3r2 - hSteA Y35W N32G V48D M65I Q42E T51L (A59V G60N ΔD61 N62G) (E29K K30E E33K)

Andamiajes a modo de ejemplo para aplicaciones terapéuticas:

andamiajes denominados 3t (terapéuticos):

3t1 - hSteA N32G V48D

3t2 - hSteA N32G V48D M65I

3t3 - hSteA N32G V48D M65I T51L

3t4 - hSteA N32G V48D M65I Q42E

3t5 - hSteA N32G V48D M65I Q42E T51L

Con respecto a la nomenclatura estándar/convencional usada en el presente documento, las secuencias de las proteínas de andamiaje completas se divulgan con referencia a SEQ ID NO: 1 y las mutaciones mencionadas. Sin embargo, con propósitos de ilustración, los siguientes son ejemplos representativos de secuencias de proteína de andamiaje preferidas:

3r1 con 2 inserciones de péptido heterólogo. En este ejemplo n=9: SEQ ID NO: 18

MIPGGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEKETGKTWGKLEAVEYKTQVD(Xn)GLNYYIKVRVGNKYIHLKVFKS  
L(Xn)EDLVLTGYQVDKNKDELDTGF

3r2 con 2 inserciones de péptido heterólogo. En este ejemplo n=9: SEQ ID NO: 19

MIPGGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEKETGKTWGKLEAVEYKTQVD(Xn)GLNYYIKVRVGNKYIHLKVFKS  
L(Xn)EDLVLTGYQVDKNKDELDTGF

3t1 con 2 inserciones de péptido heterólogo. En este ejemplo n=9: SEQ ID NO: 20

MIPGGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEKETGETYGKLEAVQYKTQVD(Xn)GTNYYIKVRAGDNKYMHKLVF  
KSL(Xn)EDLVLTGYQVDKNKDELDTGF

3t2 con 2 inserciones de péptido heterólogo. En este ejemplo n=9: SEQ ID NO: 21

MIPGGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEKETGETYGKLEAVQYKTQVD(Xn)GTNYYIKVRAGDNKYIHLKVFK  
SL(Xn)EDLVLTGYQVDKNKDELDTGF

3t3 con 2 inserciones de péptido heterólogo. En este ejemplo n=9: SEQ ID NO: 22

MIPGGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEKETGETYGKLEAVQYKTQVD(Xn)GLNYYIKVRAGDNKYIHLKVFK  
SL(Xn)EDLVLTGYQVDKNKDELDTGF

3t4 con 2 inserciones de péptido heterólogo. En este ejemplo n=9: SEQ ID NO: 23

MIPGGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEKETGETYGKLEAVEYKTQVD(Xn)GTNYYIKVRAGDNKYIHLKVFK  
SL(Xn)EDLVLTGYQVDKNKDELDTGF

3t5 con 2 inserciones de péptido heterólogo. En este ejemplo n=9: SEQ ID NO: 24

MIPGGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEKETGETYGKLEAVEYKTQVD(Xn)GLNYYIKVRAGDNKYIHLKVFKS  
L(Xn)EDLVLTGYQVDKNKDELDTGF

en los que X es cualquier aminoácido,

y en los que n es un número entero de desde 0 hasta 36.

De la manera más adecuada n es 9.

#### Cistatina A o cistatina B

Estefina A humana pertenece a la familia 1 de la superfamilia de cistatina. Las cistatinas A y las cistatinas B son diferentes. Las cistatinas B tienen normalmente un pI casi neutro y tienen un residuo de cisteína cerca del extremo C-terminal. Se cree que todas las cistatinas B tienen esta cisteína y todas las cistatinas B forman dímeros con enlaces de disulfuro, mientras que las cistatinas A tienen un pI más ácido y ninguna cistatina A tiene esta cisteína C-terminal.

#### Ácidos nucleicos, promotores, bibliotecas, células huésped

El experto en la técnica conoce bien la fabricación/producción de polipéptidos y/o ácidos nucleicos recombinantes según la presente invención tal como se define en las reivindicaciones y sólo requiere conocimiento de rutina tal como cómo sintetizar polipéptidos o polinucleótidos, y/o cómo expresar un polinucleótido para producir un polipéptido en el laboratorio o un biorreactor comercial a escala aumentada. Numerosas empresas en todo el mundo ofrecen tales servicios de producción de rutina y sólo requieren una indicación de la(s) secuencia(s) que van a producirse.



- El experto en la técnica conoce bien las células huésped, vectores para la expresión de polipéptido(s) según la invención tal como se define en las reivindicaciones, promotores para su uso en tales sistemas y la optimización de codones (si la hay) del/de los ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) para los mismos. La elección de vectores particulares tales como fago, fagémidos, plásmidos, o de promotores o células huésped u otras "herramientas" de este tipo para la producción de los polipéptidos o bibliotecas descritos en el presente documento es una cuestión para el experto que trabaja en la invención tal como se define en las reivindicaciones. De manera similar, la PCR o estrategias de clonación, ligaciones, técnicas de transformación/electroporación son todas ellas rutinarias y no forman parte de la invención tal como se define en las reivindicaciones sino que se determinan por el operario.
- En caso de necesitarse orientación adicional, en la técnica se conocen bien técnicas de biología molecular generales, por ejemplo tal como en (2000 Current Protocols in Molecular Biology F.M. Ausubel *et al*, Eds. ISBN: 978-0-471-50338-5, publicado por John Wiley & Sons Ltd, Oldlands Way, Bognor Regis, West Sussex, PO22 9NQ, R. U.).
- Cepas celulares a modo de ejemplo:
- TG1 (Lucigen, número de catálogo 60502-2)
- ER2738 (New England Biolabs, número de catálogo E4104)
- Cepa de fagos a modo de ejemplo:
- M13KO7 (New England Biolabs, número de catálogo N0315)
- Vector de fagémido a modo de ejemplo:
- pUC119 (Clontech, número de catálogo 3319), que contiene el promotor lac
- Promotor a modo de ejemplo:
- promotor lac (véase anteriormente)
- El polipéptido/proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede comprender además una etiqueta, tal como para purificación, por ejemplo una etiqueta de 6his, etiqueta de MBP (proteína de unión a maltosa), o cualquier otra secuencia adecuada para ayudar a la purificación.
- El polipéptido/proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede comprender además un ligador, tal como un ligador de glicina, para unirse a otro polipéptido.
- El polipéptido/proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede comprender además una secuencia de detección, tal como para la detección por un anticuerpo, por ejemplo una etiqueta myc o etiqueta flag o cualquier otra secuencia adecuada para facilitar la detección.
- El polipéptido/proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede estar marcado, tal como con un marcador fluorescente unido al polipéptido/proteína de andamiaje.
- El polipéptido/proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede estar unido a una proteína portadora tal como una proteína de transporte para facilitar la entrada en células.
- El polipéptido/proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede estar unido a una proteína de direccionamiento tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, o un aptámero, o reactivo de tipo Affimer®, para dirigir el polipéptido/proteína de andamiaje a una ubicación particular tal como para unirlo a una célula diana o a cualquier otra entidad a la que es capaz de unirse la proteína de direccionamiento.
- El polipéptido/proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede unirse a un sustrato o estructura, por ejemplo una perla, o nanoesfera, o un electrodo (por ejemplo, como parte de una matriz de electrodos), o una membrana (tal como membrana de nitrocelulosa), o un recipiente de reacción tal como una placa de ELISA o tubo de microcentrífuga o cualquier otro artículo de este tipo.
- De manera adecuada, el polipéptido/proteína de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede inmovilizarse.
- La unión del polipéptido/proteína de andamiaje a otros restos puede realizarse mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica, por ejemplo mediante unión covalente, mediante formación de puentes de disulfuro, mediante preparación como un único polipéptido (proteína de fusión), mediante conjugación a residuo(s) de aminoácido adecuado(s) tal(es) como residuo(s) de cisteína, uniendo al extremo N o C-terminal del polipéptido o

cualquier otro medio adecuado conocido en la técnica.

Producción de polipéptido(s)

- 5 También se divulga un método de producción de un polipéptido que tiene una estabilidad alterada tal como una estabilidad térmica aumentada o una estabilidad térmica reducida en comparación con SEQ ID NO: 1, comprendiendo dicho método sintetizar un polipéptido que comprende una o más sustituciones con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionadas del grupo que consiste en:
- 10 A12I, A12V, I16L, V20A, V20I, V20L, Q26E, E29M, T31K, N32G, N32D, N32H, T34V, T34R, T34K, T34D, T34P, L38A, L38V, L38F, A40I, A40V, Q42E, Q42D,
- 15 T45I, T45V, V48E, V48D, V48G, V48A, V48L, G50S, T51F, T51V, T51L, T51I, T51A, A59L, A59I, A59V,
- 20 K63R, M65V, M65I, L67I, N90T, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (E29K, K30E, E33K), (Y54D, T83D, Q86E),
- 25 (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N,  $\Delta$ D61, N62G),  $\Delta$ D61, (A59L, G60N,  $\Delta$ D61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N,  $\Delta$ D61, N62G), (A59V, G60N,  $\Delta$ D61, N62G),
- 30 (A59V,  $\Delta$ D61), (G60P,  $\Delta$ D61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P,  $\Delta$ D61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K), y (T83D, Q86E); de manera más adecuada la(s) sustitución/sustituciones se selecciona(n) del grupo que consiste en:
- 35 A12I, A12V, I16L, V20I, V20L, Q26E, E29M, T31K N32G, N32D, N32H, T34V, T34R, T34D, T34P, L38A L38V, A40I, A40V, Q42D, T45I, T45V, V48E, V48G
- 40 V48A, T51F, T51V, T51L, T51A, A59L, A59I, M65V L67I (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V)
- 45 (E29K, K30E, E33K), (Y54D, T83D, Q86E) (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K)
- 50 (G60N, D61G, N62K), (G60N,  $\Delta$ D61, N62G)  $\Delta$ D61, (A59L, G60N,  $\Delta$ D61, N62G) (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K)
- 55 (A59I, G60N,  $\Delta$ D61, N62G), (A59V, G60N,  $\Delta$ D61, N62G)
- 60
- 65

- (A59V, ΔD61), (G60P, ΔD61, N62P)
- (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G)
- 5 (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y  
(T83D, Q86E).
- 10 También se divulga un método de producción de un polipéptido que tiene una estabilidad alterada tal como una estabilidad térmica aumentada en comparación con SEQ ID NO: 1, comprendiendo dicho método sintetizar un polipéptido que comprende una o más sustituciones con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionadas del grupo que consiste en:
- 15 E29M, N32G, T34V, T34R, T34K, Q42E, T45I, T45V  
G50S, T51F, T51V, T51L, T51I, A59L, A59I, A59V  
K63R, M65V, M65I, L67I, N90T
- 20 (E29K, K30E, E33K), (A59L, G60N, D61G, N62K)  
(A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K)
- 25 (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61  
(A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K)  
(A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G)
- 30 (A59V, G60N, ΔD61, N62G), y (A59V, ΔD61); de manera más adecuada la(s) sustitución/sustituciones se selecciona(n) del grupo que consiste en:
- 35 E29M, N32G, T34V, T34R, T45I, T45V, T51F, T51V  
T51L, A59L, A59I, M65V, L67I  
(E29K, K30E, E33K), (A59L, G60N, D61G, N62K)
- 40 (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K)  
(G60N, ΔD61, N62G), ΔD61  
(A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K)
- 45 (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G)  
(A59V, G60N, ΔD61, N62G), y (A59V, ΔD61).
- 50 También se divulga un método de producción de un polipéptido que tiene una estabilidad alterada tal como una estabilidad térmica reducida en comparación con SEQ ID NO: 1, comprendiendo dicho método sintetizar un polipéptido que comprende una o más sustituciones con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionadas del grupo que consiste en:
- 55 A12I, A12V, I16L, V20A, V20I, V20L, Q26E, T31K  
N32D, N32H, T34D, T34P, L38A, L38V, L38F, A40I  
A40V, Q42D, V48E, V48D, V48G, V48A, V48L, T51A
- 60 (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V)  
(Y54D, T83D, Q86E), (G60P, ΔD61, N62P)
- 65 (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G)

(G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y

(T83D, Q86E); de manera más adecuada la(s) sustitución/sustituciones se selecciona(n) del grupo que consiste en:

5 A12I, A12V, I16L, V20I, V20L, Q26E, T31K, N32D

N32H, T34D, T34P, L38A, L38V, A40I, A40V, Q42D

V48E, V48G, V48A, T51A

10 (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V)

(Y54D, T83D, Q86E), (G60P, ΔD61, N62P)

15 (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G)

(G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y

(T83D, Q86E).

20 De manera adecuada, la etapa de síntesis comprende preparar un ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido y disponer la traducción de dicho ácido nucleico para producir el polipéptido. De manera adecuada, el ácido nucleico puede estar comprendido por un genoma de fago, tal como uno o más miembros de una biblioteca de fagos.

#### 25 Mutaciones adicionales

Puede haber una ventaja adicional en realizar una o más mutaciones adicionales seleccionadas del grupo que consiste en:

G4R, E18Q, P25S, N32Q, T34E, T34Q, G36E, M65F

30 M65L, E78A, (K91E, D92K), (K91P, D93G), NPDG

Debe observarse que este grupo de mutaciones comparten la propiedad de aportar, cada una, un pequeño efecto sobre la estabilidad térmica. Debe tenerse cuidado en medir los mismos si se miden de manera individual, ya que el error experimental en las mediciones puede proporcionar una indicación de efecto bajo, o incluso de ausencia de efecto o una pequeña inversión de efecto (por ejemplo, en vez de mostrarse como +0,5 °C, el efecto puede mostrarse como cero o como -0,2 °C cuando el error experimental en mediciones individuales está dentro de +/-0,7 °C de cambio de °C). Esto es así con todas las mediciones científicas cuando el error experimental se aproxima o supera la magnitud del efecto que está midiéndose.

40 Con respecto a la mutación NPDG que comienza en el aminoácido 90 ("90NPDG"), esto aumenta la probabilidad estadística de formar un giro de tipo 1 en este punto en la proteína, y de ese modo aumenta la estabilidad mediante este mecanismo.

- Efecto pequeño – Aumento de la estabilidad térmica

45 G4R +0,05 °C

E18Q +0,57 °C

50 P25S +0,01 °C

N32Q +0,37 °C

T34Q +0,29 °C

55 G36E +0,18 °C

M65F +0,19 °C

60 E78A +0,50 °C

(K91E, D92K) +0,56 °C

(K91P, D93G) +0,22 °C

90NPDG +0,7 °C

(N90 K91P D92 D93G) +0,22 °C

5

- Efecto pequeño – Reducción de la estabilidad térmica

T34E -0,39 °C

10 M65L -0,23 °C

#### Efectos sobre PK

15 En determinadas realizaciones, el polipéptido, tal como un polipéptido de tipo Affimer, comprende una porción de polipéptido, tal como una porción de polipéptido de tipo Affimer, que se une a un resto diana, preferiblemente una proteína, más preferiblemente una proteína humana, como monómero con una constante de disociación ( $K_D$ ) de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, o aproximadamente 0,1 nM o menos.

20

25 En determinadas realizaciones, el polipéptido, tal como un polipéptido de tipo Affimer, comprende una porción de polipéptido, tal como una porción de polipéptido de tipo Affimer, que se une a un resto diana, preferiblemente una proteína, más preferiblemente una proteína humana, como monómero con constante de velocidad de disociación ( $k_{\text{off}}$ ), tal como se mide mediante Biacore, de aproximadamente  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  (es decir, unidad de 1/segundo) o más lenta; de aproximadamente  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  o más lenta o incluso de aproximadamente  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  o más lenta.

30 En determinadas realizaciones, el polipéptido, tal como un polipéptido de tipo Affimer, comprende una porción de polipéptido, tal como una porción de polipéptido de tipo Affimer, que se une a un resto diana, preferiblemente una proteína, más preferiblemente una proteína humana, con una constante de velocidad de asociación ( $k_{\text{on}}$ ), tal como se mide mediante Biacore, de al menos aproximadamente  $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  o más rápida; al menos aproximadamente  $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  o más rápida; al menos aproximadamente  $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  o más rápida; o incluso al menos aproximadamente  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  o más rápida.

35 En determinadas realizaciones, el polipéptido, tal como un polipéptido de tipo Affimer, comprende una porción de polipéptido, tal como una porción de polipéptido de tipo Affimer, que se une a un resto diana que tiene una pareja de unión relacionada, preferiblemente una proteína, más preferiblemente una proteína humana, como monómero con una C150 en un ensayo de unión competitiva con una pareja de unión relacionada de 1  $\mu\text{M}$  o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, o aproximadamente 0,1 nM o menos.

40

#### Ventajas

45 Una ventaja de la invención tal como se define en las reivindicaciones es que se proporciona un andamiaje con excelentes propiedades de expresión.

Una ventaja de la invención tal como se define en las reivindicaciones es que se proporciona un andamiaje con inmunogenicidad moderada o reducida (baja inmunogenicidad).

50 Una ventaja de la invención tal como se define en las reivindicaciones es que los polipéptidos/proteínas de andamiaje descritos no presentan problemas de agregación/precipitación. En más detalle, se observa que los andamiajes de la invención tal como se define en las reivindicaciones no se agregan/precipitan antes de desplegarse, por tanto cuando el andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones tiene una  $T_f$  aumentada con respecto a hSteA, ese andamiaje también presenta ventajosamente una resistencia aumentada frente a la agregación/precipitación.

55

Una ventaja de los polipéptidos/proteínas de andamiaje descritos es que aceptan inserciones de péptido heterólogo.

60 Una ventaja de los polipéptidos/proteínas de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones es que se presentan de manera apropiada inserciones de péptido heterólogo.

Una ventaja de la invención tal como se define en las reivindicaciones es que los polipéptidos/proteínas de andamiaje descritos no se ven afectados de manera negativa con respecto a la estabilidad/resistencia a proteasa por las mutaciones que se introducen. Dicho de otro modo, los polipéptidos/proteínas de andamiaje de la invención tal como se define en las reivindicaciones conservan ventajosamente su estabilidad y/o resistencia a proteasa. Esto es otra propiedad ventajosa de las mutaciones particulares enseñadas en el presente documento.

65

Aspectos adicionales

También se divulga el uso de un andamiaje tal como se describió anteriormente en aplicaciones de investigación tales como examinar para seleccionar péptido(s) capaz(es) de unirse a una diana particular, y/o examinar para seleccionar péptido(s) que tiene(n) actividad(es) particular(es).

También se divulga el uso de un andamiaje tal como se describió anteriormente en aplicaciones médicas tales como direccionamiento de compuesto(s) a células o ubicaciones particulares dentro del cuerpo, y/o el uso en inhibir o fomentar actividades metabólicas particulares.

También se divulgan composiciones tales como composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptido(s)/proteína(s) de andamiaje tal como se describieron anteriormente.

También se divulga una composición que comprende uno o más polipéptidos/proteínas de andamiaje tal como se describieron anteriormente junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se divulga el uso de un polipéptido/proteína de andamiaje tal como se describió anteriormente como compuesto de diagnóstico, compuesto terapéutico, biomarcador, agente para detectar específicamente un biomarcador, molde de diseño de fármacos racional, diana o reactivo para descubrimiento de fármacos, sustituto de anticuerpo, aptámero, reactivo de tipo Affimer®, o herramienta de investigación.

También se divulga el uso de un polipéptido tal como se describió anteriormente como proteína de andamiaje. También se describe un polipéptido, tal como un polipéptido de tipo Affimer, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 % de identidad con respecto a los residuos de aminoácido 1 a 11, 13 a 15, 17 a 19, 21 a 25, 27 a 28, 35 a 37, 39, 41, 43 a 44, 46 a 47, 49 a 50, 52 a 53, 55 a 58, 63 a 64, 66, 68 a 82, 84 a 85, y 87 a 98 de SEQ ID NO: 3 (SteA de tipo natural canina);

caracterizado porque dicho polipéptido comprende una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 3 seleccionadas del grupo que consiste en:

T51L, T51V, M65V, N32G, A59I, L38A, V20I, A40I, L38V, A12I, A12V, I16L, V20L, Q26E, E29M, T31K, N32D, N32H, T34V, T34R, T34D, T34P, A40V, Q42D, T45I, T45V, V48E, V48G, V48A, T51F, T51A, A59L, L67I, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (E29K, K30E, E33K), (Y54D, T83D, Q86E), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, ΔD61), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y (T83D, Q86E).

De manera adecuada, dichas una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 se selecciona o se seleccionan del grupo que consiste en:

T51L, T51V, M65V, N32G, A59I, E29M, T34V, T34R, T45I, T45V, T51F, A59L, L67I, (E29K, K30E, E33K), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), y (A59V, ΔD61);

preferiblemente en las que dicho polipéptido tiene una Tf superior a la Tf de SEQ ID NO: 3; más preferiblemente superior a la Tf de SEQ ID NO: 1. En otra realización de manera adecuada, dichas una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 se selecciona o se seleccionan del grupo que consiste en:

L38A, V20I, A40I, L38V, A12I, A12V, I16L, V20L, Q26E, T31K, N32D, N32H, T34D, T34P, A40V, Q42D, V48E, V48G, V48A, T51A, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (Y54D, T83D, Q86E), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y (T83D, Q86E);

preferiblemente en las que dicho polipéptido tiene una Tf inferior a la Tf de SEQ ID NO: 3, más preferiblemente inferior a la Tf de SEQ ID NO: 1.

También se describe un polipéptido, tal como un polipéptido de tipo Affimer, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 % de identidad con respecto a los residuos de aminoácido 1 a 11, 13 a 15, 17 a 19, 21 a 25, 27 a 28, 35 a 37, 39, 41, 43 a 44, 46 a 47, 49 a 50, 52 a 53, 55 a 58, 63 a 64, 66, 68 a 82, 84 a 85, y 87 a 98 de SEQ ID NO: 3;

en el que dicho polipéptido comprende al menos una inserción de péptido heterólogo;

caracterizado porque dicho polipéptido comprende una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionadas del grupo que consiste en:

- M65I, T51I, T51L, T51V, M65V, A59V, N32G, A59I, L38A, V20A, V20I, A40I, L38V, G50S, L38F, A12I, A12V, I16L, V20L, Q26E, E29M, T31K, N32D, N32H, T34V, T34R, T34K, T34D, T34P, A40V, Q42E, Q42D, T45I, T45V, V48E, V48D, V48G, V48A, V48L, T51F, T51A, A59L, K63R, L67I, N90T, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (E29K, K30E, E33K), (Y54D, T83D, Q86E), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, ΔD61), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K), y (T83D, Q86E);
- 5 en el que dicha inserción de péptido heterólogo comprende un péptido heterólogo insertado en una de las siguientes posiciones con respecto a SEQ ID NO: 1:
- 10 d) 48-<péptido heterólogo>-50,
- 15 e) 49-<péptido heterólogo>-51,
- f) 50-<péptido heterólogo>-52,
- q) 72-<péptido heterólogo>-77,
- 20 r) 73-<péptido heterólogo>-78; o
- s) 74-<péptido heterólogo>-79.
- 25 **Breve descripción de los dibujos**
- La figura 1 muestra un gráfico de barras.
- La figura 2 muestra un gráfico de barras.
- 30 La figura 3 muestra un gráfico de barras.
- Las figuras 4A y 4B muestran gráficos.
- 35 La figura 5 muestra gráficos.
- La figura 6 muestra gráficos.
- La figura 7 muestra gráficos.
- 40 La figura 8 muestra gráficos.
- La figura 9 muestra gráficos.
- 45 La figura 10 muestra gráficos.
- La figura 11 muestra una representación gráfica.
- La figura 12 muestra una tabla.
- 50 La figura 13 muestra una tabla.
- La figura 14 muestra una tabla.
- 55 La figura 15 muestra una representación gráfica.
- La figura 16 muestra una representación gráfica.
- La figura 17 muestra una tabla.
- 60 La figura 18 muestra un gráfico.
- La figura 19 muestra un gráfico.
- 65 Descripción de realizaciones a modo de ejemplo

## I. Definiciones

Para facilitar una comprensión de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones, a continuación se definen varios términos y expresiones.

El término "Affimer" (o "polipéptido de tipo Affimer") se refiere a proteínas pequeñas, altamente estables, que son variantes modificadas por ingeniería recombinante de polipéptidos de estefina. Las proteínas de tipo Affimer presentan bucles peptídicos (normalmente dos) y una secuencia N-terminal todos los cuales pueden aleatorizarse para unirse a proteínas diana deseadas con alta afinidad y especificidad, de una manera similar a anticuerpos monoclonales. La estabilización del/de los bucle(s) peptídico(s) mediante el andamiaje de proteína de estefina restringe las posibles conformaciones que pueden adoptar los péptidos, aumentando la afinidad y especificidad de unión en comparación con bibliotecas de péptidos libres. Estas proteínas de unión distintas de anticuerpos modificadas por ingeniería se diseñan para imitar las características de reconocimiento molecular de anticuerpos monoclonales en diferentes aplicaciones. Pueden llevarse a cabo variaciones en otras partes de la secuencia de polipéptido de estefina, mejorando tales variaciones las propiedades de estos reactivos de afinidad, tales como aumentar la estabilidad, hacer que sean robustos a lo largo de un intervalo de temperaturas y pH y similares.

Un "compuesto de tipo Affimer codificado" se refiere a un constructo de ácido nucleico que, cuando se expresa por células en el cuerpo de un paciente mediante un procedimiento de inserción de genes, produce un polipéptido de tipo Affimer pretendido *in vivo*.

Un "conjugado unido a compuesto de tipo Affimer" se refiere a un polipéptido de tipo Affimer que tiene uno o más restos conjugados al mismo a través de una conjugación química distinta de mediante la formación de un enlace peptídico continuo a través del extremo C-terminal o el extremo N-terminal de la porción de polipéptido del polipéptido de tipo Affimer que contiene una secuencia de polipéptido de tipo Affimer. Un conjugado unido a compuesto de tipo Affimer puede ser un "conjugado de compuesto de tipo Affimer-fármaco", que se refiere a un polipéptido de tipo Affimer que incluye uno o más restos farmacológicamente activos conjugados al mismo. Un conjugado unido a compuesto de tipo Affimer también puede ser un "conjugado de compuesto de tipo Affimer-etiqueta", que se refiere a un polipéptido de tipo Affimer que incluye uno o más restos detectables (es decir, marcadores detectables) conjugados al mismo.

Los términos "polipéptido" y "péptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por compuestos distintos de aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de manera natural o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces de disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales), así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

Los términos "residuo de aminoácido" y "aminoácido" se usan de manera intercambiable y significan, en el contexto de un polipéptido, un aminoácido que participa en uno o más enlaces peptídicos del polipéptido. En general, las abreviaturas usadas en el presente documento para designar los aminoácidos se basan en recomendaciones de la comisión sobre nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB (véase *Biochemistry* (1972) 11:1726-1732). Por ejemplo, Met, Ile, Leu, Ala y Gly representan "residuos" de metionina, isoleucina, leucina, alanina y glicina, respectivamente. Por residuo quiere decirse un radical derivado del  $\alpha$ -aminoácido correspondiente eliminando la porción de OH del grupo carboxilo y la porción de H del grupo  $\alpha$ -amino. El término "cadena lateral de aminoácido" es la parte de un aminoácido exclusiva de la porción de  $-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ , tal como se define por K. D. Kopple, "Peptides and Amino Acids", W. A. Benjamin Inc., Nueva York y Ámsterdam, 1966, páginas 2 y 33.

En su mayor parte, los aminoácidos usados en la aplicación de esta invención tal como se define en las reivindicaciones son los aminoácidos que se producen de manera natural encontrados en proteínas, o los productos anabólicos o catabólicos que se producen de manera natural de tales aminoácidos que contienen grupos amino y carboxilo. Las cadenas laterales de aminoácido particularmente adecuadas incluyen cadenas laterales seleccionadas de las de los siguientes aminoácidos: glicina, alanina, valina, cisteína, leucina, isoleucina, serina, treonina, metionina, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, asparagina, lisina, arginina, prolina, histidina, fenilalanina, tirosina, y triptófano, y los aminoácidos y análogos de aminoácidos que se han identificado como constituyentes de paredes celulares bacterianas de peptidoglicano.

Los residuos de aminoácido que tienen "cadenas laterales básicas" incluyen Arg, Lys e His. Los residuos de aminoácido que tienen "cadenas laterales ácidas" incluyen Glu y Asp. Los residuos de aminoácido que tienen "cadenas laterales polares neutras" incluyen Ser, Thr, Asn, Gln, Cys y Tyr. Los residuos de aminoácido que tienen "cadenas laterales no polares neutras" incluyen Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Met, Pro, Trp y Phe. Los residuos de aminoácido que tienen "cadenas laterales alifáticas no polares" incluyen Gly, Ala, Val, Ile y Leu. Los residuos de aminoácido que tienen "cadenas laterales hidrófobas" incluyen Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr y Trp. Los residuos de aminoácido que tienen "cadenas laterales hidrófobas pequeñas" incluyen Ala y Val. Los residuos de aminoácido



que tienen "cadenas laterales aromáticas" incluyen Tyr, Trp y Phe.

El término residuo de aminoácido incluye además análogos, derivados y congéneres de cualquier aminoácido específico mencionado en el presente documento, dado que, por ejemplo, los polipéptidos objeto tales como compuestos de tipo Affimer (particularmente si se generan mediante síntesis química) pueden incluir un análogo de aminoácido tal como, por ejemplo, cianoalanina, canavanina, ácido djencólico, norleucina, 3-fosfoserina, homoserina, dihidroxi-fenilalanina, 5-hidroxitriptófano, 1-metilhistidina, 3-metilhistidina, ácido diaminiopimélico, ornitina, o ácido diaminobutírico. Los expertos en la técnica reconocerán otros metabolitos o precursores de aminoácidos que se producen de manera natural que tienen cadenas laterales que son adecuadas en el presente documento.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácido que son iguales, cuando se comparan y se alinean (introduciendo huecos, si es necesario) para una correspondencia máxima, sin tener en cuenta ninguna sustitución de aminoácido conservativa como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad puede medirse usando software o algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. En la técnica se conocen bien diversos algoritmos y software que pueden usarse para obtener alineaciones de secuencias de aminoácidos o de nucleótidos. Incluyen, pero no se limitan a, BLAST, ALIGN, Megalign, BestFit, paquete GCG Wisconsin, y variantes de los mismos. En algunas realizaciones, dos ácidos nucleicos o polipéptidos de la invención tal como se define en las reivindicaciones son sustancialmente idénticos, lo que significa que tienen al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, y en algunas realizaciones al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % de identidad de nucleótidos o residuos de aminoácido, cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima, tal como se mide usando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. En algunas realizaciones, existe identidad a lo largo de una región de las secuencias de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 10 residuos, al menos aproximadamente 20 residuos, al menos aproximadamente 40-60 residuos, al menos aproximadamente 60-80 residuos de longitud o cualquier valor integral entre los mismos. En algunas realizaciones, existe identidad a lo largo de una región de más de 60-80 residuos, tal como al menos aproximadamente 80-100 residuos, y en algunas realizaciones las secuencias son sustancialmente idénticas a lo largo de la longitud completa de las secuencias que están comparándose, tal como la región codificante de una proteína diana o un anticuerpo. En algunas realizaciones, existe identidad a lo largo de una región de las secuencias de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente 10 bases, al menos aproximadamente 20 bases, al menos aproximadamente 40-60 bases, al menos aproximadamente 60-80 bases de longitud o cualquier valor integral entre los mismos. En algunas realizaciones, existe identidad a lo largo de una región de más de 60-80 bases, tal como al menos aproximadamente 80-100 bases o más, y en algunas realizaciones las secuencias son sustancialmente idénticas a lo largo de la longitud completa de las secuencias que están comparándose, tal como una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína de interés.

Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que se sustituye un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares se han definido de manera general en la técnica, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservativa. Generalmente, las sustituciones conservativas en las secuencias de los polipéptidos, proteínas solubles, y/o anticuerpos usados en la invención no eliminan la unión del polipéptido, proteína soluble, o anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos, al sitio de unión diana. En la técnica se conocen bien métodos de identificación de sustituciones conservativas de aminoácido que no eliminan la unión.

Un polipéptido, proteína soluble, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o composición que está "aislado" es un polipéptido, proteína soluble, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o composición que está en una forma no encontrada en la naturaleza. Los polipéptidos, proteínas solubles, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, células, o composiciones aislados incluyen aquellos que se han purificado hasta un grado en el que ya no están en una forma en la que se encuentran en la naturaleza. En algunas realizaciones, un polipéptido, proteína soluble, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o composición que está aislado es sustancialmente puro.

El término "sustancialmente puro" tal como se usa en el presente documento se refiere a material que es puro (es decir, libre de contaminantes) en al menos el 50 %, puro en al menos el 90 %, puro en al menos el 95 %, puro en al menos el 98 %, o puro en al menos el 99 %.

El término "proteína de fusión" o "polipéptido de fusión" tal como se usa en el presente documento se refiere a una proteína híbrida expresada por una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos de al menos dos genes.

El término “ligador” o “región de ligador” tal como se usa en el presente documento se refiere a un ligador insertado entre un primer polipéptido (por ejemplo, copias de un compuesto de tipo Affimer) y un segundo polipéptido (por ejemplo, otro compuesto de tipo Affimer, un dominio Fc, un dominio de unión a ligando, etc.). En algunas realizaciones, el ligador es un ligador peptídico. Los ligadores no deben afectar de manera adversa a la expresión, secreción, o bioactividad de los polipéptidos. Preferiblemente, los ligadores no son antigénicos y no provocan una respuesta inmunitaria.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” y “molécula de ácido nucleico” se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa.

Tal como se usa en el presente documento, el término “molécula de ácido nucleico que codifica para”, “secuencia de ADN que codifica para”, y “ADN que codifica para” se refieren al orden o secuencia de nucleótidos a lo largo de una cadena de desoxirribonucleótidos de ácido desoxirribonucleico. El orden de estos desoxirribonucleótidos determina el orden de aminoácidos a lo largo de la cadena de polipéptido (proteína). Por tanto, una secuencia de ácido nucleico codifica para la secuencia de aminoácidos.

Cuando se usa con referencia a secuencias de nucleótidos, “secuencia” tal como se usa en el presente documento, las formas gramaticales y otras formas del término pueden comprender ADN o ARN, y pueden ser monocatenarias o bicatenarias. Las secuencias de ácido nucleico pueden mutarse. Las secuencias de ácido nucleico pueden tener cualquier longitud, por ejemplo de 2 a 100.000 o más nucleótidos (o cualquier valor integral superior o entre medias) por ácido nucleico, por ejemplo una longitud de desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 10.000, o desde aproximadamente 200 nucleótidos hasta aproximadamente 500 nucleótidos.

El término “vector” tal como se usa en el presente documento significa un constructo, que es capaz de suministrar, y habitualmente expresar, uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, plásmido, cósmido, o vectores de fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, y vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “transfección” se refiere a un ácido nucleico exógeno en una célula eucariota. La transfección puede lograrse mediante diversos medios conocidos en la técnica, incluyendo coprecipitación de fosfato de calcio-ADN, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por polibreno, electroporación, microinyección, fusión de liposoma, lipofección, fusión de protoplasto, infección retroviral, y tecnología biolística (biolística).

El término “portador” tal como se usa en el presente documento es un ácido nucleico aislado que comprende el ácido nucleico aislado que puede usarse para suministrar una composición al interior de la célula. En la técnica se conocen varios portadores incluyendo, pero sin limitarse a, los polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos, y virus. Por tanto, el término “vector” incluye un plásmido o virus de replicación autónoma. También debe interpretarse que el término incluye facilitar la transferencia de ácido nucleico al interior de células de los compuestos distintos de plásmido y no virales, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas, y similares. Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales y similares.

Tal como se usa en el presente documento, el término “vector de expresión” se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende una secuencia de control de la expresión y una secuencia de nucleótidos que va a expresarse operativamente unida. El vector de expresión comprende suficientes elementos de acción en cis (elementos de acción en cis) usados para la expresión; otros elementos para la expresión pueden suministrarse por la célula huésped o el sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados).

Tal como se usa en el presente documento, el término “operativamente unido” se refiere a unión funcional entre la secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga está conectada a una conexión da como resultado la expresión de esta última. Por ejemplo, cuando la primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de ácido nucleico es una relación funcional entre la primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico está operativamente unida. Por ejemplo, si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante, el promotor está operativamente unido a una secuencia codificante. Normalmente, la secuenciación de ADN operativamente unida son contiguas, y unir dos regiones que codifican para proteína en el mismo marco de lectura según sea necesario.

Tal como se usa en el presente documento, el término “promotor” se define como secuencia de ADN de promotor reconocida por la maquinaria de síntesis requerida para la maquinaria de síntesis de la transcripción específica de célula de una secuencia de polinucleótido o introducida.

El término “expresión constitutiva” tal como se usa en el presente documento se refiere a todo lo expresado en condiciones fisiológicas.

El término “expresión inducible” tal como se usa en el presente documento se refiere a la expresión en determinadas condiciones, tales como activación (o inactivación) de una ruta de señalización intracelular o el contacto de las células que albergan el constructo de expresión con una molécula pequeña que regula la expresión (o el grado de expresión) de un gen operativamente unido a un promotor inducible sensible a la concentración de la molécula pequeña.

El término “electroporación” se refiere al uso de un impulso de campo eléctrico transmembrana para inducir rutas microscópicas (poros) en una biomembrana; su presencia permite que biomoléculas tales como plásmidos u otro oligonucleótido pasen desde un lado de la membrana celular hasta el otro.

De manera adecuada, los polipéptidos de la invención tal como se define en las reivindicaciones comprenden las secuencias de aminoácidos tal como se describen en el presente documento. De manera adecuada, los polipéptidos de la invención tal como se define en las reivindicaciones consisten esencialmente en las secuencias de aminoácidos tal como se describen en el presente documento. De manera adecuada, los polipéptidos de la invención tal como se define en las reivindicaciones consisten en las secuencias de aminoácidos tal como se describen en el presente documento.

## II. Proteínas de fusión - General

En algunas realizaciones, los polipéptidos de tipo Affimer pueden comprender además una o más secuencias de polipéptido adicionales en uno o ambos extremos de la secuencia de tipo Affimer que modulan la actividad biológica del polipéptido de tipo Affimer. Por ejemplo, las adiciones pueden modular una o más propiedades o actividades de compuesto de tipo Affimer modificado tales como afinidad, por ejemplo, para unirse a, e inhibir, una molécula diana, modular la semivida en circulación, modular la semivida terapéutica, modular la estabilidad del polipéptido de tipo Affimer, modular la escisión mediante proteasas, modular la dosis, modular la liberación o biodisponibilidad, facilitar la purificación, reducir la desamidación, mejorar la vida útil de almacenamiento, o mejorar o alterar una vía de administración particular. De manera similar, los polipéptidos de tipo Affimer pueden comprender secuencias de escisión de proteasa, grupos reactivos, dominios de unión a anticuerpo (incluyendo, pero sin limitarse a, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en afinidad (incluyendo, pero sin limitarse a, FLAG, poli-His, GST, etc.) o moléculas unidas (incluyendo, pero sin limitarse a, biotina) que mejoran la detección, purificación u otros rasgos del polipéptido.

Por consiguiente, en determinados aspectos de la invención tal como se define en las reivindicaciones, el polipéptido de tipo Affimer es una proteína de fusión que tiene al menos una secuencia de polipéptido de tipo Affimer y una o más secuencias de polipéptido heterólogas (“dominio de fusión” en el presente documento). Un dominio de fusión puede seleccionarse para conferir una propiedad deseada, tal como secreción a partir de una célula o retención en la superficie celular (es decir, para compuestos de tipo Affimer codificados), para servir como sustrato u otras secuencias de reconocimiento para modificaciones postraduccionales, para crear estructuras multiméricas que se agregan mediante interacciones proteína-proteína, para alterar (con frecuencia para prolongar) la semivida en suero, o para alterar la localización tisular o exclusión tisular y otras propiedades de ADME, simplemente como ejemplos.

Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento y/o la purificación de las proteínas de fusión, tal como mediante cromatografía de afinidad. Los ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión que facilitan la expresión o purificación incluyen, simplemente como ilustración, etiquetas de afinidad tales como polihistidina (es decir, una etiqueta de His<sub>6</sub>), etiqueta de Strep II, etiqueta de péptido de unión a estreptavidina (SBP), péptido de unión a calmodulina (CBP), glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa (MBP), etiqueta S, etiqueta HA, etiqueta c-Myc, tiorredoxina, proteína A y proteína G.

Con el fin de secretar el polipéptido de tipo Affimer, generalmente contendrá una secuencia señal que dirige el transporte de la proteína a la luz del retículo endoplasmático y en última instancia para secretarse (o retenerse en la superficie celular si es un dominio transmembrana u otra señal de retención en superficie celular). Las secuencias señal (también denominadas péptidos señal o secuencias líder) están ubicadas en el extremo N-terminal de polipéptidos nacientes. Dirigen el polipéptido al retículo endoplasmático y las proteínas se clasifican a sus destinos, por ejemplo, al espacio interno de un orgánulo, a una membrana interior, a la membrana celular externa, o al exterior de la célula mediante secreción. La mayoría de las secuencias señal se escinden de la proteína mediante una señal peptidasa tras transportarse las proteínas al retículo endoplasmático. La escisión de la secuencia señal a partir del polipéptido se produce habitualmente en un sitio específico en la secuencia de aminoácidos y depende de residuos de aminoácido dentro de la señal secuencia.

En algunas realizaciones, el péptido señal tiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos de longitud (tal como de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, de aproximadamente 7 a aproximadamente 10, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15, de aproximadamente 15 a aproximadamente 20, de aproximadamente

20 a aproximadamente 25, o de aproximadamente 25 a aproximadamente 30, de aproximadamente 30 a aproximadamente 35, o de aproximadamente 35 a aproximadamente 40 aminoácidos de longitud).

En algunas realizaciones, el péptido señal es un péptido señal nativo de una proteína humana. En otras realizaciones, el péptido señal es un péptido señal no nativo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el péptido señal no nativo es un péptido señal nativo mutante de la proteína humana secretada nativa correspondiente, y puede incluir una o más (tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 o más) sustituciones, inserciones o deleciones.

En algunas realizaciones, el péptido señal es un péptido señal o mutante del mismo de una inmunoglobulina (tal como cadena pesada de IgG o cadena ligera de IgG-kappa), una citocina (tal como interleucina 2 (IL-2), o CD33), una proteína de albúmina sérica (por ejemplo HSA o albúmina), una secuencia señal de preproteína de azurocidina humana, una luciferasa, un tripsinógeno (por ejemplo, quimiotripsinógeno o tripsinógeno) u otro péptido señal capaz de secretar de manera eficiente una proteína a partir de una célula. Los péptidos señal a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a:

Proteína nativa	Secuencia señal
HSA	MKWVTFISLLFLFSSAYS SEQ ID NO: 25
Cadena ligera de Ig kappa	MDMRAPAGIFGFLLVFPGYRS SEQ ID NO: 26
Preproteína de azurocidina humana	MTRLTVLALLAGLLASSRA SEQ ID NO: 27
Cadena pesada de IgG	MELGLSWIFLLAILKGVQC SEQ ID NO: 28
Cadena pesada de IgG	MELGLRWVFLVAILEGVQC SEQ ID NO: 29
Cadena pesada de IgG	MKHLWFFLLLVAAAPRWVLS SEQ ID NO: 30
Cadena pesada de IgG	MDWTWRILFLVAAATGAHS SEQ ID NO: 31
Cadena pesada de IgG	MDWTWRFLFVVAATGVQS SEQ ID NO: 32
Cadena pesada de IgG	MEFGLSWLFLVAILKGVQC SEQ ID NO: 33
Cadena pesada de IgG	MEFGLSWVFLVALFRGVQC SEQ ID NO: 34
Cadena pesada de IgG	MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAAPRWVLS SEQ ID NO: 35
Ligera de IgG Kappa	MDMRVPAQLLGLLLWLSGARC SEQ ID NO: 36
Ligera de IgG Kappa	MKILLPTAAAGLLLLAAQPAMA SEQ ID NO: 37
Luciferasa de <i>Gaussia</i>	MGVKVLFALICIAVAEA SEQ ID NO: 38
Albúmina humana	MKWVTFISLLFLFSSAYS SEQ ID NO: 39
Quimiotripsinógeno humano	MAFLWLLSCWALLGTTTFG SEQ ID NO: 40
Interleucina 2 humana	MQLLSIALILALV SEQ ID NO: 41
Tripsinógeno 2 humano	MNLLLILTFVAAVA SEQ ID NO: 42
CD33 humano	MPLLLLPLWAGALA SEQ ID NO: 43
Prolactina	MDSKGSSQKGSRLLLLVSNNLLCQGVVS SEQ ID NO: 44
tPA humano	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPS SEQ ID NO: 45
Sintética/consenso	MLLLLLLLLLLALALA SEQ ID NO: 46
Sintética/consenso	MWWRLWWLLLLLLLWPMVWA SEQ ID NO: 47

En algunas realizaciones de un polipéptido de tipo Affimer secretado, el polipéptido recombinante comprende un péptido señal cuando se expresa, y el péptido señal (o una porción del mismo) se escinde a partir del polipéptido de tipo Affimer tras la secreción.

Las proteínas de fusión objeto también pueden incluir uno o más ligadores que separan dominios o secuencias de proteínas heterólogas. Tal como se usa en el presente documento, el término "ligador" se refiere a una secuencia de aminoácidos de ligador insertada entre un primer polipéptido (por ejemplo, un compuesto de tipo Affimer) y un segundo polipéptido (por ejemplo, un segundo compuesto de tipo Affimer, una región Fc, una trampa de receptor, albúmina, etc.). Los ligadores empíricos diseñados por investigadores se clasifican generalmente en 3 categorías según sus estructuras: ligadores flexibles, ligadores rígidos, y ligadores escindibles *in vivo*. Además de la función básica en la unión de los dominios funcionales entre sí (como en ligadores flexibles y rígidos) o liberación de dominio funcional libre *in vivo* (como en ligadores escindibles *in vivo*), los ligadores pueden ofrecer muchas otras ventajas para la producción de proteínas de fusión, tales como mejorar la actividad biológica, aumentar el rendimiento de expresión, y lograr perfiles farmacocinéticos deseables. Los ligadores no deben afectar adversamente a la expresión, secreción, o bioactividad de la proteína de fusión. Los ligadores no deben ser antigénicos y no deben provocar una respuesta inmunitaria.

Los expertos en la técnica conocen ligadores adecuados y con frecuencia incluyen mezclas de residuos de glicina y serina y con frecuencia incluyen aminoácidos que no presentan impedimento estérico. Otros aminoácidos que pueden incorporarse en ligadores útiles incluyen residuos de treonina y alanina. La longitud de los ligadores puede oscilar, por ejemplo, desde 1-50 aminoácidos de longitud, 1-22 aminoácidos de longitud, 1-10 aminoácidos de longitud, 1-5 aminoácidos de longitud, o 1-3 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el ligador puede comprender un sitio de escisión. En algunas realizaciones, el ligador puede comprender un sitio de escisión enzimático, de modo que el segundo polipéptido puede separarse del primer polipéptido.

En determinadas realizaciones preferidas, el ligador puede caracterizarse como flexible. Los ligadores flexibles se aplican habitualmente cuando los dominios unidos requieren un determinado grado de movimiento o interacción. Generalmente están compuestos por aminoácidos pequeños, no polares (por ejemplo Gly) o polares (por ejemplo Ser o Thr). Véase, por ejemplo, Argos P. (1990) "An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion" J Mol Biol. 211:943-958. El tamaño pequeño de estos aminoácidos proporciona flexibilidad y permite movilidad de los dominios funcionales de conexión. La incorporación de Ser o Thr puede mantener la estabilidad del ligador en disoluciones acuosas formando enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua, y, por tanto, reduce la interacción desfavorable entre los restos de ligador y de proteína. Los ligadores flexibles más habitualmente usados tienen secuencias que consisten principalmente en tramos de residuos de Gly y Ser (ligador de "GS"). Un ejemplo del ligador flexible más ampliamente usado tiene la secuencia de (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub>. Ajustando el número de copias "n", puede optimizarse la longitud de este ligador de GS para lograr una separación apropiada de los dominios funcionales, o para mantener interacciones entre dominios necesarias, y es preferiblemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. Además de los ligadores de GS, se han diseñado muchos otros ligadores flexibles para proteínas de fusión recombinantes. Estos ligadores flexibles también son ricos en aminoácidos pequeños o polares tales como Gly y Ser, pero pueden contener aminoácidos adicionales tales como Thr y Ala para mantener la flexibilidad, así como aminoácidos polares tales como Lys y Glu para mejorar la solubilidad.

En determinadas realizaciones preferidas, el ligador puede caracterizarse como rígido. Aunque los ligadores flexibles tienen la ventaja de conectar los dominios funcionales de manera pasiva y permitir cierto grado de movimientos, la falta de rigidez de estos ligadores puede ser una limitación en determinadas realizaciones de proteína de fusión, tales como en el rendimiento de expresión o la actividad biológica. La ineficacia de ligadores flexibles en estos casos se atribuyó a una separación ineficiente de los dominios de proteína o reducción insuficiente de su interferencia entre sí. En estas situaciones, se han aplicado satisfactoriamente ligadores rígidos para mantener una distancia fija entre los dominios y para mantener sus funciones independientes.

Muchos ligadores naturales mostraron estructuras de hélice  $\alpha$ . La estructura de hélice  $\alpha$  era rígida y estable, con enlaces de hidrógeno dentro del segmento y una estructura principal estrechamente empaquetada. Por tanto, los ligadores de hélice  $\alpha$  rígidos pueden actuar como separadores rígidos entre dominios de proteína. George *et al.* (2002) "An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding" Protein Eng. 15(11): 871-9. En general, los ligadores rígidos muestran estructuras relativamente rígidas al adoptar estructuras de hélice  $\alpha$  o al contener múltiples residuos de Pro. En cualquier circunstancia, separan los dominios funcionales de manera más eficiente que los ligadores flexibles. La longitud de los ligadores puede ajustarse fácilmente cambiando el número de copias para lograr una distancia óptima entre dominios. Como resultado, se eligen ligadores rígidos cuando la separación espacial de los dominios es crítica para conservar la estabilidad o bioactividad de las proteínas de fusión. Con respecto a esto, se han aplicado ligadores que forman hélice alfa con la secuencia de (EAAAK)<sub>n</sub> (en la que n es preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) a la construcción de muchas proteínas de fusión recombinantes. Otro tipo de ligadores rígidos tiene una secuencia rica en Pro, (XP)<sub>n</sub>, designando X cualquier aminoácido, preferiblemente Ala, Lys, o Glu y n es preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10.

Simplemente como ilustración, los ligadores a modo de ejemplo incluyen:

Flexible	(GGGGS) <sub>n</sub> (es decir, n = 1-6)	SEQ ID NO: 48
Flexible	(Gly) <sub>8</sub>	SEQ ID NO: 49
Flexible	(Gly) <sub>6</sub>	SEQ ID NO: 50
Flexible	KESGSVSSEQLAQFRSLD	SEQ ID NO: 51
Flexible	EGKSSGSGSESKST	SEQ ID NO: 52
Flexible	GSAGSAAGSGEF	SEQ ID NO: 53
Rígido	(EAAAK) <sub>n</sub> (es decir, n = 1-6)	SEQ ID NO: 54
Rígido	A(EAAAK) <sub>4</sub> ALEA(EAAAK) <sub>4</sub> A	SEQ ID NO: 55
Rígido	PAPAP	SEQ ID NO: 56
Rígido	AEAAAKEAAKA	SEQ ID NO: 57
Rígido	(Ala-Pro) <sub>n</sub> (de 10 a 34 aa)	SEQ ID NO: 58

Otros ligadores que pueden usarse en las proteínas de fusión objeto incluyen, pero no se limitan a, SerGly, GGSG (SEQ ID NO: 59), GSGS (SEQ ID NO: 60), GGGG (SEQ ID NO: 61), S(GGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 62) en el que n es 1-7, GRA, poli(Gly), poli(Ala), GGGSGGG (SEQ ID NO: 63), ESGGGGV (SEQ ID NO: 64), LESGGGGVT (SEQ ID NO: 65), GRAQVT (SEQ ID NO: 66), WRAQVT (SEQ ID NO: 67), y ARGRAQVT (SEQ ID NO: 68). Estas regiones de bisagra de las fusiones de Fc descritas a continuación también pueden considerarse ligadores.

Pueden emplearse diversos elementos para anclar proteínas en la membrana plasmática de células. Por ejemplo, los dominios transmembrana (TM) de proteínas de membrana integrales de tipo I (orientadas con el extremo N-terminal fuera de la célula) y de tipo II (orientadas con el extremo N-terminal en el citosol) pueden usarse para dirigir proteínas quiméricas a la membrana plasmática. También pueden unirse proteínas a la superficie celular mediante fusión de una señal de GPI (lípidos de glicofosfatidilinositol) al extremo 3' de genes. La escisión del péptido carboxi-terminal corto permite la unión de un glicolípidos al extremo C-terminal recién expuesto mediante una unión amida.

Véase Udenfriend *et al.* (1995) "How Glycosylphosphatidylinositol Anchored Membrane Proteins are Made" *Annu Rev Biochem* 64:563-591.

En determinadas realizaciones, la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptido transmembrana (un dominio transmembrana). Las características distintivas de polipéptidos transmembrana apropiados comprenden la capacidad de expresarse en la superficie de la célula en la que va a presentarse el polipéptido de tipo Affimer. En determinadas realizaciones, puede ser una célula inmunitaria, en particular células de linfocitos o linfocitos citotóxicos naturales (NK), y una vez ahí interaccionar con una célula tumoral que expresa una característica de superficie celular a la que se une el polipéptido de tipo Affimer en la superficie de célula inmunitaria de modo que se dirige la respuesta celular de la célula inmunitaria contra una célula tumoral diana predefinida. El dominio transmembrana puede derivarse de una fuente o bien natural o bien sintética. El dominio transmembrana puede derivarse de cualquier proteína unida a membrana o transmembrana. Como ejemplos no limitativos, el polipéptido transmembrana puede ser una subunidad del receptor de células T tal como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  o  $\delta$ , polipéptido que constituye complejo CD3, receptor de IL2 p55 (cadena  $\alpha$ ), p75 (cadena  $\beta$ ) o cadena  $\gamma$ , cadena de subunidad de receptores de Fc, en particular receptor de Fey III o proteínas de CD. Alternativamente, el dominio transmembrana puede ser sintético y puede comprender de manera predominante residuos hidrófobos tales como leucina y valina.

En algunas otras realizaciones, el polipéptido de tipo Affimer es una proteína de fusión que incluye, además de un polipéptido de tipo Affimer, una secuencia que señala para la adición postraducciona de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Los anclajes de GPI son estructuras de glicolípido que se añaden tras la traducción al extremo C-terminal de muchas proteínas eucariotas. Esta modificación en el polipéptido de tipo Affimer provocará que se ancle (se una) en la superficie extracelular de la membrana celular de la célula en la que vuelve a expresarse el polipéptido de tipo Affimer como proteína recombinante (es decir, un compuesto de tipo Affimer codificado tal como se describe a continuación). En estas realizaciones, el dominio de anclaje de GPI es C-terminal con respecto a la secuencia de polipéptido de tipo Affimer, y preferiblemente se produce en el extremo C-terminal de la proteína de fusión.

En una realización, el dominio de anclaje de GPI es un polipéptido que señala la adición postraducciona de un anclaje de GPI cuando la proteína de fusión de la que forma parte se expresa en un sistema eucariota. La secuencia señal de anclaje de GPI consiste en un conjunto de aminoácidos pequeños en el sitio de adición de anclaje (el sitio  $\omega$ ) seguido por un separador hidrófilo y que termina en un tramo hidrófobo (Low, (1989) *FASEB J.* 3:1600-1608). La escisión de esta secuencia señal se produce en el ER antes de la adición de un anclaje con componentes centrales conservados pero con restos periféricos variables (Homans *et al.*, *Nature*, 333: 269-272 (1988)). El extremo C-terminal de una proteína anclada a GPI se une a través de un puente de fosfoetanolamina al glicano principal altamente conservado, manosa( $\alpha$ 1-2)manosa( $\alpha$ 1-6)manosa( $\alpha$ 1-4)glucosamina( $\alpha$ 1-6)mio-inositol. Una cola de fosfolípido une el anclaje de GPI a la membrana celular.

Los dominios de anclaje de GPI a modo de ejemplo que pueden usarse en las proteínas de fusión que contienen compuesto de tipo Affimer objeto incluyen:

SEQ ID NO: 69 SGTTS GTTRLLSGHTCFTLTGLLGTLVTMGLLT

SEQ ID NO: 70 SGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALI

SEQ ID NO: 71 SAPVLSAVATVGITIGVLARVALI

SEQ ID NO: 72 SSPDLSAGTAVSIMIGVLGAMALI

SEQ ID NO: 73 TLGGNSASYTFVSLIFS AVTLLLLC

SEQ ID NO: 74 SGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALI

La unión de anclaje de GPI puede lograrse mediante expresión de la proteína de fusión de tipo Affimer que contiene el dominio de anclaje de GPI en un sistema eucariota capaz de llevar a cabo modificaciones postraduccionales de GPI. Como con las proteínas de fusión de dominio transmembrana, las células humanas, incluyendo linfocitos y otras células implicadas en iniciar o fomentar un efecto antitumoral son capaces de hacerlo y pueden modificarse por ingeniería para expresar un compuesto de tipo Affimer codificado que incluye un dominio de anclaje de GPI con el fin de conservar la fusión que contiene compuesto de tipo Affimer expresado en la superficie de la célula modificada por ingeniería.

Todavía otras modificaciones que pueden realizarse en la propia secuencia de polipéptido de tipo Affimer o en un resto de polipéptido flanqueante previsto como parte de una proteína de fusión es una o más secuencias que son sitios para modificaciones postraduccionales mediante enzimas. Pueden incluir, pero no se limitan a, glicosilación, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación de unión de glicolípido, y similares.

a. *Modificar por ingeniería propiedades de PK y ADME*

En cierta realización, el polipéptido de tipo Affimer puede no tener una semivida y/o perfil de PK que sea óptimo para la vía de administración, tal como dosificación terapéutica parenteral. El término "semivida" se refiere a la cantidad de tiempo que tarda una sustancia, tal como un polipéptido de tipo Affimer de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones, en perder la mitad de su actividad o concentración farmacológica o fisiológica. La semivida biológica puede verse afectada por la eliminación, excreción, degradación (por ejemplo, enzimática) de la sustancia, o absorción y concentración en ciertos órganos o tejidos del cuerpo. En algunas realizaciones, la semivida biológica puede evaluarse determinando el tiempo que tarda la concentración en plasma sanguíneo de la sustancia en alcanzar la mitad de su nivel en estado estacionario ("semivida en plasma"). Para abordar este inconveniente, hay una variedad de estrategias generales para la prolongación de la semivida que se han usado en el caso de otros productos terapéuticos de proteínas, incluyendo la incorporación de restos de prolongación de la semivida como parte del polipéptido de tipo Affimer.

El término "resto de prolongación de la semivida" se refiere a un resto, dominio, o molécula farmacéuticamente aceptable covalentemente unido ("conjugado" o "fusionado") al polipéptido de tipo Affimer para formar los polipéptidos de tipo Affimer descritos en el presente documento, opcionalmente mediante un aminoácido no codificado de manera natural, directamente o mediante un ligador, que evita o mitiga la degradación proteolítica *in vivo* u otra modificación de reducción de la actividad del polipéptido de tipo Affimer, aumenta la semivida, y/o mejora o altera las propiedades farmacocinéticas o biofísicas incluyendo, pero sin limitarse a, aumentar la tasa de absorción, reducir la toxicidad, mejorar la solubilidad, reducir la agregación de proteínas, aumentar la actividad biológica y/o selectividad de diana del polipéptido de tipo Affimer modificado, aumentar la facilidad de fabricación, y/o reducir la inmunogenicidad del polipéptido de tipo Affimer modificado, en comparación con un compuesto de comparación tal como una forma conjugada del polipéptido de tipo Affimer modificado. El término "resto de prolongación de la semivida" incluye restos de prolongación de la semivida no proteicos, tales como un polímero soluble en agua tal como polietilenglicol (PEG) o PEG discreto, hidroxietil-almidón (HES), un lípido, un grupo acilo ramificado o no ramificado, un grupo acilo C8-C30 ramificado o no ramificado, un grupo alquilo ramificado o no ramificado, y un grupo alquilo C8-C30 ramificado o no ramificado; y restos de prolongación de la semivida proteicos, tales como albúmina sérica, transferrina, adnectinas (por ejemplo, adnectinas de unión a albúmina o de prolongación de la farmacocinética (PKE)), dominio Fc, y polipéptido no estructurado, tal como polipéptido XTEN y PAS (por ejemplo, secuencias de polipéptido conformacionalmente desordenadas compuestas por los aminoácidos Pro, Ala, y/o Ser), y un fragmento de cualquiera de los anteriores.

En determinadas realizaciones, el resto de prolongación de la semivida prolonga la semivida del polipéptido de tipo Affimer resultante que circula en suero sanguíneo de mamífero en comparación con la semivida de la proteína que no está conjugada de ese modo al resto (tal como con respecto al polipéptido de tipo Affimer solo). En algunas realizaciones, la semivida se prolonga en más de aproximadamente 1,2 veces, 1,5 veces, 2,0 veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, o 6,0 veces. En algunas realizaciones, la semivida se prolonga en más de 6 horas, más de 12 horas, más de 24 horas, más de 48 horas, más de 72 horas, más de 96 horas o más de 1 semana tras la administración *in vivo* en comparación con la proteína sin el resto de prolongación de la semivida.

Como medio de mostrar adicionalmente a modo de ejemplo, los restos de prolongación de la semivida que pueden usarse en la generación de polipéptidos de tipo Affimer de la invención tal como se define en las reivindicaciones incluyen:

- Fusión genética de la secuencia de tipo Affimer farmacológicamente activa a un dominio de proteína o proteína de semivida larga de manera natural (por ejemplo, fusión de Fc, fusión de transferrina [Tf], o fusión de albúmina. Véase, por ejemplo, Beck *et al.* (2011) "Therapeutic Fc-fusion proteins and peptides as successful alternatives to antibodies". MAbs. 3:1-2; Czajkowsky *et al.* (2012) "Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives". EMBO Mol Med. 4:1015-28; Huang *et al.* (2009) "Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and Mimetic body technology" Curr Opin Biotechnol. 2009;20:692-9; Keefe *et al.* (2013) "Transferrin fusion protein therapies: acetylcholine receptor-transferrin fusion protein as a model", en: Schmidt S, editor. Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: applications and challenges. Hoboken: Wiley; págs. 345-56; Weimer *et al.* (2013) "Recombinant albumin fusion proteins", en: Schmidt S, editor. Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: applications and challenges. Hoboken: Wiley; 2013. págs. 297-323; Walker *et al.* (2013) "Albumin-binding fusion proteins in the development of novel long-acting therapeutics", en: Schmidt S, editor. Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: applications and challenges. Hoboken: Wiley; 2013, págs. 325-43.
- Fusión genética de la secuencia de tipo Affimer farmacológicamente activa a un polipéptido inerte, por ejemplo, XTEN (también conocido como PEG recombinante o "rPEG"), un polímero de homoaminoácido (HAP; HAPilación), un polímero de prolina-alanina-serina (PAS; PASilación), o un péptido de tipo elastina (ELP; ELPilación). Véase, por ejemplo, Schellenberger *et al.* (2009) "A recombinant polypeptide extends the *in vivo* half-life of peptides and proteins in a tunable manner. Nat Biotechnol. 2009;27:1186-90; Schlapschly *et al.* Fusion of a recombinant antibody fragment with a homo-amino-acid polymer: effects on biophysical

properties and prolonged plasma half-life. *Protein Eng Des Sel.* 2007;20:273-84; Schlapschy (2013) PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng Des Sel.* 26:489-501. Floss *et al.* (2012) "Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application. *Trends Biotechnol.* 28:37-45. Floss *et al.* "ELP-fusion technology for biopharmaceuticals", en: Schmidt S, editor. *Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: application and challenges.* Hoboken: Wiley; 2013, págs. 372-98.

- Aumentar el radio hidrodinámico mediante conjugación química del péptido o proteína farmacológicamente activo a restos químicos de repetición, por ejemplo, a PEG (pegilación) o ácido hialurónico. Véase, por ejemplo, Caliceti *et al.* (2003) "Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates" *Adv Drug Delivery Rev.* 55:1261-77; Jevsevar *et al.* (2010) PEGylation of therapeutic proteins. *Biotechnol J* 5:113-28; Kontermann (2009) "Strategies to extend plasma half-lives of recombinant antibodies" *BioDrugs.* 23:93-109; Kang *et al.* (2009) "Emerging PEGylated drugs" *Expert Opin Emerg Drugs.* 14:363-80; y Mero *et al.* (2013) "Conjugation of hyaluronan to pproteins" *Carb Polymers.* 92:2163-70.
- Aumentar significativamente la carga negativa de fusionar el péptido o proteína farmacológicamente activo mediante polisialilación; o, alternativamente, (b) fusionar un péptido negativamente cargado, altamente sialilado (por ejemplo, péptido carboxi-terminal [CTP; de cadena b de gonadotropina coriónica (CG)]), que se sabe que prolonga la semivida de proteínas naturales tales como subunidad b de CG humana, al candidato de fármaco biológico. Véase, por ejemplo, Gregoriadis *et al.* (2005) "Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: a role for polysialic acids" *Int J Pharm.* 2005; 300:125-30; Duijkers *et al.* "Single dose pharmacokinetics and effects on follicular growth and serum hormones of a long-acting recombinant FSH preparation (FSHCTP) in healthy pituitary-suppressed females" (2002) *Hum Reprod.* 17:1987-93; y Fares *et al.* "Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotropin beta subunit to the follitropin beta subunit" (1992) *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:4304-8. 35; y Fares "Half-life extension through O-glycosylation".
- Unión no covalente, mediante unión de un dominio de unión a péptido o proteína a la proteína bioactiva, a proteínas de semivida normalmente larga tales como HSA, IgG humana, transferrina o fibronectina. Véase, por ejemplo, Andersen *et al.* (2011) "Extending half-life by indirect targeting of the neonatal Fc receptor (FcRn) using a minimal albumin binding domain" *J Biol Chem.* 286:5234-41; O'Connor-Semmes *et al.* (2014) "GSK2374697, a novel albumin-binding domain antibody (albudAb), extends systemic exposure of extendin-4: first study in humans-PK/PD and safety" *Clin Pharmacol Ther.* 2014;96:704-12. Sockolosky *et al.* (2014) "Fusion of a short peptide that binds immunoglobulin G to a recombinant protein substantially increases its plasma half-life in mice" *PLoS One.* 2014; 9:e102566.

Las fusiones genéticas clásicas a proteínas séricas de vida larga ofrecen un método alternativo de prolongación de la semivida distinto de la conjugación química a PEG o lípidos. Dos proteínas principales se han usado tradicionalmente como parejas de unión: dominios Fc de anticuerpo y albúmina sérica humana (HSA). Las fusiones de Fc implican la fusión de péptidos, proteínas o exodominios de receptor a la porción de Fc de un anticuerpo. Tanto las fusiones de Fc como las de albúmina logran semividas prolongadas no sólo aumentando el tamaño del fármaco peptídico, sino también aprovechando el mecanismo de reciclaje natural del cuerpo: el receptor de Fc neonatal, FcRn. La unión dependiente del pH de estas proteínas a FcRn evita la degradación de la proteína de fusión en el endosoma. Las fusiones basadas en estas proteínas pueden tener semividas en el intervalo de 3-16 días, mucho más largas que los péptidos pegilados o lipidados típicos. La fusión a dominios Fc de anticuerpo puede mejorar la solubilidad y estabilidad del fármaco peptídico o de proteína. Un ejemplo de una fusión de péptido-Fc es dulaglutida, n agonista de receptor de GLP-1 actualmente en ensayos clínicos en estadio final. La albúmina sérica humana, la misma proteína aprovechada por los péptidos acilados grasos, es la otra pareja de fusión popular. Albiglutida es un agonista de receptor de GLP-1 basado en esta plataforma. Una diferencia principal entre Fc y albúmina es la naturaleza dimérica de Fc frente a la estructura monomérica de HSA que conduce a la presentación de un péptido fusionado como dímero o monómero dependiendo de la elección de la pareja de fusión. La naturaleza dimérica de una fusión de compuesto de tipo Affimer-Fc puede producir un efecto de avidéz si la diana de tipo Affimer, tal como proteína de superficie celular en una célula diana, está separada de manera suficientemente próxima o son en sí mismos dímeros o multímeros de orden superior. Esto puede ser deseable o no dependiendo de la diana.

#### (i) Fusiones de Fc

En algunas realizaciones, el polipéptido de tipo Affimer puede formar parte de una proteína de fusión con un dominio Fc de inmunoglobulina ("dominio Fc"), o un fragmento o variante del mismo, tal como una región Fc funcional. En este contexto, una fusión de Fc ("fusión de Fc"), tal como un polipéptido de tipo Affimer creado como proteína de fusión de compuesto de tipo Affimer-Fc, es un polipéptido que comprende una o más secuencias de tipo Affimer covalentemente unidas a través de una estructura principal peptídica (directa o indirectamente) a una región Fc de una inmunoglobulina. Una fusión de Fc puede comprender, por ejemplo, la región Fc de un anticuerpo (lo cual facilita las funciones efectoras y farmacocinética) y una secuencia de tipo Affimer como parte del mismo polipéptido. También puede unirse una región Fc de inmunoglobulina indirectamente a uno o más compuestos de tipo Affimer.



En la técnica se conocen diversos ligadores y pueden usarse opcionalmente para unir un Fc a un polipéptido que incluye una secuencia de tipo Affimer para generar una fusión de Fc. En determinadas realizaciones, pueden dimerizarse fusiones de Fc para formar homodímeros de fusión de Fc, o usando dominios Fc no idénticos, para formar heterodímeros de fusión de Fc.

Hay varios motivos para elegir la región Fc de anticuerpos humanos para su uso en la generación de los polipéptidos de tipo Affimer objeto como proteínas de fusión de tipo Affimer. El principal fundamento es producir una proteína estable, lo suficientemente grande como para demostrar un perfil farmacocinético similar en comparación con los de anticuerpos, y aprovechar las propiedades conferidas por la región Fc; esto incluye la ruta de receptor FcRn neonatal de rescate que implica reciclaje mediado por FcRn de la proteína de fusión a la superficie celular tras la endocitosis, evitando la degradación lisosómica y dando como resultado la liberación de vuelta al torrente sanguíneo, contribuyendo por tanto a una semivida en suero prolongada. Otra ventaja evidente es la unión del dominio Fc a proteína A, lo cual puede simplificar el procesamiento aguas abajo durante la producción del polipéptido de tipo Affimer y permitir la generación de una preparación altamente pura del polipéptido de tipo Affimer.

En general, un dominio Fc incluirá la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de región constante. Por tanto, el dominio Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD, e IgG, y los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y la bisagra flexible N-terminal con respecto a esos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina C $\gamma$ 2 y C $\gamma$ 3 y la bisagra entre C $\gamma$ 1 y C $\gamma$ 2. Aunque los límites del dominio Fc pueden variar, habitualmente se define que la región Fc de cadena pesada de IgG humana comprende los residuos C226 o P230 hasta su extremo carboxil-terminal, en la que la numeración es según el índice UE tal como se expone en Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, NIH, Bethesda, Md. (1991)). Fc puede referirse a esta región de manera aislada, o a esta región en el contexto de un anticuerpo completo, fragmento de anticuerpo, o proteína de fusión de Fc. Se han observado polimorfismos en varias posiciones de Fc diferente y también se incluyen como dominios Fc tal como se usa en el presente documento.

En determinadas realizaciones, el Fc, tal como se usa en el presente documento, una "región Fc funcional", se refiere a un dominio Fc o fragmento del mismo que conserva la capacidad de unirse a FcRn. Una región Fc funcional se une a FcRn, pero no presenta función efectora. La capacidad de la región Fc o fragmento de la misma para unirse a FcRn puede determinarse mediante ensayos de unión convencionales conocidos en la técnica. Las "funciones efectoras" a modo de ejemplo incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc. Tales funciones efectoras pueden evaluarse usando diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras de anticuerpos.

En una realización a modo de ejemplo, el dominio Fc se deriva de una subclase de IgG1, sin embargo, también pueden usarse otras subclases (por ejemplo, IgG2, IgG3, e IgG4). Una secuencia a modo de ejemplo de un dominio Fc de inmunoglobulina IgG1 humana que puede usarse es:

```
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 75)
```

En algunas realizaciones, la región Fc usada en la proteína de fusión puede comprender la región de bisagra de una molécula de Fc. Una región de bisagra a modo de ejemplo comprende los residuos de bisagra principales que abarcan las posiciones 1-16 (es decir, DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 76)) de la secuencia de dominio Fc de inmunoglobulina IgG1 humana a modo de ejemplo proporcionada anteriormente. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión que contiene compuesto de tipo Affimer puede adoptar una estructura multimérica (por ejemplo, dímero) debido, en parte, a los residuos de cisteína en las posiciones 6 y 9 dentro de la región de bisagra de la secuencia de dominio Fc de inmunoglobulina IgG1 humana a modo de ejemplo proporcionada anteriormente. En otras realizaciones, la región de bisagra tal como se usa en el presente documento puede incluir además residuos derivados de las regiones CH1 y CH2 que flanquean la secuencia de bisagra principal de la secuencia de dominio Fc de inmunoglobulina IgG1 humana a modo de ejemplo proporcionada anteriormente. En aún otras realizaciones, la secuencia de bisagra puede comprender o consistir en GSTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 77) o EPKSCDKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 78).

En algunas realizaciones, la secuencia de bisagra puede incluir una o más sustituciones que confieren propiedades farmacocinéticas, biofísicas, y/o biológicas deseables. Algunas secuencias de bisagra a modo de ejemplo incluyen:

SEQ ID NO: 79 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS

SEQ ID NO: 80 EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS;

5 SEQ ID NO: 81 EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS;

SEQ ID NO: 82 EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS;

SEQ ID NO: 83 DKTHTCPPCPAPELLGGPS y

10 SEQ ID NO: 84 DKTHTCPPCPAPELLGGSS.

En una realización, el residuo P en la posición 18 de la secuencia de dominio Fc de inmunoglobulina IgG1 humana a modo de ejemplo proporcionada anteriormente puede sustituirse por S para eliminar la función efectora de Fc; esta sustitución se muestra a modo de ejemplo en bisagras que tienen las secuencias EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 85), EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 86), y DKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 87). En otra realización, los residuos DK en las posiciones 1-2 de la secuencia de dominio Fc de inmunoglobulina IgG1 humana a modo de ejemplo proporcionada anteriormente pueden sustituirse por GS para eliminar un posible sitio de clip; esta sustitución se muestra a modo de ejemplo en la secuencia EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 88). En otra realización, la C en la posición 103 de la región constante de cadena pesada de IgG1 human (es decir, los dominios CH1-CH3), puede sustituirse por S para evitar una formación de enlaces de cisteína inapropiada en ausencia de una cadena ligera; esta sustitución se muestra a modo de ejemplo mediante EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO: 89), EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 90), y EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 91).

En algunas realizaciones, Fc es un Fc de mamífero tal como un Fc humano, incluyendo dominios Fc derivados de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. La región Fc puede presentar al menos aproximadamente el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, o el 99 % de identidad de secuencia con respecto a una región Fc nativa y/o con respecto a una región Fc de un polipéptido original. En algunas realizaciones, la región Fc puede tener al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia con respecto a una región Fc nativa y/o con respecto a una región Fc de un polipéptido original.

En algunas realizaciones, el dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de los ejemplos proporcionados por las SEQ ID NO: 4-16. Debe entenderse que la lisina C-terminal de un dominio Fc es un componente opcional de una proteína de fusión que comprende un dominio Fc. En algunas realizaciones, el dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4 - 16, excepto porque se omite la lisina C-terminal de la misma.

hlgG1a\_191 [subtipo A] (SEQ ID NO: 4)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

hlgG1a\_189 [hlgG1a\_191 sin "GK" en el extremo C-terminal; subtipo A] (SEQ ID NO: 5)

DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

hlgG1a\_191b [subtipo A/F] (SEQ ID NO: 6)

DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

hlgG1f\_1.1\_191 [contiene 5 mutaciones puntuales para alterar la función de ADCC, subtipo F] (SEQ ID NO: 7)

DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

hlgG1f\_1.1\_186 [contiene 5 mutaciones puntuales para alterar la función de ADCC y C225S (numeración de Edlemen); subtipo F] (SEQ ID NO: 8)

hlgG1a\_(N297G)\_191 [subtipo A] (SEQ ID NO: 9)

hlgG1a\_190 [hlgG1a\_190 sin "K" en el extremo C-terminal; subtipo A] (SEQ ID NO: 10)

hlgG1a\_(N297Q)\_191 [subtipo A] (SEQ ID NO: 11)

hlgG1a\_(N297S)\_191 [subtipo A] (SEQ ID NO: 12)

hlgG1a\_(N297A)\_191 [subtipo A] (SEQ ID NO: 13)

hlgG1a\_(N297H)\_191 [subtipo A] (SEQ ID NO: 14)

hlgG4 (SEQ ID NO: 15)

hlgG4\_(S241P) (SEQ ID NO: 16)

```

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYHSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
DKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
DKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

La secuencia de tipo Affimer puede colocarse en el extremo o bien N-terminal o bien C-terminal del dominio Fc, y puede unirse directamente o la proteína de fusión puede tener otras secuencias de polipéptido intermedias entre el dominio Fc y la secuencia de polipéptido de tipo Affimer.

5

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretada unida a receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan

específicamente a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas.

En determinadas realizaciones, la proteína de fusión incluye una secuencia de dominio Fc para la que el polipéptido de tipo Affimer resultante no tiene ninguna ADCC y/o funcionalidad efectora o de activación de complemento (o las tiene reducidas). Por ejemplo, el dominio Fc puede comprender una región constante deshabilitada de manera natural de isotipo IgG2 o IgG4 o una región constante de IgG1 mutada. Se describen ejemplos de modificaciones adecuadas en el documento EP0307434. Un ejemplo comprende las sustituciones de residuos de alanina en las posiciones 235 y 237 (numeración de índice de EU).

En otras realizaciones, la proteína de fusión incluye una secuencia de dominio Fc para la que el polipéptido de tipo Affimer resultante conservará parte o la totalidad de la funcionalidad de Fc, por ejemplo será capaz de una o ambas de actividad ADCC y CDC, tal como, por ejemplo, si la proteína de fusión comprende el dominio Fc de IgG1 o IgG3 humana. Los niveles de la función efectora pueden hacerse variar según técnicas conocidas, por ejemplo mediante mutaciones en el dominio CH2, por ejemplo en la que el dominio CH2 de IgG1 tiene una o más mutaciones en posiciones seleccionadas de 239 y 332 y 330, por ejemplo las mutaciones se seleccionan de S239D e I332E y A330L de tal manera que el anticuerpo tiene una función efectora potenciada, y/o por ejemplo alterar el perfil de glicosilación de la proteína de unión a antígeno de la invención tal como se define en las reivindicaciones de tal manera que hay una reducción en fucosilación de la región Fc.

### (ii) Fusión de albúmina

En otras realizaciones, el polipéptido de tipo Affimer es una proteína de fusión que comprende, además de al menos una secuencia de tipo Affimer, una secuencia de albúmina o un fragmento de albúmina. En otras realizaciones, el polipéptido de tipo Affimer se conjuga a la secuencia de albúmina o a un fragmento de albúmina mediante unión química distinta de una incorporación en la secuencia de polipéptido que incluye el compuesto de tipo Affimer. En algunas realizaciones, la albúmina, variante de albúmina, o fragmento de albúmina es albúmina sérica humana (HSA), una variante de albúmina sérica humana, o un fragmento de albúmina sérica humana. Se encuentran proteínas séricas de albúmina comparables a HSA, por ejemplo, en macacos cangrejeros, vacas, perros, conejos y ratas. De las especies no humanas, la albúmina sérica bovina (BSA) es la más similar estructuralmente a HSA. Véase, por ejemplo, Kosa *et al.*, (2007) J Pharm Sci. 96(11):3117-24. La presente divulgación contempla el uso de albúmina de especies no humanas, incluyendo, pero sin limitarse a, secuencia de albúmina derivada de albúmina sérica de macaco cangrejero o albúmina sérica bovina.

La HSA madura, un polipéptido de 585 aminoácidos (aproximadamente 67 kDa) que tiene una semivida en suero de aproximadamente 20 días, es principalmente responsable del mantenimiento de la presión sanguínea osmótica coloidal, pH en sangre, y transporte y distribución de numerosos ligandos endógenos y exógenos. La proteína tiene tres dominios estructuralmente homólogos (dominios I, II y III), está casi totalmente en la conformación de hélice alfa, y está altamente estabilizada mediante 17 puentes disulfuro. En determinadas realizaciones preferidas, el polipéptido de tipo Affimer puede ser una proteína de fusión de albúmina que incluye una o más secuencias de polipéptido de tipo Affimer y la secuencia para albúmina sérica humana madura (SEQ ID NO: 17) o una variante o fragmento de la misma que mantiene las propiedades de PK y/o biodistribución de la albúmina madura hasta el grado deseado en la proteína de fusión.

```
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKL VNEVTEF
AKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPER
NECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHP
YFYAPELLFFAKRYKAAFT ECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQ
RLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVVHTEC
CHGDLLECADDRADLAKYI CENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVE
NDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV
VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL IKQNC
ELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHP
EAKRMPCAEDYLSVVLNQLC VLVHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSA
LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKA
TKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
```

(SEQ ID NO: 17)

La secuencia de albúmina puede salir de la secuencia de polipéptido de tipo Affimer u otras secuencias flanqueantes en el polipéptido de tipo Affimer mediante el uso de secuencias de ligador tal como se describió anteriormente.

Sin embargo, a menos que se indique lo contrario, se pretende que la referencia en el presente documento a

“albúmina” o a “albúmina madura” se refiera a HSA. Sin embargo, se observa que la HSA de longitud completa tiene un péptido señal de 18 aminoácidos (MKWVTFISLLFLFSSAYS) seguido por un pro-dominio de 6 aminoácidos (RGVFRR); este péptido de 24 residuos de aminoácido puede denominarse pre-pro-dominio. Las proteínas de fusión de compuesto de tipo Affimer-HSA pueden expresarse y secretarse usando el pre-pro-dominio de HSA en la secuencia que codifica para proteínas recombinantes. Alternativamente, la fusión de compuesto de tipo Affimer-HSA puede expresarse y secretarse mediante inclusión de otras secuencias de señal de secreción, tal como se describió anteriormente.

En realizaciones alternativas, en vez de proporcionarse como parte de una proteína de fusión con el polipéptido de tipo Affimer, el polipéptido de albúmina sérica puede acoplarse de manera covalente al polipéptido que contiene compuesto de tipo Affimer mediante un enlace distinto de un enlace amida de estructura principal, tal como reticularse mediante conjugación química entre cadenas laterales de aminoácidos en cada uno del polipéptido de albúmina y el polipéptido que contiene compuesto de tipo Affimer.

### (iii) Dominio de unión a albúmina

En determinadas realizaciones, el polipéptido de tipo Affimer puede incluir un resto de unión a suero, o bien como parte de una proteína de fusión (si también es un polipéptido) con la secuencia de polipéptido de tipo Affimer o bien químicamente conjugado a través de un sitio distinto de formar parte de una cadena de polipéptido contigua.

En determinadas realizaciones, el polipéptido de unión a suero es un resto de unión a albúmina. La albúmina contiene múltiples cavidades de unión hidrófobas y sirve de manera natural como transportador de una variedad de ligandos diferentes tales como ácidos grasos y esteroides así como diferentes fármacos. Además, la superficie de la albúmina está negativamente cargada haciendo que sea altamente soluble en agua.

El término “resto de unión a albúmina” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier grupo químico capaz de unirse a albúmina, es decir afinidad de unión a albúmina. La albúmina se une a ligandos endógenos tales como ácidos grasos; sin embargo, también interacciona con ligandos exógenos tales como warfarina, penicilina y diazepam. Dado que la unión de estos fármacos a albúmina es reversible, el complejo de albúmina-fármaco sirve como reservorio de fármaco que puede potenciar la biodistribución y biodisponibilidad de fármaco. Se ha usado la incorporación de componentes que imitan ligandos de unión a albúmina endógenos, tales como ácidos grasos, para potenciar la asociación de albúmina y aumentar la eficacia de fármacos.

En determinadas realizaciones, un método de modificación química que puede aplicarse en la generación de los polipéptidos de tipo Affimer objeto para aumentar la semivida de la proteína es la lipidación, que implica la unión covalente de ácidos grasos a cadenas laterales de péptidos. Originalmente concebida y desarrollada como método para prolongar la semivida de insulina, la lipidación comparte el mismo mecanismo básico de prolongación de la semivida que la pegilación, concretamente aumentar el radio hidrodinámico para reducir la filtración renal. Sin embargo, el resto de lípido es en sí mismo relativamente pequeño y el efecto está mediado indirectamente mediante la unión no covalente del resto de lípido a albúmina circulante. Una consecuencia de la lipidación es que reduce la solubilidad en agua del péptido, pero la modificación por ingeniería del ligador entre el péptido y el ácido graso puede modular esto, por ejemplo mediante el uso de glutamato o mini-PEG dentro del ligador. La modificación por ingeniería del ligador y variación del resto de lípido pueden afectar a la autoagregación lo cual puede contribuir a una semivida aumentada ralentizando la biodistribución, independientemente de la albúmina. Véase, por ejemplo, Jonassen *et al.* (2012) *Pharm Res.* 29(8):2104-14.

Otros ejemplos de restos de unión a albúmina para su uso en la generación de determinados polipéptidos de tipo Affimer incluyen adnectinas de unión a albúmina (PKE2) (véase el documento WO2011140086 “Serum Albumin Binding Molecules”, el documento WO2015143199 “Serum Albumin-binding Fibronectin Type III Domains” y el documento WO2017053617 “Fast-off rate serum albumin binding fibronectin type iii domains”), el dominio de unión a albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de la cepa G148 de *Streptococcus*, y el anticuerpo de dominio de unión a albúmina GSK2374697 (“AlbudAb”) o la porción de nanocuerpo de unión a albúmina de ATN-103 (ozoralizumab).

### (iv) Pegilación, XTEN, PAS y otros polímeros

Puede unirse una amplia variedad de polímeros macromoleculares y otras moléculas a los polipéptidos que contienen compuesto de tipo Affimer de la presente divulgación para modular las propiedades biológicas del polipéptido de tipo Affimer resultante, y/o proporcionar nuevas propiedades biológicas al polipéptido de tipo Affimer. Estos polímeros macromoleculares pueden unirse al polipéptido que contiene compuesto de tipo Affimer mediante un aminoácido codificado de manera natural, mediante un aminoácido no codificado de manera natural, o cualquier sustituyente funcional de un aminoácido natural o no natural, o cualquier grupo sustituyente o funcional añadido a un aminoácido natural o no natural. El peso molecular del polímero puede tener un amplio intervalo, incluyendo, pero sin limitarse a, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular del polímero puede ser de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo, pero sin limitarse a, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da,

9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, y 100 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da.

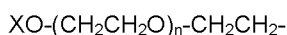
Con este propósito, se han desarrollado diversos métodos incluyendo pegilación, polisialilación, HESilación, glicosilación, o análogo de PEG recombinante fusionado a cadena de aminoácidos flexible e hidrófila (de 500 a 600 aminoácidos) (véase Chapman, (2002) *Adv Drug Deliv Rev.* 54, 531-545; Schlapschy *et al.*, (2007) *Prot Eng Des Sel.* 20, 273-283; Contermann (2011) *Curr Op Biotechnol.* 22, 868-876; Jevsevar *et al.*, (2012) *Methods Mol Biol.* 901, 233-246).

Los ejemplos de polímeros incluyen, pero no se limitan a, poli(ésteres alquílicos) y análogos de los mismos con los centros activos ocupados con alcóxido (por ejemplo, polioxietilenglicol, polioxietilen/propilenglicol, y análogos de los mismos con los centros activos ocupados con metóxido o etóxido, especialmente polioxietilenglicol, este último también se conoce como polietilenglicol o PEG); PEG discreto (dPEG); polivinilpirrolidonas; poli(ésteres vinilalquílicos); polioxazolin, polialquiloxazolin y polihidroalquiloxazolin; poliacrilamidas, polialquilacrilamidas, y polihidroalquilacrilamidas (por ejemplo, polihidropropilmetacrilamida y derivados de la misma); poli(acrilatos de hidroalquilo); poli(ácidos siálicos) y análogos de los mismos; secuencias de péptidos hidrófilos; polisacáridos y sus derivados, incluyendo dextrano y derivados de dextrano, por ejemplo, carboximetildextrano, sulfatos de dextrano, aminodextrano; celulosa y sus derivados, por ejemplo, carboximetilcelulosa, hidroalquilcelulosas; quitina y sus derivados, por ejemplo, quitosano, succinil-quitosano, carboximetilquitina, carboximetilquitosano; ácido hialurónico y sus derivados; almidones; alginatos; sulfato de condroitina; albúmina; pululano y carboximetil-pululano; poliaminoácidos y derivados de los mismos, por ejemplo, poli(ácidos glutámicos), polilisinas, poli(ácidos aspárticos), poliaspartamidas; copolímeros de anhídrido maleico tales como: copolímero de estireno-anhídrido maleico, copolímero de divinil etil éter-anhídrido maleico; poli(alcoholes vinílicos); copolímeros de los mismos; terpolímeros de los mismos; mezclas de los mismos; y derivados de los anteriores.

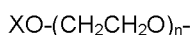
El polímero seleccionado puede ser soluble en agua de modo que el polipéptido de tipo Affimer al que está unido no precipita en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. El polímero soluble en agua puede tener cualquier forma estructural incluyendo, pero sin limitarse a, lineal, bifurcada o ramificada. Normalmente, el polímero soluble en agua es un polialquilenglicol, tal como polietilenglicol (PEG), pero también pueden emplearse otros polímeros solubles en agua.

A modo de ejemplo, se usa PEG para describir determinadas realizaciones de esta divulgación. Para uso terapéutico del polipéptido de tipo Affimer, el polímero puede ser farmacéuticamente aceptable.

El término "PEG" se usa de manera amplia para abarcar cualquier molécula de polietilenglicol, sin tener en cuenta el tamaño o la modificación en un extremo del PEG, y puede representarse como unido al polipéptido que contiene compuesto de tipo Affimer mediante la fórmula:



o



en la que n es de 2 a 10.000 y X es H o una modificación terminal, incluyendo, pero sin limitarse a, un alquilo C1-4, un grupo protector, o un grupo funcional terminal. En algunos casos, un PEG usado en los polipéptidos de la divulgación termina en un extremo con hidroxilo o metóxido, es decir, X es H o CH<sub>3</sub> ("metoxi-PEG").

Debe observarse que el otro extremo del PEG, que se muestra en las fórmulas anteriores mediante un terminal "-", puede unirse al polipéptido que contiene compuesto de tipo Affimer mediante un aminoácido que se produce de manera natural o no codificado de manera natural. Por ejemplo, la unión puede realizarse a través de una unión amida, carbamato o urea a un grupo amina (incluyendo, pero sin limitarse a, la épsilon-amina de lisina o el extremo N-terminal) del polipéptido. Alternativamente, el polímero se une mediante una unión maleimida a un grupo tiol (incluyendo el, pero sin limitarse al, grupo tiol de cisteína), que en el caso de unión a la secuencia de polipéptido de tipo Affimer en sí misma requiere alterar un residuo en la secuencia de tipo Affimer para dar una cisteína.

El número de polímeros solubles en agua unidos al polipéptido que contiene compuesto de tipo Affimer (es decir, el grado de pegilación o glicosilación) puede ajustarse para proporcionar una característica farmacológica, farmacocinética o farmacodinámica alterada (incluyendo, pero sin limitarse a, aumentada o reducida) tal como semivida *in vivo* en el polipéptido de tipo Affimer resultante. En algunas realizaciones, la semivida del polipéptido de

tipo Affimer resultante se aumenta en al menos aproximadamente el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 por ciento, 2 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 50 veces, o al menos aproximadamente 100 veces a lo largo de un polipéptido sin modificar.

Otra variación de sistema de polímero útil para modificar la PK u otras propiedades biológicas del polipéptido de tipo Affimer resultante es el uso de polímeros de aminoácidos hidrófilos no estructurados que son análogos funcionales de PEG, particularmente como parte de una proteína de fusión con la secuencia de polipéptido de tipo Affimer. La biodegradabilidad inherente de la plataforma de polipéptido hace que sea atractivo como alternativa posiblemente más benigna a PEG. Otra ventaja es la estructura molecular precisa de la molécula recombinante en contraste con la polidispersidad de PEG. A diferencia de las fusiones de péptidos de HSA y Fc, en las que se necesita conservar el plegamiento tridimensional de la pareja de fusión, las fusiones recombinantes a parejas no estructuradas pueden someterse, en muchos casos, a temperaturas superiores o condiciones duras tales como purificación mediante HPLC.

Uno de los más avanzados de esta clase de polipéptidos se denomina XTEN (Amunix) y tiene 864 aminoácidos de longitud y está compuesto por seis aminoácidos (A, E, G, P, S y T). Véase Schellenberger *et al.* "A recombinant polypeptide extends the *in vivo* half-life of peptides and proteins in a tuneable manner" 2009 Nat Biotechnol. 27(12):1186-90. Permitido por la naturaleza biodegradable del polímero, esto es mucho más grande que los PEG de 40 kDa normalmente usados y confiere una prolongación de la semivida simultáneamente mayor. La fusión de XTEN al polipéptido que contiene compuesto de tipo Affimer debe dar como resultado una prolongación de la semivida del polipéptido de tipo Affimer final en de 60 a 130 veces con respecto al polipéptido sin modificar.

Un segundo polímero basado en consideraciones conceptuales similares es PAS (XL-Protein GmbH). Schlapschy *et al.* "PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins" 2013 Protein Eng Des Sel. 26(8):489-501. Un polímero espiral aleatorio compuesto por un conjunto incluso más restringido de tan sólo tres aminoácidos sin carga pequeños, prolina, alanina y serina. Como con Fc, HAS y XTEN, la modificación con PAS puede codificarse genéticamente con la secuencia de polipéptido de tipo Affimer para producir una proteína de fusión en línea cuando se expresa.

#### *b. Proteínas de fusión multiespecíficas*

En determinadas realizaciones, el polipéptido de tipo Affimer es un polipéptido multiespecífico y/o multivalente que incluye, por ejemplo, un primer polipéptido de tipo Affimer que se une a una primera diana y al menos un dominio de unión adicional que se une a una segunda diana que es diferente de la primera diana, que puede ser una molécula totalmente diferente (bienespecífico) o el mismo tipo de molécula en el mismo sitio (multivalente) o la misma molécula pero en un sitio diferente (biparatópico o multiparatópico). El dominio de unión adicional puede ser una secuencia de polipéptido seleccionada, como ilustración, de una segunda secuencia de polipéptido de tipo Affimer (que puede ser igual o diferente de la primera secuencia de polipéptido de tipo Affimer), un anticuerpo o fragmento del mismo u otro polipéptido de unión a antígeno, una porción de unión a ligando de un receptor (tal como un polipéptido de trampa de receptor), un ligando de unión a receptor (tal como, una citocina, factor de crecimiento o similar), receptor de células T modificado por ingeniería, una enzima o fragmento catalítico de la misma, u otra secuencia de polipéptido que confiere algo

En determinadas realizaciones, el polipéptido de tipo Affimer incluye uno o más sitios de unión a antígeno de un anticuerpo. El polipéptido de tipo Affimer resultante puede ser una única cadena que incluye tanto la secuencia de tipo Affimer como la secuencia para el sitio de unión a antígeno de anticuerpo (tal como en el caso de un scFV), o puede ser un complejo de proteína multimérico tal como en el anticuerpo ensamblado con cadenas pesadas y/o ligeras a las que también se ha fusionado la secuencia del compuesto de tipo Affimer.

En algunas realizaciones con respecto a un polipéptido de tipo Affimer multiespecífico que comprende una inmunoglobulina de longitud completa, la fusión de la secuencia de polipéptido de tipo Affimer al anticuerpo conservará la función de Fc de la región Fc de la inmunoglobulina. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el polipéptido de tipo Affimer será capaz de unirse, mediante su porción de Fc, al receptor de Fc de células positivas para receptor de Fc. En algunas realizaciones adicionales, el polipéptido de tipo Affimer puede activar la célula positiva para receptor de Fc uniéndose a la célula positiva para receptor de Fc, iniciando o aumentando de ese modo la expresión de citocinas y/o antígenos coestimulantes. Además, el polipéptido de tipo Affimer puede transferir al menos una segunda señal de activación requerida para la activación fisiológica de la célula T a la célula T mediante los antígenos coestimulantes y/o citocinas.

En algunas realizaciones, como resultado de la unión de su porción de Fc a otras células que expresan receptores de Fc presentes en la superficie de células efectoras del sistema inmunitario, tales como células inmunitarias, hepatocitos, y células endoteliales, el polipéptido de tipo Affimer puede presentar función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), un mecanismo de defensa inmunitaria mediada por célula mediante el cual una célula efectora del sistema inmunitario somete a lisis de manera activa a una célula diana, cuyo antígeno de superficie de membrana se ha unido a un anticuerpo, y, por tanto, activar la muerte de células tumorales mediante

ADCC. En algunas realizaciones adicionales, el polipéptido de tipo Affimer es capaz de demostrar función de ADCC.

Tal como se describió anteriormente, aparte de la citotoxicidad mediada por Fc, la porción de Fc puede contribuir a mantener los niveles en suero del polipéptido de tipo Affimer, crítico para su estabilidad y persistencia en el cuerpo. Por ejemplo, cuando la porción de Fc se une a receptores de Fc en células endoteliales y en fagocitos, el polipéptido de tipo Affimer puede internalizarse y reciclarse de vuelta al torrente sanguíneo, potenciando su semivida dentro del cuerpo.

Las dianas a modo de ejemplo de los polipéptidos de tipo Affimer adicionales incluyen, pero no se limitan a, otra proteína de punto de control inmunitario, y receptor coestimulante inmunitario (particularmente si el/los compuesto(s) de tipo Affimer adicional(es) puede(n) reconocer el receptor coestimulante), un receptor, una citocina, un factor de crecimiento, o un antígeno asociado a tumor, simplemente como ilustración.

### c. Conjugados

Los polipéptidos de tipo Affimer objeto también pueden incluir uno o más restos funcionales destinados a conferir detectabilidad o actividad farmacológica adicional al polipéptido de tipo Affimer. Los restos funcionales para la detección son aquellos que pueden emplearse para detectar la asociación del polipéptido de tipo Affimer con una célula o tejido (tal como, una célula tumoral) *in vivo*. Los restos funcionales con actividad farmacológica son aquellos agentes que están destinados a suministrarse al tejido que expresa la diana del polipéptido de tipo Affimer y, al hacer esto, tienen una consecuencia farmacológica en los tejidos o células seleccionados como diana.

La presente divulgación proporciona polipéptidos de tipo Affimer que incluyen conjugados de sustancias que tienen una amplia variedad de grupos funcionales, sustituyentes o restos, incluyendo esos restos funcionales, pero sin limitarse a, un marcador; un colorante; una molécula de inmunoadhesión; un radionúclido; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un hidrato de carbono; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido; un dendrímero soluble en agua; una ciclodextrina; un ácido ribonucleico inhibidor; un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, un resto que contiene metal; un resto radioactivo; un grupo funcional novedoso; un grupo que interacciona de manera covalente o no covalente con otras moléculas; un resto fotoenjaulado; un resto excitable por radiación actínica; un resto fotoisomerizable; biotina; un derivado de biotina; un análogo de biotina; un resto que incorpora un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar unido a carbono; un agente activo para redox; un amino-tioácido; un resto tóxico; un resto marcado isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso en electrones; un grupo magnético; un grupo de intercalación; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; una molécula pequeña; un punto cuántico; un nanotransmisor; un radionucleótido; un radiotransmisor; un agente de captura de neutrones; o cualquier combinación de los anteriores, o cualquier otro compuesto o sustancia deseable.

### (i) Marcadores y restos detectables

Cuando el resto es un marcador detectable, puede ser un marcador fluorescente, marcador radioactivo, marcador enzimático o cualquier otro marcador conocido por el experto. En determinadas realizaciones, el resto funcional es un marcador detectable que puede incluirse como parte de un conjugado para formar determinados polipéptidos de tipo Affimer adecuados para obtención de imágenes médicas. Por "obtención de imágenes médicas" quiere decirse cualquier técnica usada para visualizar una región interna del cuerpo humano o animal, con propósitos de diagnóstico, investigación o tratamiento terapéutico. Por ejemplo, el polipéptido de tipo Affimer puede detectarse (y cuantificarse) mediante radio-gammagrafía, obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM), tomografía computerizada (TAC), obtención de imágenes nucleares, emisión de positrones que comprende un agente de contraste de tomografía de metales (PET), obtención de imágenes ópticas (tal como obtención de imágenes por fluorescencia que incluye obtención de imágenes por fluorescencia de infrarrojo cercano (NIRF)), obtención de imágenes por bioluminiscencia, o combinaciones de las mismas. El resto funcional es opcionalmente un agente de contraste para obtención de imágenes por rayos X. Los agentes útiles para potenciar tales técnicas son los materiales que permiten la visualización de un locus, órgano o sitio de enfermedad particular dentro del cuerpo, y/o que conducen a alguna mejora en la calidad de las imágenes generadas mediante las técnicas de obtención de imágenes, proporcionando una interpretación mejorada o más fácil de esas imágenes. Tales agentes se denominan en el presente documento agentes de contraste, cuyo uso facilita la diferenciación de partes diferentes de la imagen, aumentando el "contraste" entre esas regiones diferentes de la imagen. Por tanto, el término "agentes de contraste" abarca agentes que se usan para potenciar la calidad de una imagen que, no obstante, puede generarse en ausencia de un agente de este tipo (tal como es el caso, por ejemplo, en IRM), así como agentes que son requisitos previos para la generación de una imagen (tal como es el caso, por ejemplo, en obtención de imágenes nucleares).

En determinadas realizaciones preferidas, el marcador detectable incluye un resto de quelato para quelar un metal, por ejemplo, un quelante para un radiometal o ion paramagnético. En determinadas realizaciones preferidas, el



marcador detectable es un quelante para un radionúclido útil para procedimientos de radioterapia u obtención de imágenes. Los radionúclidos útiles dentro de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones incluyen emisores gamma, emisores de positrones, emisores de electrones Auger, emisores de rayos X y emisores de fluorescencia, prefiriéndose los emisores beta o alfa para uso terapéutico. Los ejemplos de radionúclidos útiles como toxinas en terapia por radiación incluyen: 43K, 47Sc, 51Cr, 57Co, 58Co, 59Fe, 64Cu, 67Ga, 67Cu, 68Ga, 71Ge, 75Br, 76Br, 77Br, 77As, 81Rb, 90Y, 97Ru, 99mTc, 100Pd, 101Rh, 103Pb, 105Rh, 109Pd, 111Ag, 111In, 113In, 119Sb, 121Sn, 123I, 125I, 127Cs, 128Ba, 129Cs, 131I, 131Cs, 143Pr, 153Sm, 161Tb, 166Ho, 169Eu, 177Lu, 186Re, 188Re, 189Re, 191Os, 193Pt, 194Ir, 197Hg, 199Au, 203Pb, 211At, 212Pb, 212Bi y 213Bi. Las condiciones en las que un quelante se coordinará con un metal se describen, por ejemplo, por Gansow *et al.*, patentes estadounidenses n.ºs 4.831.175, 4.454.106 y 4.472.509. Los ejemplos de quelantes incluyen, simplemente como ilustración, ácido 1,4,7-triazaciclononano-N,N',N"-triacético (NOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N",N"-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-N,N',N",N"-tetraacético (TETA).

Otros isótopos detectables que pueden incorporarse directamente en los residuos de aminoácido del polipéptido de tipo Affimer o que de otro modo no requieren un quelante incluyen 3H, 14C, 32P, 35S y 36Cl.

También pueden administrarse iones paramagnéticos, útiles para procedimientos de diagnóstico. Los ejemplos de iones paramagnéticos incluyen cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III), erbio (III), o combinaciones de estos iones paramagnéticos.

Los ejemplos de marcadores fluorescentes incluyen, pero no se restringen a, colorantes orgánicos (por ejemplo cianina, fluoresceína, rodamina, compuestos de tipo Alexa Fluor, compuestos de tipo Dylight Fluor, colorantes ATTO, colorantes BODIPY, etc.), fluoróforos biológicos (por ejemplo, proteína verde fluorescente (GFP), R-ficoeritrina, etc.), y puntos cuánticos.

Los compuestos fluorescentes no limitativos que pueden usarse en la presente invención tal como se define en las reivindicaciones incluyen, Cy5, Cy5.5 (también conocido como Cy5++), Cy2, isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), ficoeritrina, Cy7, fluoresceína (FAM), Cy3, Cy3.5 (también conocido como Cy3++), Texas Red, LightCycler-Red 640, LightCycler Red 705, tetrametilrodamina (TMR), rodamina, derivado de rodamina (ROX), hexaclorofluoresceína (HEX), rodamina 6G (R6G), el derivado de rodamina JA133, colorantes fluorescentes de tipo Alexa (tales como Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 555, y Alexa Fluor 647), 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), yoduro de propidio, AMCA, espectro verde, espectro naranja, espectro agua, Lissamine, y complejos fluorescentes de metales de transición, tales como europio. Los compuestos fluorescentes que pueden usarse también incluyen proteínas fluorescentes, tales como GFP (proteína verde fluorescente), GFP potenciada (EGFP), proteína azul fluorescente y derivados (BFP, EBFP, EBFP2, azurita, mKalamal1), proteína cian fluorescente y derivados (CFP, ECFP, cerúleo, CyPet) y proteína amarilla fluorescente y derivados (YFP, citrina, Venus, YPet). Documentos WO2008142571, WO2009056282, WO9922026.

Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen, pero no se restringen a, peroxidasa del rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), glucosa oxidasa y  $\beta$ -galactosidasa.

Otro marcador bien conocido es biotina. Los marcadores de biotina están normalmente compuestos por el grupo biotinilo, un brazo separador y un grupo reactivo que es responsable de la unión a grupos funcionales diana en proteínas. La biotina puede ser útil para unir la proteína marcada a otros restos que comprenden un resto de avidina.

### (ii) Conjugados de compuesto de tipo Affimer-fármaco

En determinadas realizaciones, el polipéptido de tipo Affimer incluye uno o más agentes terapéuticos, por ejemplo, para formar un conjugado de compuesto de tipo Affimer-fármaco. Tal como se usa en el presente documento, el término "agente terapéutico" se refiere a una sustancia que puede usarse en la cura, mitigación, tratamiento, o prevención de enfermedad en un humano u otro animal. Tales agentes terapéuticos incluyen sustancias reconocidas en la farmacopea de los Estados Unidos oficial, farmacopea homeopática de los Estados Unidos oficial, formulario nacional oficial, o cualquier suplemento de los mismos, e incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, nucleótidos, oligopéptidos, polipéptidos, etc. Los agentes terapéuticos que pueden unirse a polipéptidos que contienen compuesto de tipo Affimer incluyen, pero no se limitan a, agentes citotóxicos, antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos, factor de crecimiento, citocinas, agentes anti-angiogénicos, agentes anti-mitóticos, toxinas, agentes apoptóticos o similares, tales como agentes alquilantes de ADN, inhibidores de topoisomerasa, agentes de inducción de estrés del retículo endoplasmático, compuestos de platino, antimetabolitos, alcaloides de la vinca, taxanos, epotilonas, inhibidores enzimáticos, antagonistas de receptores, anticuerpos terapéuticos, inhibidores de tirosina cinasa, radiosensibilizantes, y terapias de combinación quimioterápicas, como ilustraciones.

Ejemplos no limitativos de agentes alquilantes de ADN son mostazas de nitrógeno, tales como mecloretamina, ciclofosfamida (ifosfamida, trofosfamida), clorambucilo (melfalán, prednimustina), bendamustina, uramustina y estramustina; nitrosoureas, tales como carmustina (BCNU), lomustina (semustina), fotemustina, nimustina, ranimustina y estreptozocina; sulfonatos de alquilo, tales como busulfano (manosulfano, treosulfano); aziridinas,

tales como carbocuna, TioTEPA, triazicuna, trietilenemelamina; hidrazinas (procarbazina); triacenes tales como dacarbazina y temozolomida; altretamina y mitobronitol.

Los ejemplos no limitativos de inhibidores de topoisomerasa I incluyen derivados de campotecina incluyendo CPT-11 (irinotecán), SN-38, APC, NPC, campotecina, topotecán, mesilato de exatecán, 9-nitrocampotecina, 9-aminocampotecina, lurtotecán, rubitecán, silatecán, gimatecán, diflomotecán, extatecán, BN-80927, DX-8951f, y MAG-CPT tal como se describe en Pommier Y. (2006) Nat. Rev. Cancer 6(10):789-802 y publicación de patente estadounidense n.º 200510250854; alcaloides de protoberberina y derivados de los mismos incluyendo berberrubina y coralina tal como se describe en Li *et al.* (2000) Biochemistry 39(24):7107-7116 y Gatto *et al.* (1996) Cancer Res. 56(12):2795-2800; derivados de fenantrolina incluyendo benzo[*ij*]fenantridina, nitidina, y fagaronina tal como se describe en Makhey *et al.* (2003) Bioorg. Med. Chem. 11 (8): 1809-1820; terbencimidazol y derivados del mismo tal como se describe en Xu (1998) Biochemistry 37(10):3558-3566; y derivados de antraciclina incluyendo doxorubicina, daunorubicina, y mitoxantrona tal como se describe en Foglesong *et al.* (1992) Cancer Chemother. Pharmacol. 30(2):123-125, Crow *et al.* (1994) J. Med. Chem. 37(19):3193194, y Crespi *et al.* (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 136(2):521-8. Los inhibidores de topoisomerasa II incluyen, pero no se limitan a, etopósido y tenipósido. Los inhibidores dobles de topoisomerasa I y II incluyen, pero no se limitan a, saintopina y otras naftecenodionas, DACA y otras acridina-4-carboxamidas, intoplicina y otros benzopiridoindoles, TAS-103 y otras 7H-indeno[2,1-*cj*]quinoline-7-onas, pirazoloacridina, XR 11576 y otras benzofenazinas, XR 5944 y otros compuestos diméricos, 7-oxo-7H-dibenz[*f,ij*]isoquinolinas y 7-oxo-7H-benzo[*e*]perimidinas, y conjugados de antracenil-aminoácido tal como se describe en Denny y Baguley (2003) Curr. Top. Med. Chem. 3(3):339-353. Algunos agentes inhiben la topoisomerasa II y tienen actividad de intercalación del ADN tales como, pero sin limitarse a, antraciclinas (aclaurubicina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, amrubicina, pirarubicina, valrubicina, zorubicina) y antracenodionas (mitoxantrona y pixantrona).

Los ejemplos de agentes de inducción de estrés del retículo endoplasmático incluyen, pero no se limitan a, dimetilcelecoxib (DMC), nelfinavir, celecoxib, y radiosensibilizantes de boro (es decir, Velcade (bortezomib)).

Los ejemplos no limitativos de compuesto basados en platino incluyen carboplatino, cisplatino, nedaplatino, oxaliplatino, tetranitrato de triplatino, satraplatino, aroplatino, lobaplatino, y JM-216 (véase McKeage *et al.* (1997) J. Clin. Oncol. 201:1232-1237 y, en general, CHEMOTERAPIA FOR GYNECOLOGICAL NEOPLASM, CURRENT THERAPY AND NOVEL APPROACHES, en Series Basic and Clinical Oncology, Angioli *et al.* Eds., 2004).

Los ejemplos no limitativos de agentes antimetabolitos incluyen los basados en ácido fólico, es decir inhibidores de dihidrofolato reductasa, tales como aminopterina, metotrexato y pemetrexed; inhibidores de timidilato sintasa, tales como raltitrexed, pemetrexed; basados en purina, es decir un inhibidor de adenosina desaminasa, tales como pentostatina, una tiopurina, tal como tioguanina y mercaptopurina, un inhibidor halogenado/de ribonucleótido reductasa, tal como cladribina, clofarabina, fludarabina, o una guanina/guanosina: tiopurina, tal como tioguanina; o basado en pirimidina, es decir citosina/citidina: agente hipometilante, tal como azacitidina y decitabina, un inhibidor de ADN polimerasa, tal como citarabina, un inhibidor de ribonucleótido reductasa, tal como gemcitabina, o una timina/timidina: inhibidor de timidilato sintasa, tal como un fluorouracilo (5-FU). Los equivalentes de 5-FU incluyen profármacos, análogos y derivado de los mismos tales como 5'-desoxi-5-fluorouridina (doxifluoridina), 1-tetrahidrofuranyl-5-fluorouracilo (florafur), capecitabina (Xeloda), S-I (MBMS-247616, que consiste en tegafur y dos moduladores, una 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina y oxonato de potasio), raltitrexed (Tomudex), nolatrexed (Thymitaq, AG337), LY231514 y ZD9331, tal como se describe, por ejemplo, en Papamicheal (1999) The Oncologist 4:478-487.

Los ejemplos de alcaloides de la vinca incluyen, pero no se limitan a, vinblastina, vincristina, vinflunina, vindesina y vinorelbina.

Los ejemplos de taxanos incluyen, pero no se limitan a, docetaxel, larotaxel, ortataxel, paclitaxel y tesetaxel. Un ejemplo de una epotilona es iabepilona.

Los ejemplos de inhibidores enzimáticos incluyen, pero no se limitan a inhibidores de farnesiltransferasa (tipifamib); inhibidor de CDK (alvocidib, seliciclib); inhibidor de proteasoma (bortezomib); inhibidor de fosfodiesterasa (anagrelida; rolipram); inhibidor de IMP deshidrogenasa (tiazofurina); e inhibidor de lipoxigenasa (masoprocol). Los ejemplos de antagonistas de receptores incluyen, pero no se limitan a, ERA (atrasentan); receptor retinoide X (bexarotene); y un esteroide sexual (testolactona).

Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpo anti-HER1/EGFR (cetuximab, panitumumab); anticuerpo anti-HER2/receptor neu (erbB2) (trastuzumab); anticuerpo anti-EpCAM (catumaxomab, edrecolomab); anticuerpo anti-VEGF-A (bevacizumab); anticuerpo anti-CD20 (rituximab, tositumomab, ibritumomab); anticuerpo anti-CD52 (alemtuzumab); y anticuerpo anti-CD33 (gemtuzumab). Patentes estadounidenses n.ºs 5.776.427 y 7.601.355.

Los ejemplos de inhibidores de tirosina cinasa incluyen, pero no se limitan a, inhibidores frente a ErbB: HER1/EGFR (erlotinib, gefitinib, lapatinib, vandetanib, sunitinib, neratinib); HER2/neu (lapatinib, neratinib); RTK clase III: C-kit (axitinib, sunitinib, sorafenib), FLT3 (lestaurtinib), PDGFR (axitinib, sunitinib, sorafenib); y VEGFR (vandetanib,

semaxanib, cediranib, axitinib, sorafenib); bcr-abl (imatinib, nilotinib, dasatinib); Src (bosutinib) y cinasa Janus 2 (lestaurtinib).

Los agentes quimioterápicos que pueden unirse a los presentes polipéptidos que contienen compuesto de tipo Affimer también pueden incluir amsacrina, trabectedina, retinoides (alitretinoína, tretinoína), trióxido de arsénico, compuesto de agotamiento de asparagina (asparaginasa/pegaspargasa), celecoxib, demecolcina, elesclomol, elsamitrucina, etoglúcido, lonidamina, lucantona, mitoguazona, mitotano, oblimersén, temsirolimus, y vorinostat.

Los ejemplos de agentes terapéuticos específicos que pueden unirse, ligarse, o asociarse con los polipéptidos que contienen compuesto de tipo Affimer de la invención tal como se define en las reivindicaciones son flomoxef; fortimicina(s); gentamicina(s); glucosulfona solasulfona; gramicidina S; gramicidina(s); grepafloxacina; guameciclina; hetacilina; isepamicina; josamicina; kanamicina(s); flomoxef; fortimicina(s); gentamicina(s); glucosulfona solasulfona; gramicidina S; gramicidina(s); grepafloxacina; guameciclina; hetacilina; isepamicin; josamicina; kanamicina(s); bacitracina; bambermicina(s); biapenem; brodimoprima; butirosina; capreomicina; carbenicilina; carbomicina; carumonam; cefadroxilo; cefamandol; cefatrizina; cefbuperazona; cefclidina; cefdinir; cefditoreno; cefepima; cefetamet; cefixima; cefinenoxima; cefininox; cladribina; apalcilina; apiciclina; apramicina; arbekacina; aspoxicilina; azidamfenicol; aztreonam; cefodizima; cefonicida; cefoperazona; ceforamida; cefotaxima; cefotetán; cefotiam; ceftiofur; cefpimizol; cefpiramida; cefpiroma; cefprozilo; cefroxadina; cefteteram; ceftibuteno; cefuzonam; cefalexina; cefaloglicina; cefalosporina C; cefradina; cloranfenicol; clortetraciclina; clinafloxacina; clindamicina; clomociclina; colistina; ciclacilina; dapsona; demeclociclina; diatimosulfona; dibekacina; dihidrostreptomycin; 6-mercaptopurina; tioguanina; capecitabina; docetaxel; etopósido; gemcitabina; topotecán; vinorelbina; vincristina; vinblastina; tenipósido; melfalán; metotrexato; 2-p-sulfanililinoetanol; 4,4'-sulfinildianilina; ácido 4-sulfanilamidosalicílico; butorfanol; nalbufina; estreptozocina; doxorubicina; daunorubicina; plicamicina; idarubicina; mitomicina C; pentostatina; mitoxantrona; citarabina; fosfato de fludarabina; butorfanol; nalbufina; estreptozocina; doxorubicina; daunorubicina; plicamicina; idarubicina; mitomicina C; pentostatina; mitoxantrona; citarabina; fosfato de fludarabina; acediasulfona; acetosulfona; amikacina; anfotericina B; ampicilina; atorvastatina; enalapril; ranitidina; ciprofloxacina; pravastatina; claritromicina; ciclosporina; famotidina; leuprolida; aciclovir; paclitaxel; azitromicina; lamivudina; budesonida; albuterol; indinavir; metformina; alendronato; nizatidina; zidovudina; carboplatino; metoprolol; amoxicilina; diclofenaco; lisinopril; ceftriaxona; captopril; salmeterol; xinafoato; imipenem; cilastatina; benazepril; cefaclor; ceftazidima; morfina; dopamina; bialamicol; fluvastatina; fenamidina; 2-etilhidrazina del ácido podofilínico; acriflavina; cloroazodina; arsfenamina; amicarbilida; aminoquinurida; quinapril; oximorfo; buprenorfina; floxuridina; diritromicina; doxiciclina; enoxacina; enviomicina; epicilina; eritromicina; leucomicina(s); lincomicina; lomefloxacina; lucensomicina; limeciclina; meclociclina; meropenem; metaciclina; micronomicina; midecamicina(s); minociclina; moxalactam; mupirocina; nadifloxacina; natamicina; neomicina; netilmicina; norfloxacina; oleandomicina; oxitetraciclina; p-sulfanililbencilamina; panipenem; paromomicina; pazufloxacina; penicilina N; pipaciclina; ácido pipemídico; polimixina; primicina; quinacilina; ribostamicina; rifamida; rifampina; rifamicina SV; rifapentina; rifaximina; ristocetina; ritipenem; rokitamicina; rolitetraciclina; rosaramicina; roxitromicina; salazosulfadimidina; sanciclina; sisomicina; sparfloxacina; espectinomycin; espiramicina; estreptomycin; succisulfona; sulfacrisoidina; ácido sulfalóxico; sulfamidocrisoidina; ácido sulfanílico; sulfoxona; teicoplanina; temafloxacina; temociclina; tetroxoprima; tiampfenicol; tiazolsulfona; tiostreptona; ticarcilina; tigemonam; tobramicina; tosufloxacina; trimetoprima; trospectomicina; trovafloxacina; tuberactinomycin; vancomicina; azaserina; candidicina(s); clorfenesina; dermostatina(s); filipina; fungicromina; mepartricina; nistatina; oligomicina(s); perimicina A; tubercidina; 6-azauridina; 6-diazo-5-oxo-L-norleucina; aclinomicina(s); ancitabina; antramicina; azacitadina; azaserina; bleomicina(s); biscoumacetato de etilo; etiliden-dicumarol; iloprost; lamifibán; taprosteno; tiocloamarol; tirofibán; amiprilosa; bucilamina; gusperimús; ácido gentísico; glucametacina; salicilato de glicol; ácido meclofenámico; ácido mefenámico; mesalamina; ácido niflúmico; olsalazina; oxaceprol; S-enosilmetionina; ácido salicílico; salsalato; sulfasalazina; ácido tolfenámico; carubicina; carzinofilina A; cloroctocina; cromomicina(s); denopterina; doxifluridina; edatrexato; eflornitina; eliptinio; enocitabina; epirubicina; manomustina; menogarilo; mitobronitol; mitolactol; mopidamol; ácido micofenólico; nogalamicina; olivomicina(s); peplomicina; pirarubicina; piritrexim; prednimustina; procarbazona; pteropterina; puromicina; ranimustina; estreptonigrina; tiampirina; ácido micofenólico; procodazol; romurtida; sirolimús (rapamicina); tacrolimús; butetamina; fenalcomina; hidroxitetraacina; naepaina; ortocaina; piridocaina; alcohol salicílico; ácido 3-amino-4-hidroxi-butírico; aceclofenaco; alminoprofeno; amfenaco; bromfenaco; bromosaligenina; bumadizona; carprofeno; diclofenaco; diflunisal; ditazol; ácido enfenámico; etodolaco; etofenamato; fendosal; fepradinol; ácido flufenámico; Tomudex (ácido N-[[5-[[[1,4-dihidro-2-metil-4-oxo-6-quinazolinil]metil]metilamino]-2-tienil]carbonil]-L-glutámico), trimetrexato, tubercidina, ubenimex, vindesina, zorubicina; argatrobán; cumetarol o dicumarol.

En determinadas realizaciones, el polipéptido de tipo Affimer incluye un factor citotóxico conjugado tal como toxina diftérica, cadena de exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas y compuestos de *Aleurites fordii* (por ejemplo, ácidos grasos), proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* PAPI, PAPII, y PAP-S, inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, mitogelina, restrictocina, fenomicina, y enomicina.

Cualquier método conocido en la técnica para conjugación a anticuerpos y otras proteínas puede emplearse en la generación de los conjugados de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones, incluyendo los métodos descritos por Hunter, *et al.*, (1962) Nature 144:945; David, *et al.*, (1974) Biochemistry 13:1014; Pain, *et al.*,

(1981) J. Immunol. Met. 40:219; y Nygren, J., (1982) Histochem. and Cytochem. 30:407. Los métodos para conjugar péptidos, polipéptidos y restos orgánicos e inorgánicos a anticuerpos y otras proteínas son convencionales y se conocen muy bien en la técnica y se adaptan fácilmente para generar las versiones de los polipéptidos de tipo Affimer objeto.

Cuando el resto conjugado es un péptido o polipéptido, ese resto puede reticularse químicamente al polipéptido que contiene compuesto de tipo Affimer, o puede incluirse como parte de una proteína de fusión con el polipéptido que contiene compuesto de tipo Affimer. Y un ejemplo ilustrativo será una proteína de fusión de toxina diftérica-compuesto de tipo Affimer. En el caso de entidades no peptídicas, la adición al polipéptido que contiene compuesto de tipo Affimer se realizará generalmente mediante conjugación química al polipéptido que contiene compuesto de tipo Affimer, tal como mediante un grupo funcional en una cadena lateral de aminoácido o el grupo carboxilo en el extremo C-terminal o grupo amino en el extremo N-terminal del polipéptido. En cierta realización, ya sea como proteína de fusión o resto químicamente reticulado, el resto conjugado incluirá uno o más sitios que pueden escindirse mediante una enzima o son de otro modo sensibles a una condición del entorno (tal como pH) que permite liberar el resto conjugado a partir del polipéptido que contiene compuesto de tipo Affimer, tal como en el tumor u otro tejido enfermo (o tejido que va a protegerse si el resto conjugado funciona para proteger tejido sano).

### III. Métodos y sistemas de expresión

Pueden producirse proteínas que contienen compuesto de tipo Affimer recombinantes descritas en el presente documento mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Tales métodos oscilan desde métodos de síntesis de proteínas directa hasta construir una secuencia de ADN que codifica para secuencias de polipéptido y expresar esas secuencias en un huésped adecuado. Para los polipéptidos de tipo Affimer recombinantes que incluyen modificaciones adicionales, tales como una modificación o conjugación química, el polipéptido de tipo Affimer recombinante puede manipularse adicionalmente de manera química o enzimática tras el aislamiento a partir de la célula huésped o síntesis química.

La presente invención tal como se define en las reivindicaciones incluye métodos y ácidos nucleicos recombinantes útiles en la expresión recombinante de los polipéptidos de tipo Affimer recombinantes de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones que comprende (i) introducir en una célula huésped un polinucleótido que codifica para la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido de tipo Affimer, por ejemplo, en el que el polinucleótido es en un vector y/o está operativamente unido a un promotor; (ii) cultivar la célula huésped (por ejemplo, eucariota o procariota) en una condición favorable para la expresión del polinucleótido y, (iii) opcionalmente, aislar el polipéptido de tipo Affimer a partir de la célula huésped y/o el medio en el que se hace crecer la célula huésped. Véanse por ejemplo, los documentos WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 o WO 2009/068627.

En algunas realizaciones, puede construirse una secuencia de ADN que codifica para un polipéptido de tipo Affimer recombinante de interés mediante síntesis química usando un sintetizador de oligonucleótidos. Pueden diseñarse oligonucleótidos basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionando los codones que se favorecen en la célula huésped en la que se producirá el polipéptido de interés recombinante. Pueden aplicarse métodos convencionales para sintetizar una secuencia de polinucleótido que codifica para un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, puede usarse una secuencia de aminoácidos completa para construir un gen retrotraducido. Además, puede sintetizarse un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido aislado particular. Por ejemplo, pueden sintetizarse varios oligonucleótidos pequeños que codifican para porciones del polipéptido deseado y después ligarse. Los oligonucleótidos individuales contienen normalmente proyecciones en 5' o 3' para ensamblaje complementario.

Una vez obtenida una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de tipo Affimer recombinante de la invención tal como se define en las reivindicaciones, el vector para la producción del polipéptido de tipo Affimer recombinante puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Pueden usarse métodos que conocen bien los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen las secuencias que codifican para polipéptido de tipo Affimer recombinante y señales de control transcripcional y traduccional apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis, y recombinación genética *in vivo*. (Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al*, 1990, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel *et al*. eds., 1998, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY).

Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de un polipéptido de tipo Affimer recombinante puede transferirse a una célula huésped mediante técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación, transfección liposomal, y precipitación con fosfato de calcio) y después se cultivan las células transfectadas mediante técnicas convencionales para producir el polipéptido de tipo Affimer recombinante de la invención tal como se define en las reivindicaciones. En realizaciones específicas, la expresión del polipéptido de tipo Affimer recombinante se regula mediante un promotor constitutivo, inducible o específico de tejido.

El vector de expresión puede incluir un origen de replicación, tal como puede seleccionarse basándose en el tipo de célula huésped que está usándose para la expresión. A modo de ejemplo, el origen de replicación a partir del plásmido pBR322 (n.º de producto 303-3s, New England Biolabs, Beverly, Mass.) es útil para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, mientras que diversos orígenes a partir de VS40, poliovirus, adenovirus, virus de estomatitis vesicular (VSV) o papilomavirus (tales como VPH o VPB) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. Generalmente, el componente de origen de replicación no se necesita para vectores de expresión de mamífero (por ejemplo, con frecuencia se usa el origen de VS40 porque contiene el promotor temprano).

El vector puede incluir uno o más genes de marcador seleccionable, por ejemplo, elementos genéticos que codifican para una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula huésped que se hace crecer en un medio de cultivo selectivo. Los genes de marcador de selección típicos codifican par proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina, o kanamicina para células huésped procariotas, (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos. Marcadores seleccionables preferidos son el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina, y el gen de resistencia a tetraciclina. También puede usarse un gen de resistencia a neomicina para la selección en células huésped procariotas y eucariotas. Pueden usarse otros genes de selección para amplificar el gen que se expresará. La amplificación es un proceso en el que genes que están en mayor demanda para la producción de una proteína crítica para el crecimiento se repiten en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Los ejemplos de marcadores seleccionables para células de mamífero incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina cinasa. Los transformantes de células de mamífero se ponen bajo presión de selección en la que sólo los transformantes están adaptados de manera única para sobrevivir gracias al marcador presente en el vector. Se impone presión de selección cultivando las células transformadas en condiciones en las que se cambia de manera sucesiva la concentración de agente de selección en el medio, conduciendo de ese modo a la amplificación tanto del gen de selección como del ADN que codifica para el polipéptido de tipo Affimer recombinante. Como resultado, se sintetizan cantidades aumentadas del polipéptido de tipo Affimer recombinante a partir del ADN amplificado.

El vector también puede incluir uno o más sitios de unión a ribosoma, que se transcribirán en el ARNm que incluye la secuencia codificante para el polipéptido de tipo Affimer recombinante. Por ejemplo, un sitio de este tipo está caracterizado por una secuencia de Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia de Kozak (eucariotas). El elemento está normalmente ubicado en 3' con respecto al promotor y en 5' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido que va a expresarse. La secuencia de Shine-Dalgarno varía pero es normalmente una polipurina (que tiene un alto contenido en A-G). Se han identificado muchas secuencias de Shine-Dalgarno, cada una de las cuales puede sintetizarse fácilmente usando métodos expuestos anteriormente y usarse en un vector procariota.

Los vectores de expresión contendrán normalmente un promotor que se reconoce por el organismo huésped y operativamente unido a una molécula de ácido nucleico que codifica para el polipéptido de tipo Affimer recombinante. Puede usarse un promotor o bien nativo o bien heterólogo dependiendo de la célula huésped usada para la expresión y el rendimiento deseado.

Los promotores para su uso con huéspedes procariotas incluyen los sistemas de promotor de beta-lactamasa y lactosa; fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (trp); y promotores híbridos tales como el promotor tac. Otros promotores bacterianos conocidos también son adecuados. Sus secuencias se han publicado, y pueden ligarse a una(s) secuencia(s) de ácido nucleico deseada(s), usando ligadores o adaptadores según se desee para proporcionar sitios de restricción.

También se conocen en la técnica promotores para su uso con huéspedes de levadura. Ventajosamente se usan potenciadores de levadura con promotores de levadura. Se conocen promotores adecuados para su uso con células huésped de mamífero e incluyen los obtenidos a partir de los genomas de virus tales como virus de poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y, lo más preferiblemente, virus de simio 40 (VS40). Otros promotores de mamífero adecuados incluyen promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, promotores de choque térmico y el promotor de actina.

Los promotores adicionales que pueden usarse para expresar los agentes de unión selectivos de la invención tal como se define en las reivindicaciones incluyen, pero no se limitan a: la región de promotor temprano de VS40 (Bernoist y Chambon, *Nature*, 290:304-310, 1981); el promotor de CMV; el promotor contenido en la repetición terminal larga en 3' de virus del sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.* (1980), *Cell* 22: 787-97); el promotor de timidina cinasa del herpes (Wagner *et al.* (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 1444-5); las secuencias reguladoras del gen de metalotionina (Brinster *et al.*, *Nature*, 296: 39-42, 1982); vectores de expresión procariotas tales como el promotor de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 3727-3731, 1978); o el promotor tac (DeBoer, *et al.* (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 21-5). También son de interés las siguientes regiones de control transcripcional de animales, que muestran especificidad tisular y se han usado en animales transgénicos: la región de control del gen de elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift *et al.* (1984), *Cell* 38: 639-46; Ornitz *et al.* (1986), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50: 399-409; MacDonald (1987), *Hepatology* 7: 425-515); la región de control del gen de insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan (1985),

Nature 315: 115-22); la región de control del gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl *et al.* (1984), Cell 38: 647-58; Adames *et al.* (1985), Nature 318: 533-8; Alexander *et al.* (1987), Mol. Cell. Biol. 7: 1436-44); la región de control de virus de tumor de mama de ratón que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder *et al.* (1986), Cell 45: 485-95); región de control del gen de albúmina que es activa en el hígado (Pinkert *et al.* (1987), Genes y Devel. 1: 268-76); la región de control del gen de alfafetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf *et al.* (1985), Mol. Cell. Biol. 5: 1639-48; Hammer *et al.* (1987), Science, 235: 53-8); la región de control del gen de alfa-1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey *et al.* (1987), Genes y Devel. 1: 161-71); la región de control del gen de beta-globina que es activa en células mieloides (Mogam *et al.*, Nature, 315 338-340, 1985; Kollias *et al.* (1986), Cell 46: 89-94); la región de control del gen de proteína básica de mielina que es activa en células de oligodendrocitos en el cerebro (Readhead *et al.* (1987), Cell, 48: 703-12); la región de control del gen de cadena ligera 2 de miosina que es activa en músculo esquelético (Sani (1985), Nature, 314: 283-6); y la región de control de gen de hormona liberadora gonadotrópica que es activa en el hipotálamo (Mason *et al.* (1986), Science 234: 1372-8).

Puede insertarse una secuencia potenciadora en el vector para aumentar la transcripción en células huésped eucariotas. Se conocen varias secuencias potenciadoras disponibles de genes de mamíferos (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). Sin embargo, normalmente, se usará un potenciador de un virus. El potenciador de VS40, el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma, y potenciadores de adenovirus son elementos de potenciación a modo de ejemplo para la activación de promotores eucariotas.

Aunque un potenciador puede insertarse por corte y empalme en el vector en una posición en 5' o 3' con respecto a la región que codifica para polipéptido, normalmente está ubicado en un sitio en 5' con respecto al promotor.

Los vectores para expresar ácidos nucleicos incluyen los que son compatibles con células huésped bacterianas, de insecto, y de mamífero. Tales vectores incluyen, entre otros, pCRII, pCR3, y pcDNA3.1 (Invitrogen Company, San Diego, Calif.), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, Calif.), pET15 (Novagen, Madison, Wis.), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, Calif.), pETL (BlueBacII; Invitrogen), pDSR-alfa (publicación PCT n.º WO90/14363) y pFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island, N.Y.).

Posibles vectores adicionales incluyen, pero no se limitan a, cósmidos, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vector debe ser compatible con la célula huésped seleccionada. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos tales como derivados de plásmido Bluescript® (un fagémido basado en ColEI de alto número de copias, Stratagene Cloning Systems Inc., La Jolla Calif.), plásmidos de clonación de PCR diseñados para clonar productos de PCR amplificados por Taq (por ejemplo, TOPO™, kit TA Cloning®, derivados de plásmido PCR2.1, Invitrogen, Carlsbad, Calif.), y vectores de mamífero, levadura o virus tales como un sistema de expresión de baculovirus (derivados de plásmidos de pBacPAK, Clontech, Palo Alto, Calif.). Las moléculas recombinantes pueden introducirse en células huésped mediante transformación, transfección, infección, electroporación, u otras técnicas conocidas.

Las células huésped eucariotas y procariotas, incluyendo células de mamífero como huéspedes para la expresión del polipéptido de tipo Affimer recombinante divulgado en el presente documento, se conocen bien en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC). Estas incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), NSO, células SP2, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549, células 3T3, células HEK-293 y varias otras líneas celulares. Las células huésped de mamífero incluyen células humanas, de ratón, rata, perro, mono, cerdo, cabra, bovinas, de caballo y de hámster. Líneas celulares particularmente preferidas se seleccionan determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión. Otras líneas celulares que pueden usarse son líneas celulares de insecto, tales como células Sf9, células de anfibio, células bacterianas, células vegetales y células fúngicas. Las células fúngicas incluyen células de levadura y de hongos filamentosos incluyendo, por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia kodamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces sp.*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces sp.*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium sp.*, *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrella patens* y *Neurospora crassa*. *Pichia sp.*, cualquier *Saccharomyces sp.*, *Hansenula polymorpha*, cualquier *Kluyveromyces sp.*, *Candida albicans*, cualquier *Aspergillus sp.*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, cualquier *Fusarium sp.*, *Yarrowia lipolytica*, y *Neurospora crassa*.

Puede usarse una variedad de sistemas de huésped-vector de expresión para expresar el polipéptido de tipo Affimer recombinante de la invención tal como se define en las reivindicaciones. Tales sistemas de huésped-expresión representan vehículos mediante los cuales pueden producirse las secuencias codificantes del polipéptido de tipo Affimer recombinante y posteriormente purificarse, pero también representan células que, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, pueden expresar el polipéptido de tipo Affimer recombinante de la invención tal como se define en las reivindicaciones *in situ*. Estos incluyen, pero no se

limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformados con vectores de expresión de ADN de bacteriófago, ADN de plásmido o ADN de cósmido recombinantes que contienen secuencias que codifican para polipéptido de tipo Affimer; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces pichia*) transformada con vectores de expresión en levadura recombinantes que contienen secuencias que codifican para polipéptido de tipo Affimer; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias que codifican para polipéptido de tipo Affimer; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor (CpMV) y virus del mosaico del tabaco (TMV)) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias que codifican para polipéptido de tipo Affimer; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, COS, CHO, BHK, 293, 293T, células 3T3, células linfóticas (véase la patente estadounidense n.º 5.807.715), células Per C.6 (células retinales de rata desarrolladas por Crucell)) que albergan constructos de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia).

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso previsto para el polipéptido de tipo Affimer recombinante que está expresándose. Por ejemplo, cuando tiene que producirse una gran cantidad de una proteína de este tipo, para la generación de composiciones farmacéuticas del polipéptido de tipo Affimer recombinante, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen el, pero no se limitan al, vector de expresión pUR278 de *E. coli* (Ruther *et al.* (1983) "Easy Identification Of cDNA Clones", EMBO J. 2:1791-1794), en el que la secuencia que codifica para el polipéptido de tipo Affimer puede ligarse de manera individual en el vector en marco con la región que codifica para lac Z de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye *et al.* (1985) "Up-Promoter Mutations In The Lpp Gene Of *Escherichia coli*", Nucleic Acids Res. 13:3101-3110; Van Heeke *et al.* (1989) "Expression Of Human Asparagine Synthetase In *Escherichia coli*", J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. También pueden usarse vectores pGEX para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células sometidas a lisis mediante adsorción y unión a perlas de glutatión-agarosa en matriz seguido por elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión de trombina o factor Xa proteasa de modo que el producto génico objetivo clonado puede liberarse a partir del resto de GST.

En un sistema de insectos, se usa virus de poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia que codifica para el polipéptido de tipo Affimer puede clonarse de manera individual en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de poliedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de poliedrina).

En células huésped de mamífero, pueden usarse varios sistemas de expresión basados en virus. En casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia que codifica para el polipéptido de tipo Affimer de interés puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartito. Entonces, este gen quimérico puede insertarse en el genoma de adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de inmunoglobulina en huéspedes infectados (véase, por ejemplo, véase Logan *et al.* (1984) "Adenovirus Tripartite Leader Sequence Enhances Translation of mRNAs Late After Infection", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 81:3655-3659). También pueden requerirse señales de iniciación específicas para una traducción eficiente de secuencias que codifican para polipéptido de tipo Affimer insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control de la traducción exógenas y codones de iniciación pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase Bitter *et al.* (1987) "Expression And Secretion Vectors For Yeast", Methods in Enzymol. 153:516-544).

Además, puede elegirse una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico de la manera específica deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas huésped apropiados para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína foránea expresada. Para ello, pueden usarse células huésped eucariotas que presentan la maquinaria celular para un procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación, y fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

Para la producción a largo plazo, en alto rendimiento, de proteínas recombinantes, se prefiere una expresión



estable. Por ejemplo, pueden modificarse por ingeniería líneas celulares que expresan de manera estable un anticuerpo usado en la invención. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, pueden transformarse células huésped con ADN controlado mediante elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN foráneo, pueden dejarse crecer células modificadas por ingeniería durante 1-2 días en un medio enriquecido, y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse para dar líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para modificar por ingeniería líneas celulares que expresan los polipéptidos de tipo Affimer recombinantes de la invención tal como se define en las reivindicaciones. Tales líneas celulares modificadas por ingeniería pueden ser particularmente útiles en la selección y evaluación de compuestos que interaccionan directa o indirectamente con los polipéptidos de tipo Affimer recombinantes.

Pueden usarse varios sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitarse a, los genes de timidina cinasa de virus del herpes simple (Wigler *et al.* (1977) "Transfer Of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene To Cultured Mouse Cells", *Cell* 11:223-232), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska *et al.* (1962) "Genetics Of Human Cell Line. IV. DNA-Mediated Heritable Transformation Of A Biochemical Trait", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 48:2026-2034), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.* (1980) "Isolation Of Transforming DNA: Cloning The Hamster Aprt Gene", *Cell* 22:817-823) que pueden emplearse en células tk-, hgp<sup>r</sup>t- o aprt-, respectivamente. Además, puede usarse resistencia a antimetabolitos como base de la selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.* (1980) "Transformation Of Mammalian Cells With An Amplifiable Dominant-Acting Gene", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 77:3567-3570; O'Hare *et al.* (1981) "Transformation Of Mouse Fibroblasts To Methotrexate Resistance By A Recombinant Plasmid Expressing A Prokaryotic Dihydrofolate Reductase", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 78:1527-1531); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan *et al.* (1981) "Selection For Animal Cells That Express The *Escherichia coli* Gene Coding For Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 78:2072-2076); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Tachibana *et al.* (1991) "Altered Reactivity Of Immunoglobulin Produced By Human-Human Hybridoma Cells Transfected By pSV2-Neo Gene", *Cytotechnology* 6(3):219-226; Tolstoshev (1993) "Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions", *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan (1993) "The Basic Science Of Gene Therapy", *Science* 260:926-932; y Morgan *et al.* (1993) "Human gene therapy", *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217). Métodos habitualmente conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel *et al.* (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY; y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds), 1994, CURRENT PROTOCOLS IN HUMAN GENETICS, John Wiley & Sons, NY.; Colbere-Garapin *et al.* (1981) "A New Dominant Hybrid Selective Marker For Higher Eukaryotic Cells", *J. Mol. Biol.* 150:1-14; y hyg<sup>r</sup>, que confiere resistencia a higromicina (Santerre *et al.* (1984) "Expression Of Prokaryotic Genes For Hygromycin B And G418 Resistance As Dominant-Selection Markers In Mouse L Cells", *Gene* 30:147-156).

Los niveles de expresión de un polipéptido de tipo Affimer recombinante pueden aumentarse mediante amplificación de vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, "The Use Of Vectors Based On Gene Amplification For The Expression Of Cloned Genes In Mammalian Cells", en DNA CLONING, vol. 3. (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa un polipéptido de tipo Affimer recombinante puede amplificarse, un aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de célula huésped aumentará el número de copias del gen de marcador. Dado que la región amplificada está asociada con la secuencia de nucleótidos del polipéptido de tipo Affimer recombinante, también aumentará la producción del polipéptido de tipo Affimer recombinante (Crouse *et al.* (1983) "Expression And Amplification Of Engineered Mouse Dihydrofolate Reductase Minigenes", *Mol. Cell. Biol.* 3:257-266).

Cuando el polipéptido de tipo Affimer es una fusión de compuesto de tipo Affimer-anticuerpo u otro complejo de múltiples proteínas, la célula huésped puede transfectarse conjuntamente con dos vectores de expresión, por ejemplo codificando el primer vector para un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector para uno derivado de cadena ligera, uno o ambos de los cuales incluye una secuencia que codifica para polipéptido de tipo Affimer. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifica para polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot (1986) "Expression And Amplification Of Engineered Mouse Dihydrofolate Reductase Minigenes", *Nature* 322:562-565; Kohler (1980) "Immunoglobulin Chain Loss In Hybridoma Lines", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 77:2197-2199). Las secuencias codificantes para cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.

En general, las glicoproteínas producidas en una línea celular o animal transgénico no humano particular tendrán un patrón de glicosilación que es característico para glicoproteínas producidas en la línea celular o animal transgénico no humano. Por tanto, el patrón de glicosilación particular del polipéptido de tipo Affimer recombinante dependerá de la línea celular o animal transgénico no humano particular usado para producir la proteína. En determinadas



realizaciones de fusiones de compuesto de tipo Affimer/anticuerpo, un patrón de glicosilación que sólo comprende N-glicanos no fucosilados puede ser ventajoso, porque, en el caso de anticuerpos, se ha mostrado que esto muestra normalmente una eficacia más potente que los homólogos fucosilados tanto *in vitro* como *in vivo* (véase por ejemplo, Shinkawa *et al.*, J. Biol. Chem. 278: 3466-3473 (2003); patentes estadounidenses n.ºs 6.946.292 y 7.214.775).

Además, la expresión de un polipéptido de tipo Affimer a partir de líneas celulares de producción puede potenciarse usando varias técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión del gen de glutamina sintetasa (el sistema de GS) es un enfoque común para potenciar la expresión en determinadas condiciones. El sistema de GS se comenta en su totalidad o en parte en relación con las patentes europeas n.ºs 0216846, 0256055, y 0323997 y la solicitud de patente europea n.º 89303964.4. Por tanto, en una realización de la invención tal como se define en las reivindicaciones, las células huésped de mamífero (por ejemplo, CHO) carecen de un gen de glutamina sintetasa y se hacen crecer en ausencia de glutamina en el medio en el que, sin embargo, el polinucleótido que codifica para la cadena de inmunoglobulina comprende un gen de glutamina sintetasa que complementa la falta del gen en la célula huésped. Tales células huésped que contienen el agente de unión o polinucleótido o vector tal como se comentan en el presente documento así como métodos de expresión, tal como se comentan en el presente documento, para producir el agente de unión usando una célula huésped de este tipo forman parte de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones.

La expresión de proteínas recombinantes en sistemas de cultivo de célula de insecto (por ejemplo, baculovirus) también ofrece un método robusto para producir proteínas correctamente plegadas y biológicamente funcionales. Los expertos en la técnica conocen bien sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto.

Los polipéptidos de tipo Affimer recombinantes producidos mediante un huésped transformado pueden purificarse según cualquier método adecuado. Los métodos convencionales incluyen cromatografía (por ejemplo, cromatografía en columna de intercambio iónico, afinidad, y por tamaños), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Pueden unirse etiquetas de afinidad tales como hexa-histidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de recubrimiento de influenza, y glutatión-S-transferasa a la proteína para permitir una fácil purificación mediante pase por una columna de afinidad apropiada. También pueden caracterizarse físicamente proteínas aisladas usando técnicas tales como proteólisis, espectrometría de masas (EM), resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), y cristalografía de rayos X.

En algunas realizaciones, pueden aislarse polipéptidos de tipo Affimer recombinantes producidos en cultivo bacteriano, por ejemplo, mediante extracción inicial a partir de sedimentos celulares, seguido por una o más etapas de concentración, precipitación por formación de sales, intercambio iónico acuoso o cromatografía de exclusión molecular. Puede emplearse HPLC para etapas de purificación finales. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante pueden perturbarse mediante cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, perturbación mecánica, o uso de agentes de lisis celular.

#### IV. Compuestos de tipo Affimer codificados para administración *in vivo*

Un enfoque alternativo a la administración de polipéptidos de tipo Affimer terapéuticos será dejar la producción del polipéptido terapéutico al propio cuerpo. Una multitud de estudios clínicos han ilustrado la utilidad de la transferencia génica *in vivo* al interior de células usando una variedad de sistemas de administración diferentes. La transferencia génica *in vivo* pretende administrar a pacientes la secuencia de nucleótidos de "compuesto de tipo Affimer codificado", en vez del polipéptido de tipo Affimer. Esto permite que el cuerpo del paciente produzca el polipéptido de tipo Affimer terapéutico de interés durante un periodo de tiempo prolongado, y lo secrete o bien de manera sistémica o bien de manera local, dependiendo del sitio de producción. Los compuestos de tipo Affimer codificados basados en genes pueden presentar una alternativa rentable desde el punto de vista del trabajo y el coste con respecto a la producción, purificación y administración convencionales de la versión de polipéptido del polipéptido de tipo Affimer. Se han seguido varias plataformas de expresión de anticuerpos *in vivo* a las que puede adaptarse la administración de compuestos de tipo Affimer codificados: estas incluyen vectores virales, ADN y ARN desnudos. La transferencia de genes de compuesto de tipo Affimer codificado no sólo puede permitir ahorros de coste reduciendo el coste de artículos y de producción, sino que también puede ser capaz de reducir la frecuencia de administración de fármaco. En conjunto, la producción *in vivo* prolongada del polipéptido de tipo Affimer terapéutico mediante expresión del compuesto de tipo Affimer codificado puede contribuir a (i) una aplicación terapéutica o profiláctica más amplia de polipéptidos de tipo Affimer en condiciones sensibles al precio, (ii) una accesibilidad mejorada a terapia en países tanto desarrollados como en desarrollo, y (iii) modalidades de tratamiento más eficaces y asequibles. Además de la transferencia génica *in vivo*, pueden recogerse células a partir del huésped (o un donante), modificarse por ingeniería con secuencias de tipo Affimer codificadas para producir polipéptidos de tipo Affimer y volver a administrarse a pacientes.

La administración de genes de anticuerpos intramuscular se ha evaluado de la manera más amplia (revisado en Deal *et al.* (2015) "Engineering humoral immunity as prophylaxis or therapy" Curr Opin Immunol. 35:113-22.), y también tiene la mayor aplicabilidad clínica y aplicación cuando se aplica a compuestos de tipo Affimer codificados.

De hecho, las propiedades anatómicas, celulares y fisiológicas inherentes de músculo esquelético hacen que sea un entorno estable para la expresión a largo plazo de compuesto de tipo Affimer codificado y circulación sistémica. El músculo esquelético es fácilmente accesible, permitiendo administraciones múltiples o repetidas. El suministro vascular de sangre abundante proporciona un sistema de transporte eficiente para polipéptidos de tipo Affimer terapéuticos secretados a la circulación. La naturaleza sincitial de las fibras musculares permite la dispersión de nucleótidos desde un sitio de penetración limitado hasta un número mayor de núcleos contiguos dentro de la fibra. Las fibras de músculo esquelético también son células diferenciadas de manera terminal, y los núcleos dentro de las fibras son postmitóticos. Por consiguiente, la integración en el genoma huésped no es un requisito previo para alcanzar una expresión de AcM prolongada. El hígado es otro sitio usado con frecuencia para la transferencia de genes de anticuerpos preclínicos, y se transfecta normalmente mediante inyección i.v., y también puede ser un sitio de transferencia génica para compuestos de tipo Affimer codificados o bien para la administración local de polipéptidos de tipo Affimer (tal como en el tratamiento de cáncer y/o metaplasias de hígado) o bien para la generación de polipéptidos de tipo Affimer que se secretan en el sistema vascular para la circulación sistémica. Este órgano tiene diversas funciones fisiológicas, incluyendo la síntesis de proteínas de plasma. Este órgano puede ser particularmente adecuado para la expresión *in vivo* de compuesto de tipo Affimer codificado.

El tumor presenta otro sitio para la transferencia de compuesto de tipo Affimer codificado, seleccionado como diana o bien por vía i.v. o bien mediante inyección/electroporación directa. De hecho, la expresión intratumoral de compuesto de tipo Affimer codificado puede permitir una producción local de los polipéptidos de tipo Affimer terapéuticos, evitando la necesidad de altos niveles sistémicos de polipéptido de tipo Affimer que puede requerirse de otro modo que penetren y tengan un impacto en tumores sólidos. Se aplica un fundamento similar para el cerebro, que con frecuencia se selecciona como diana en el contexto de transferencia de genes de anticuerpos para evitar las dificultades con el paso de la barrera hematoencefálica y también será una diana para la administración de compuestos de tipo Affimer codificados. Véase, por ejemplo, Beckman *et al.* (2015) "Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors" *Cancer* 109(2):170-9; Dronca *et al.* (2015) "Immunomodulatory antibody therapy of cancer: the closer, the better" *Clin Cancer Res.* 21(5):944-6; y Neves *et al.* (2016) "Antibody approaches to treat brain diseases" *Trends Biotechnol.* 34(1):36-48.

El éxito de la terapia génica se ha impulsado en gran medida por mejoras en vectores de transferencia génica no virales y virales. Se ha usado una matriz de métodos físicos y químicos no virales para transferir ADN y ARNm a células de mamífero y se ha desarrollado un número sustancial de los mismos como tecnologías en estadio clínico para terapia génica, tanto *ex vivo* como *in vivo*, y se adaptan fácilmente para la administración de los compuestos de tipo Affimer codificados de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones. Como ilustración, puede emplearse tecnología de liposoma catiónico, que se basa en la capacidad de lípidos anfipáticos, que presentan un grupo de cabeza positivamente cargado y una cola de lípido hidrófoba, para unirse a ADN o ARN negativamente cargado y formar partículas que entran de manera general en células mediante endocitosis. Algunos liposomas catiónicos también contienen un colípido neutro, que se piensa que potencia la captación de liposoma por células de mamífero. Véase, por ejemplo, Felgner *et al.* (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *MNAS* 84:7413-7417; San *et al.* (1983) "Safety and short term toxicity of a novel cationic lipid formulation for human gene therapy" *Hum. Gene Ther.* 4:781-788; Xu *et al.* (1996) "Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection" *Biochemistry* 35:5616-5623; y Legendre *et al.* (1992) "Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes" *Pharm. Res.* 9, 1235-1242.

De manera similar, pueden usarse otros policationes, tales como poli-L-lisina y polietilen-imina, para administrar compuestos de tipo Affimer codificados. Estos policationes se complejan con ácidos nucleicos mediante interacción de carga y ayudan en la condensación de ADN o ARN para dar nanopartículas, que entonces son sustratos para la captación mediada por endosomas. Varias de estas tecnologías de complejo de ácido nucleico catiónico se han desarrollado como posibles productos clínicos, incluyendo complejos con ADN de plásmido, oligodesoxinucleótidos, y diversas formas de ARN sintético. También se ha mostrado que ADN y ARN modificados (y no modificados o "desnudos") median en la transferencia génica satisfactoria en varias circunstancias y también pueden usarse como sistemas para la administración de compuestos de tipo Affimer codificados. Estos incluyen el uso de ADN de plásmido mediante inyección intramuscular directa, el uso de inyección intratumoral de ADN de plásmido. Véase, por ejemplo, Rodrigo *et al.* (2012) "De novo automated design of small RNA circuits for engineering synthetic riboregulation in living cells" *PNAS* 109:15271-15276; Oishi *et al.* (2005) "Smart polyion complex micelles for targeted intracellular delivery of PEGylated antisense oligonucleotides containing acid-labile linkages" *Chembiochem.* 6:718-725; Bhatt *et al.* (2015) "Microbeads mediated oral plasmid DNA delivery using polymethacrylate vectors: an effectual groundwork for colorectal cancer" *Drug Deliv.* 22:849-861; Ulmer *et al.* (1994) "Protective immunity by intramuscular injection of low doses of influenza virus DNA vaccines" *Vaccine* 12: 1541-1544; y Heinzerling *et al.* (2005) "Intratumoral injection of DNA encoding human interleukin 12 into patients with metastatic melanoma: clinical efficacy" *Hum. Gene Ther.* 16:35-48.

Actualmente se usan vectores virales como vehículo de suministro en la gran mayoría de ensayos de terapia génica preclínicos y clínicos y en la primera terapia génica dirigida en aprobarse. Véase *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide 2017* (<http://www.abedia.com/wiley/>). El principal impulso de los mismos es su excepcional eficiencia de suministro génico, que refleja un desarrollo evolutivo natural; los sistemas de vector viral son atractivos para el

suministro génico, porque los virus han evolucionado la capacidad de atravesar membranas celulares mediante infección, suministrando de ese modo ácidos nucleicos tales como compuestos de tipo Affimer codificados a células diana. Liderado por los sistemas adenovirales, el campo de la transferencia de genes de anticuerpos mediada por vector viral ha realizado avances significativos en las últimas décadas. La miríada de vías de administración evaluadas satisfactoriamente, modelos preclínicos e indicaciones de enfermedad presenta completamente las capacidades de la transferencia de genes de anticuerpos en las que el experto en la técnica será fácilmente capaz de identificar y adaptar sistemas y técnicas de transferencia de genes de anticuerpos para el suministro *in vivo* de constructos de compuesto de tipo Affimer codificado. El músculo ha surgido como el sitio de administración de elección para una expresión de AcM prolongada y será de manera similar un tejido diana adecuado para la expresión de polipéptido de tipo Affimer prolongada. En el contexto de la transferencia de genes de compuesto de tipo Affimer codificado intratumoral con vector, los virus oncolíticos tienen una clara ventaja, ya que pueden seleccionar específicamente como diana células tumorales, reforzar la expresión de polipéptido de tipo Affimer, y amplificar respuestas terapéuticas, tales como frente a un polipéptido de tipo Affimer inhibidor de punto de control o agonista coestimulante.

La transferencia génica *in vivo* de compuestos de tipo Affimer codificados también puede lograrse mediante el uso de vectores no virales, tales como plásmidos de expresión. Los vectores no virales se producen fácilmente y no parecen inducir respuestas inmunitarias específicas. El tejido muscular se usa lo más habitualmente como tejido diana para la transfección, porque el tejido muscular está bien vascularizado y es fácilmente accesible, y los miocitos son células de larga duración. La inyección intramuscular de ADN de plásmido desnudo da como resultado la transfección de un determinado porcentaje de miocitos. Usando este enfoque, se ha introducido *in vivo* ADN de plásmido que codifica para citocinas y proteínas quiméricas de citocina/IgG1 y ha influido positivamente en el desenlace de enfermedades (autoinmunitarias).

En algunos casos, con el fin de aumentar la eficiencia de transfección mediante el denominado suministro intravascular en el que se logran niveles aumentados de suministro y expresión génica mediante la inducción de una alta presión transitoria de corta duración en las venas. Manguitos de tensión arterial especiales que pueden facilitar la captación localizada aumentando temporalmente la presión vascular y pueden adaptarse para su uso en pacientes humanos para este tipo de suministro génico. Véase, por ejemplo, Zhang *et al.* (2001) "Efficient expression of naked DNA delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates" *Hum. Gene Ther.*, 12:427-438.

También puede obtenerse una eficiencia aumentada mediante otras técnicas, tales como en las que el suministro del ácido nucleico se mejora mediante el uso de portadores químicos (polímeros catiónicos o lípidos) o mediante un enfoque físico (suministro por pistola génica o electroporación). Véase Tranchant *et al.* (2004) "Physicochemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids" *J. Gene Med.*, 6 (sup. 1):S24-S35; y Niidome *et al.* (2002) "Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors" *Gene Ther.*, 9:1647-1652. Se considera especialmente la electroporación como técnica interesante para suministro génico no viral. Somiari, *et al.* (2000) "Theory and *in vivo* application of electroporative gene delivery" *Mol. Ther.* 2:178-187; y Jaroszeski *et al.* (1999) "*In vivo* gene delivery by electroporation" *Adv. Drug Delivery Rev.*, 35:131-137. Con la electroporación, se aplican corrientes eléctricas pulsadas a una zona de tejido local para potenciar la permeabilidad celular, dando como resultado la transferencia génica a través de la membrana. La investigación ha mostrado que el suministro génico *in vivo* puede ser al menos 10-100 veces más eficiente con la electroporación que sin ella. Véase, por ejemplo, Aihara *et al.* (1998) "Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*" *Nat. Biotechnol.* 16:867-870; Mir, *et al.* (1999) "High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses" *PNAS* 96:4262-4267; Rizzuto, *et al.* (1999) "Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation" *PNAS* 96: 6417-6422; y Mathiesen (1999) "Electroporation of skeletal muscle enhances gene transfer *in vivo*" *Gene Ther.*, 6:508-514.

Pueden suministrarse compuestos de tipo Affimer codificados mediante una amplia gama de sistemas de suministro génico habitualmente usados para terapia génica incluyendo virales, no virales, o físicos. Véase, por ejemplo, Rosenberg *et al.*, *Science*, 242:1575-1578, 1988, y Wolff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9011-9014 (1989). La discusión sobre métodos y composiciones para su uso en terapia génica incluye Eck *et al.*, en Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, novena edición, Hardman *et al.*, eds., McGraw-Hill, Nueva York, (1996), capítulo 5, págs. 77-101; Wilson, *Clin. Exp. Immunol.* 107 (sup. 1):31-32, 1997; Wivel *et al.*, *Hematology/Oncology Clinics of North America*, Gene Therapy, S. L. Eck, ed., 12(3):483-501, 1998; Romano *et al.*, *Stem Cells*, 18:19-39, 2000, y las referencias citadas en los mismos. La patente estadounidense n.º 6.080.728 también proporciona una discusión sobre una amplia variedad de métodos y composiciones de suministro génico. Las vías de suministro incluyen, por ejemplo, administración sistémica y administración *in situ*.

Un enfoque de transferencia de genes de compuesto de tipo Affimer codificado eficaz debe dirigirse a los tejidos/células específicos en los que se necesita, y la expresión transgénica resultante debe estar a un nivel que es apropiado para la aplicación específica. Los promotores son un elemento de acción en cis principal dentro del diseño de genoma de vector que pueden dictar la intensidad global de la expresión así como la especificidad celular,

Tabla 1. Promotores ubicuos y específicos de célula a modo de ejemplo.

Promotor	Especificidad	Intensidad	Tamaño	Referencia(s)
----------	---------------	------------	--------	---------------

		relativa	(pb)	
CMV	Ubicuo	+++	750-800	Xu <i>et al.</i> Gene Ther. 2001 8:1323-1332; Gray <i>et al.</i> , Hum Gene Ther. 2011 22:1143-1153
CBA (incluyendo derivados: CAG, CBh, etc.)	Ubicuo	+++	248-1.600	Klein <i>et al.</i> Exp Neurol. 2002 176(1):66-74; Ohlfest <i>et al.</i> Blood. 2005 105:2691-2698; y Gray <i>et al.</i> Hum Gene Ther. 201122:1143-1153.
EF-1 $\alpha$	Ubicuo	++	2.500	Gill <i>et al.</i> Gene Ther. 2001 8(20):1539-1546; Xu <i>et al.</i> Gene Ther. 2001 8:1323-1332; y Gilham <i>et al.</i> J Gene Med. 2010 12(2): 129-136.
PGK	Ubicuo	++	426	Gilham <i>et al.</i> J Gene Med. 2010 12(2):129-136.
UBC	Ubicuo	+	403	Gill <i>et al.</i> Gene Ther. 20018(20):1539-1546; Qin <i>et al.</i> PLoS One. 2010 5(5):e10611.
GUSB (hGBp)	Ubicuo	+	378	Husain <i>et al.</i> Gene Ther. 2009 16:927-932.
UCOE (promotor de HNRPA2B1-CBX3)	Ubicuo	++	600-2.500	Antoniou <i>et al.</i> Hum Gene Ther. 2013 24(4):363-374.
hAAT	Hígado	++	347-1.500	Van Linthout <i>et al.</i> Hum Gene Ther. 2002 13(7):829-840; Cunningham <i>et al.</i> Mol Ther. 2008 16(6):1081-1088
TBG	Hígado	++	400	Yan <i>et al.</i> Gene. 2012 506(2):289-294.
Desmina	Músculo esquelético	+++	1.700	Talbot <i>et al.</i> Mol Ther. 2010 18:601-608.
MCK	Músculo esquelético	++	595-1.089	Talbot <i>et al.</i> Mol Ther. 2010 18:601-608; Wang <i>et al.</i> Gene Ther. 2008 15:1489-1499; Katwal <i>et al.</i> Gene Ther. 2013 20(9):930-938.
C5-12	Esquelético, cardíaco, diafragma y	++	312	Wang <i>et al.</i> Gene Ther. 2008 15:1489-1499
NSE	Neurona	+++	300-2.200	Xu <i>et al.</i> Gene Ther. 2001 8:1323-1332
Sinapsina	Neurona	+	470	Kügler <i>et al.</i> Virology. 2003 311:89-95; Hioki <i>et al.</i> Gene Ther. 2007 14:872-882; Kuroda <i>et al.</i> J Gene Med. 2008 10:1163-1175.
PDGF	Neurona	+++	1.400	Patterna <i>et al.</i> Gene Ther. 2000 7(15):1304-1311; Hioki <i>et al.</i> Gene Ther. 2007 14:872-882
MecP2	Neurona	+	229	Rastegar <i>et al.</i> LoS One. 2009 4:e6810; Gray <i>et al.</i> , Hum Gene Ther. 201122:1143-1153
CaMKII	Neurona	++	364-2.300	Hioki <i>et al.</i> Gene Ther. 2007 14:872-882; Kuroda <i>et al.</i> J Gene Med. 2008 10:1163-1175
mGluR2	Neurona	+	1.400	Brené <i>et al.</i> Eur J Neurosci. 2000 12:1525-1533; Kuroda <i>et al.</i> J Gene Med. 2008 10:1163-1175
NFL	Neurona	+	650	Xu <i>et al.</i> Gene Ther. 2001 8:1323-1332
NFH	Neurona	+	920	Xu <i>et al.</i> Gene Ther. 2001 8:1323-1332
n $\beta$ 2	Neurona	+	650	Xu <i>et al.</i> Gene Ther. 2001 8:1323-1332
PPE	Neurona	+	2700	Xu <i>et al.</i> Gene Ther. 2001 8:1323-1332
Enk	Neurona	+	412	Xu <i>et al.</i> Gene Ther. 2001 8:1323-1332
EAAT2	Neurona y astrocito	++	966	Su <i>et al.</i> Proc Natl Acad Sci USA. 2003 100:1955-1960; Kuroda <i>et al.</i> J Gene Med. 2008 10:1163-1175
GFAP	Astrocito	++	681-2.200	Brenner <i>et al.</i> J Neurosci. 1994 14:1030-1037; Xu <i>et al.</i> Gene Ther. 2001 8:1323-1332; Lee <i>et al.</i> Glia. 2008 56:481-493; Dirren <i>et al.</i> Hum Gene Ther. 2014 25:109-120
MBP	Oligodendrocitos	++	1.900	Chen <i>et al.</i> Gene Ther. 1998 5(1):50-58

En algunos casos, se desea la expresión ubicua del constructo de compuesto de tipo Affimer codificado en todos los tipos de células. Pueden usarse promotores constitutivos tales como la subunidad 1 $\alpha$  de factor de elongación humano (EF1 $\alpha$ ), citomegalovirus inmediato temprano (CMV),  $\beta$ -actina de pollo (CBA) y su derivado CAG, la  $\beta$ -glucuronidasa (GUSB), o ubiquitina C (UBC), para fomentar la expresión del constructo de compuesto de tipo

Affimer codificado en la mayoría de los tejidos. Generalmente, CBA y CAG fomentan la expresión más grande entre los promotores constitutivos; sin embargo, su tamaño de ~1,7 kb en comparación con CMV (-0,8 kb) o EF1 $\alpha$  (~1,2 kb) puede limitar su uso en vectores con restricciones de empaquetamiento tales como VAA, particularmente cuando el polipéptido de tipo Affimer producido mediante la expresión del constructo de compuesto de tipo Affimer codificado es grande. Los promotores GUSB o UBC pueden proporcionar expresión génica ubicua con un tamaño más pequeño de 378 pb y 403 pb, respectivamente, pero son considerablemente más débiles que el promotor de CMV o CBA. Por tanto, se han buscado modificaciones de promotores constitutivos con el fin de reducir su tamaño sin afectar a su expresión y ejemplos tales como CBh (~800 pb) y miniCBA (~800 pb) pueden fomentar una expresión comparable e incluso superior en tejidos seleccionados (Gray *et al.*, Hum Gene Ther. 2011 22:1143-1153).

Cuando la expresión del constructo de compuesto de tipo Affimer codificado debe restringirse a determinados tipos de células dentro de un órgano, pueden usarse promotores para mediar esta especificidad. Por ejemplo, dentro del sistema nervioso, se han usado promotores para restringir la expresión a neuronas, astrocitos, u oligodendrocitos. En las neuronas, el promotor de enolasa específica de neuronas (NSE) impulsa una expresión más intensa que los promotores ubicuos. Adicionalmente, los promotores de cadena B de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF- $\beta$ ), de sinapsina (Syn), y de proteína 2 de unión a metil-CpG (MeCP2) pueden impulsar la expresión específica de neuronas a niveles inferiores a NSE. En astrocitos, la versión acortada de 680 pb de longitud [gfaABC(1)D] del promotor de proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP, 2,2 kb) puede conferir niveles superiores de expresión con la misma especificidad de astrocitos que el promotor de GFAP. La selección como diana de oligodendrocitos también puede lograrse mediante la selección del promotor de proteína básica de mielina (MBP), cuya expresión se restringe a esta célula de la glía; sin embargo, su tamaño de 1,9 kb y bajos niveles de expresión limitan su uso.

En el caso de expresar los constructos de compuesto de tipo Affimer codificado en células de músculo esquelético, promotores a modo de ejemplo basados en creatina cinasa muscular (MCK) y desmina (1,7 kb) han mostrado una alta tasa de especificidad (con expresión mínima en el hígado si se desea). El promotor de la cadena pesada de  $\alpha$ -miosina ( $\alpha$ -MHC; 1,2 kb) ha mostrado una especificidad cardíaca significativa en comparación con otros promotores musculares (Lee *et al.*, 2011 J Cardiol. 57(1):115-22). En células madre hematopoyéticas, el promotor de MND sintético (Li *et al.*, 2010 J Neurosci Methods. 189(1):56-64) y el promotor contenido en 2AUCOE (elemento de apertura de cromatina ubicuo) han mostrado que impulsan una expresión transgénica superior en todos los linajes celulares en comparación con los promotores de EF1 $\alpha$  y CMV, respectivamente (Zhang *et al.*, 2007 Blood. 110(5):1448-57; Koldej 2013 Hum Gene Ther Clin Dev. 24(2):77-85; Dighe *et al.*, 2014 PLoS One. 9(8):e104805). A la inversa, se ha mostrado que usar promotores para restringir la expresión únicamente a hepatocitos hepáticos tras la transferencia génica mediada por vector reduce las respuestas inmunitarias específicas de transgenes en sistemas en los que esto supone un riesgo, e incluso induce tolerancia inmunitaria frente a la proteína expresada (Zhang *et al.*, 2012 Hum Gene Ther. 23(5):460-72), lo cual puede ser beneficioso para algunos polipéptidos de tipo Affimer. Los promotores de  $\alpha$ 1-antitripsina (hAAT; 347 pb) y globulina de unión a tiroxina (TBG; ~400 pb) impulsan la expresión génica restringida al hígado con invasión mínima de otros tejidos (Yan *et al.*, 2012 Gene. 506(2):289-94; Cunningham *et al.*, 2008 Mol Ther. 16(6):1081-8).

En determinadas realizaciones, normalmente se deseará un mecanismo para controlar la duración y cantidad de expresión de compuesto de tipo Affimer codificado *in vivo*. Hay una variedad de promotores inducibles que pueden adaptarse para su uso con transferencia de genes de compuesto de tipo Affimer codificado basada en vector viral y en ADN de plásmido. Véase Fang *et al.* (2007) "An antibody delivery system for regulated expression of therapeutic levels of monoclonal antibodies *in vivo*" Mol Ther. 5(6):1153-9; y Perez *et al.* (2004) "Regulatable systemic production of monoclonal antibodies by *in vivo* muscle electroporation" Genet Vaccines Ther. 2(1):2. Un mecanismo regulable a modo de ejemplo actualmente en evaluación clínica es un interruptor génico basado en ecdisona mediante un ligando de molécula pequeña. Cai *et al.* (2016) "Plasma pharmacokinetics of veledimex, a small-molecule activator ligand for a proprietary gene therapy promoter system, in healthy subjects" Clin Pharmacol Drug Dev. 2016.

En determinadas realizaciones de los constructos de compuesto de tipo Affimer codificado, pueden usarse elementos reguladores postranscripcionales (PRE) virales; estos elementos de acción *in cis* se requieren para la exportación nuclear de ARN viral sin intrones (Huang y Yen, 1994 J Virol. 68(5):3193-9; y 1995 Mol Cell Biol. 15(7):3864-9). Los ejemplos incluyen HPRE (PRE de virus de la hepatitis B, 533 pb) y WPRE (PRE de virus de la hepatitis de la marmota, 600 pb), que pueden aumentar el nivel de expresión transgénica en casi 10 veces en determinados casos (Donello *et al.*, 1998 J Virol. 72(6):5085-92). Como ilustración adicional, usando vectores lentivirales y de VAA, se encontró que WPRE aumentaba la expresión transgénica impulsada por promotor de CMV, así como aumentaba la expresión transgénica impulsada por promotor de PPE, PDGF y NSE. Otro efecto del WPRE puede ser proteger transgenes de constructos de compuesto de tipo Affimer codificado frente al silenciamiento (Paterna *et al.*, 2000 Gene Ther. 7(15):1304-11; Xia *et al.*, 2007 Stem Cells Dev. 2007 Feb; 16(1):167-76).

La poliadenilación de un transcrito de compuesto de tipo Affimer codificado transcrito también puede ser importante para la exportación nuclear, traducción, y estabilidad de ARNm. Por tanto, en determinadas realizaciones, el constructo de compuesto de tipo Affimer codificado incluirá una secuencia de señal de poliadenilación. Hay una variedad de estudios disponibles que han determinado los efectos de diferentes señales de poliA sobre la expresión génica y estabilidad de ARNm. Las secuencias de señal de poliadenilación a modo de ejemplo incluyen secuencias

de señal tardía de VS40 o de poliA de hormona del crecimiento bovina (bGHpA), así como señal de poliA sintética mínima (SPA) (Levitt *et al.*, 1989 Genes Dev. 3(7):1019-25; Yew *et al.*, 1997 Hum Gene Ther. 1997 8(5):575-84). La eficiencia de la poliadenilación se aumenta mediante el potenciador en sentido 5' (USE) de señal de poliA tardía de VS40 colocado en sentido 5' de otras señales de poliA (Schek *et al.*, 1992 Mol Cell Biol. 12(12):5386-93). En determinadas realizaciones, simplemente como ilustración, el constructo de compuesto de tipo Affimer codificado incluirá una señal de poliA tardía de VS40 + 2xUSE.

Tabla 2: señales de poliadenilación a modo de ejemplo

Señal de poliA y USE	Intensidad relativa	Tamaño (pb)	Fuente	Referencia(s)
hGH	+	624	Hormona del crecimiento humana	Ostedgaard <i>et al.</i> Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 102(8):2952-2957
Tardía de VS40	+++	135	Virus del simio 40	Choi <i>et al.</i> Mol Brain. 2014 7:17
SPA (poliA sintética)	+	49	$\beta$ -Globina de conejo	Levitt <i>et al.</i> Genes Dev. 3(7):1019-1025; Yew <i>et al.</i> Hum Gene Ther. 1997 8(5):575-584; Ostedgaard <i>et al.</i> Proc Natl Acad Sci USA. 2005 102(8):2952-2957; Choi <i>et al.</i> Mol Brain. 2014 7:17
bGH	++	250	Hormona del crecimiento bovina	Yew <i>et al.</i> Hum Gene Ther. 1997 8(5):575-584; Xu <i>et al.</i> Gene Ther. 2001 8:1323-1332; Wu <i>et al.</i> Mol Ther. 2008 16(2):280-289; Gray <i>et al.</i> , Hum Gene Ther. 2011 22:1143-1153; Choi <i>et al.</i> Mol Brain. 2014 7:17
2xUSE tardío de VS40	++	100	Virus del simio 40	Schambach <i>et al.</i> Mol Ther. 2007 15(6):1167-1173; Choi <i>et al.</i> Mol Brain. 2014 7:17
USE de VIH-1	+	35	Virus de inmunodeficiencia humano 1	Schambach <i>et al.</i> Mol Ther. 2007 15(6):1167-1173
USE de GHV	+	39	Virus de la hepatitis de ardilla terrestre virus	Schambach <i>et al.</i> Mol Ther. 2007 15(6):1167-1173
USE de adenovirus (L3)	+	21	Adenovirus	Schambach <i>et al.</i> Mol Ther. 2007 15(6):1167-1173
USE de hTHGB	+	21	Protrombina humana	Schambach <i>et al.</i> Mol Ther. 2007 15(6):1167-1173
USE de hC2	+	53	Gen de complemento C2 humano	Schambach <i>et al.</i> Mol Ther. 2007 15(6):1167-1173

En determinadas realizaciones, puede ser deseable que el constructo de compuesto de tipo Affimer codificado incluya uno o más potenciadores reguladores, es decir, además de cualquier secuencia promotora. El potenciador de CMV está en el sentido 5' del promotor de CMV en de -598 a -68 (Boshart *et al.*, 1985 Cell. 41(2):521-30) (~600 pb) y contiene sitios de unión de transcripción. En determinadas realizaciones, puede incluirse un potenciador de CMV en el constructo para aumentar la expresión transgénica impulsada por promotor específica de tejido, tal como usando el promotor de ANF (factor natriurético auricular), el promotor de CC10 (célula Club 10), promotor de SP-C (proteína tensioactiva C), o el promotor de PDGF- $\beta$  (factor de crecimiento derivado de plaquetas  $\beta$ ) (simplemente como ejemplos). En conjunto, el potenciador de CMV aumenta la expresión transgénica en diferentes promotores específicos de célula y diferentes tipos de células haciendo que sea una herramienta ampliamente aplicable para aumentar los niveles de expresión transgénica. En el músculo, por ejemplo, en sistemas de expresión de VAA, la expresión transgénica usando el potenciador de CMV con un promotor específico de músculo puede aumentar los niveles de expresión de la proteína codificada por el transgén, de modo que será particularmente útil en la presente invención para expresar polipéptidos de tipo Affimer a partir de constructos de compuesto de tipo Affimer codificado introducidos en células musculares de un paciente.

Los constructos de compuesto de tipo Affimer codificado objeto también pueden incluir una o más secuencias intrónicas. Se describió por primera vez que la presencia de un intrón o secuencia intermedia en ARNm, *in vitro*, era importante para el procesamiento de ARNm y la expresión transgénica aumentada (Huang y Gorman, 1990 Mol Cell Biol. 10(4):1805-10; Niwa *et al.*, 1990 Genes Dev. 4(9):1552-9). El/los intrón/intrones puede(n) colocarse dentro de la secuencia codificante para el polipéptido de tipo Affimer y/o pueden colocarse entre el promotor y el transgén. Se comparó una variedad de intrones (tabla 3) colocados entre el promotor y el transgén, en ratones usando AAV2, para la expresión transgénica en el hígado (Wu *et al.*, 2008). El intrón de MVM (virus diminuto de ratones) aumentó la expresión transgénica más que ningún otro intrón sometido a prueba y más de 80 veces con respecto a la

ausencia de intrones (Wu *et al.*, 2008). Sin embargo, en neuronas cultivadas usando casetes de expresión de VAA, la expresión transgénica fue menor bajo un promotor de CaMKII con un intrón quimérico (donador de  $\beta$ -globina humana y aceptor de cadena pesada de inmunoglobulina) entre el transgén y la señal de poliA en comparación con un WPRE (Choi *et al.*, 2014). En conjunto, un intrón puede ser un elemento valioso para incluir en un casete de expresión para aumentar la expresión transgénica.

Tabla 3: intrones a modo de ejemplo

Intrón	Intensidad relativa	Tamaño (pb)	Fuente	Referencia(s)
MVM	+++	67-97	Virus diminuto de ratones	Wu <i>et al.</i> Mol Ther. 2008 16(2):280-289
Intrón 1 truncado de F.IX	+	300	Factor humano IX	Wu <i>et al.</i> Mol Ther. 2008 16(2):280-289; Kurachi <i>et al.</i> J Biol Chem. 1995 270(10):5276-5281
P-globina SD / cadena pesada de inmunoglobulina SA	+	250	Humano, pZac2.1	Wu <i>et al.</i> Mol Ther. 2008 16(2):280-289; Choi <i>et al.</i> Mol Brain. 2014;7:17
Adenovirus SD <sup>#</sup> / inmunoglobulina SA*	++	500	pAd $\beta$ 1	Wong <i>et al.</i> Chromosoma. 1985 92(2):124-135; Yew <i>et al.</i> Hum Gene Ther. 1997 8(5):575-584
Tardío de VS40 SD <sup>#</sup> / SA* (19S/16S)	+	180	pCMV $\beta$	Yew <i>et al.</i> Hum Gene Ther. 1997 8(5):575-584
Adenovirus híbrido SD <sup>#</sup> / IgG SA*	+++	230	Adenovirus	Choi <i>et al.</i> Mol Brain. 2014;7:17; Huang <i>et al.</i> Mol Cell Biol. 1990 10(4):1805-1810

En el caso de vectores episomales, los constructos de compuesto de tipo Affimer codificado objeto también pueden incluir uno o más orígenes de replicación, elementos de mantenimiento de minicromosomas (MME) y/o elementos de localización nuclear. Los vectores episomales de la invención tal como se define en las reivindicaciones comprenden una porción de un ADN genómico de virus que codifica para un origen de replicación (ori), que se requiere para que tales vectores puedan autorreplicarse y, por tanto, persistir en una célula huésped a lo largo de varias generaciones. Además, un vector episomal de la invención tal como se define en las reivindicaciones también puede contener uno o más genes que codifican para proteínas virales que se requieren para la replicación, es decir, proteína(s) replicadora(s). Opcionalmente, la(s) proteína(s) replicadora(s) que ayudan a iniciar la replicación pueden expresarse en trans en otra molécula de ADN, tal como en otro vector o en el ADN genómico huésped, en la célula huésped que contiene un vector de expresión episomal autorreplicante de esta invención tal como se define en las reivindicaciones. Los vectores de expresión que contienen LCR episomales autorreplicantes preferidos de la invención tal como se define en las reivindicaciones no contienen secuencias virales que no se requieren para el mantenimiento estable a largo plazo en una célula huésped eucariota tal como regiones de un ADN de genoma viral que codifica para proteínas del núcleo o la cápside que producirán partículas virales infecciosas o secuencias oncogénicas virales que pueden estar presentes en la molécula de ADN genómico viral de longitud completa. El término "mantenimiento estable" en el presente documento, se refiere a la capacidad de un vector de expresión episomal autorreplicante de esta invención tal como se define en las reivindicaciones para persistir o mantenerse en células no en división o en células de progenie de células en división en ausencia de selección continua sin una pérdida significativa (por ejemplo, >50 %) en el número de copias del vector durante dos y preferiblemente cinco o más generaciones. Los vectores más preferidos se mantendrán a lo largo de 10-15 o más generaciones de células. En cambio, la persistencia "transitoria" o "a corto plazo" de un plásmido en una célula huésped se refiere a la incapacidad de un vector para replicarse o segregarse en una célula huésped de una manera estable; es decir, el vector se perderá después de una o dos generaciones, o experimentará una pérdida de >51 % de su número de copias entre generaciones sucesivas.

A continuación se describen adicionalmente varios vectores episomales autorreplicantes, que contienen LCR, representativos útiles en el contexto de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones. La función autorreplicante puede proporcionarse alternativamente por una o más secuencias de mamífero tal como se describen por Wohlgeuth *et al.*, 1996, Gene Therapy 3:503; Vos *et al.*, 1995, Jour. Cell. Biol., sup. 21A, 433; y Sun *et al.*, 1994, Nature Genetics 8:33, opcionalmente en combinación con una o más secuencia que pueden requerirse para retención nuclear. La ventaja de usar secuencias de mamífero, especialmente humanas, para proporcionar la función autorreplicante, es que no se requiere ningún factor de activación externo que pueda tener propiedades tóxicas u oncogénicas. Un experto en la técnica entenderá que la invención tal como se define en las reivindicaciones no está limitada a ningún origen de replicación individual o ningún vector episomal individual, sino que abarca la combinación del control restringido a tejido de una LCR en un vector episomal. Véase también el documento WO1998007876 "Self-replicating episomal expression vectors conferring tissue-specific gene expression" y la patente estadounidense 7790446 "Vectors, cell lines and their use in obtaining extended episomal maintenance replication of hybrid plasmids and expression of gene products".

5 Vectores de expresión episomales autorreplicantes basados en Epstein-Barr. El origen latente oriP del virus de Epstein-Barr (VEB) se describe en Yates *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3806-3810 (1984); Yates *et al.*, Nature 313:812-815 (1985); Krysan *et al.*, Mol. Cell. Biol. 9:1026-1033 (1989); James *et al.* Gene 86: 233-239 (1990), Peterson y Legerski, Gene 107:279-284 (1991); y Pan *et al.*, Som. Cell Molec. Genet. 18:163-177 (1992)). Un vector episomal basado en VEB útil según la invención tal como se define en las reivindicaciones puede contener la región oriP de VEB que se porta en un fragmento de VEB de 2,61 kb y el gen de EBNA-1 que se porta en un fragmento de VEB de 2,18 kb. La proteína EBNA-1, que es el único producto génico viral requerido para soportar la replicación episomal trans de vectores que contienen oriP, puede proporcionarse en el mismo vector de expresión episomal que contiene oriP. También se entiende que, como con cualquier proteína tal como EBNA-1 que se sabe que se requiere para soportar la replicación de viral plásmido en trans, el gen también puede expresarse en otra molécula de ADN, tal como un vector de ADN diferente.

15 Vectores de expresión episomales autorreplicantes basados en virus del papiloma. Los vectores de expresión episomales de la invención tal como se define en las reivindicaciones también pueden basarse en funciones de replicación de la familia de virus del papiloma, incluyendo, pero sin limitarse a, virus del papiloma bovino (VPB) y virus del papiloma humanos (VPH). VPB y VPH persisten como plásmidos mantenidos de manera estable en células de mamífero. También se han identificado factores que actúan en trans de -S codificados por VPB y VPH, concretamente E1 y E2, que son necesarios y suficientes para mediar en la replicación en muchos tipos de células mediante origen de replicación mínimo (Ustav *et al.*, EMBO J. 10: 449-457 (1991); Ustav *et al.*, EMBO J. 10:4231-4329, (1991); Ustav *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 898-902 (1993)).

25 Un vector episomal útil según la invención tal como se define en las reivindicaciones es el sistema de vector VPB-1 descrito en Piirsoo *et al.*, EMBO J. , 15:1 (1996) y en el documento WO 94/12629. El sistema de vector VPB-1 descrito en Piirsoo *et al.* comprende un plásmido que alberga el origen de replicación de VPB-1 (origen mínimo más elemento de mantenimiento extracromosómico) y opcionalmente los genes de E1 y E2. Los genes de E1 y E2 de VPB-1 se requieren para el mantenimiento estable de un vector episomal de VPB. Estos factores garantizan que el plásmido se replica hasta un número de copias estable de hasta treinta copias por célula independientemente del estado de ciclo celular. Por tanto, el constructo génico persiste de manera estable en células tanto en división como no en división. Esto permite el mantenimiento del constructo génico en células tales como células madre hematopoyéticas y células precursoras más comprometidas.

35 El origen de replicación de VPB se ha localizado en el extremo 3' de la región reguladora en el sentido 5' dentro de un fragmento de ADN de 60 pares de bases (pb) (nucleótidos (nt) 7914 - 7927) que incluye sitios de unión para los factores de replicación E1 y E2. El origen de replicación mínimo de VPH también se ha caracterizado y localizado en el fragmento de URR (nt 7022- 7927) de VPH (véase, por ejemplo, Chiang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5799-5803 (1992)). Tal como se usa en el presente documento, "E1" se refiere a la proteína codificada por los nucleótidos (nt) 849-2663 de VPB de subtipo 1 o por los nt 832- 2779 de VPH de subtipo 11, a proteínas de E1 equivalentes de otros virus del papiloma, o a fragmentos o mutantes funcionales de una proteína E1 de virus del papiloma, es decir, fragmentos o mutantes de E1 que presentan las propiedades de replicación de E1.

45 Tal como se usa en el presente documento, "E2" se refiere a la proteína codificada por los nt 2594-3837 de VPB de subtipo 1 o por los nt 2723-3823 de VPH de subtipo 11, a proteínas E2 equivalentes de otros virus del papiloma, o a fragmentos o mutantes funcionales de una proteína E2 de virus del papiloma, es decir, fragmentos o mutantes de E2 que presentan las propiedades de replicación de E2. "Elemento de mantenimiento minicromosómico" (MME) se refiere al elemento de mantenimiento extracromosómico del genoma de virus del papiloma al que se unen proteínas virales o humanas esenciales para la replicación de virus del papiloma, región que es esencial para el mantenimiento episomal estable del MO de virus del papiloma en una célula huésped, tal como se describe en Piirsoo *et al.* (citado anteriormente). Preferiblemente, el MME es una secuencia que contiene múltiples sitios de unión para el activador transcripcional E2. El MME en VPB se define en el presente documento como la región de VPB ubicada dentro de la región reguladora en el sentido 5' que incluye un mínimo de aproximadamente seis sitios de unión a E2 secuenciales, y que proporciona un mantenimiento estable óptimo con aproximadamente diez sitios de unión a E2 secuenciales. El sitio de unión a E2 9 es una secuencia preferida para este sitio, tal como se describe a continuación en el presente documento, en el que los sitios secuenciales están separados por un separador de aproximadamente 4-10 nucleótidos, y de manera óptima de 6 nucleótidos. E1 y E2 pueden proporcionarse en el plásmido o bien en cis o bien en trans, también tal como se describe en el documento WO 94/12629 y en Piirsoo *et al.* (citado anteriormente).

60 "Sitio de unión a E2" se refiere a la secuencia mínima de ADN bicatenario de papilomavirus a la que se une la proteína E2. Un sitio de unión a E2 puede incluir la secuencia 5' ACCGTTGCCGGT 3', que es un sitio de unión a E2 9 de alta afinidad de la URR de VPB-1; alternatively, un sitio de unión a E2 puede incluir permutaciones del sitio de unión 9, permutaciones que se encuentran dentro de la URR, y se encuentran dentro de la secuencia de unión a E2 genérica 5' ACCN6GGT 3'. Uno o más sitios de unión a E2 de activador transcripcional están ubicados, en la mayoría de los papilomavirus, en la región reguladora en el sentido 5', como en VPB y VPH. Un vector que también es útil según la invención tal como se define en las reivindicaciones puede incluir una región de VPB entre 6959 - 7945/1 - 470 en el mapa genético de VPB (tal como se describe en el documento WO 94/12629), región que incluye



un origen de replicación, un primer promotor operativamente asociado con un gen de interés, el gen de E1 de VPB operativamente asociado con un segundo promotor para impulsar la transcripción del gen de E1; y el gen de E2 de VPB operativamente asociado con un tercer promotor para impulsar la transcripción del gen de E2.

E1 y E2 de VPB replicarán vectores que contienen el origen de VPB o el origen de muchos subtipos de VPH (Chiang *et al.*, citado anteriormente). E1 y E2 de VPH replicarán vectores mediante el origen de VPB y mediante el origen de muchos subtipos de VPH (Chiang *et al.*, citado anteriormente). Como con todos los vectores de la invención tal como se define en las reivindicaciones, los vectores de expresión episomales basados en VPB de la invención deben persistir a lo largo de 2-5 o más divisiones de la célula huésped.

Véase también la patente estadounidense 7790446 y Abroi *et al.* (2004) "Analysis of chromatin attachment and partitioning functions of bovine papillomavirus type 1 E2 protein". Journal of Virology 78:2100-13, que han mostrado que el MME dependiente de proteína E2 de VPB1 y las funciones de segregación/reparto de FR dependientes de EBNA1 de VEB funcionan independientemente de la replicación de los plásmidos. La función de mantenimiento estable de EBNA1/FR y E2/MME puede usarse para garantizar el mantenimiento episomal a largo plazo para orígenes de replicación celulares.

Vectores de expresión episomales autorreplicantes basados en papovavirus. Los vectores de la invención tal como se define en las reivindicaciones también pueden derivarse a partir de una molécula de ADN genómico de papovavirus humano BK. Por ejemplo, el genoma viral de BK puede digerirse con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI para producir un fragmento de 5 kilobases (kb) que contiene las secuencias de origen de replicación viral de BK que pueden conferir un mantenimiento estable sobre vectores (véase, por ejemplo, De Benedetti y Rhoads, Nucleic Acids Res. 19:1925 (1991), al igual que puede un fragmento de 3,2 kb del virus BK (Cooper y Miron, Human Gene Therapy 4:557 (1993)).

Los constructos de compuesto de tipo Affimer codificado de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones pueden proporcionarse como ácidos nucleicos circulares o lineales. Los ácidos nucleicos circulares y lineales son capaces de dirigir la expresión de la secuencia que codifica para el polipéptido de tipo Affimer en una célula objeto apropiada. El uno o más sistemas de ácido nucleico para expresar un polipéptido de tipo Affimer pueden ser quiméricos, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes.

#### Vectores virales

Los sistemas de terapia génica virales a modo de ejemplo que se adaptan fácilmente para su uso en la presente invención tal como se define en las reivindicaciones incluyen plásmido, adenovirus, virus adenoasociado (VAA), retrovirus, lentivirus, virus del herpes simple, virus vaccinia, poxvirus, reovirus, virus del sarampión, virus del bosque Semliki, y similares. Los vectores virales preferidos se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que genes no esenciales se han sustituido por el constructo de ácido nucleico que porta las secuencias de ácido nucleico que codifican para los epítomos y secuencias de direccionamiento de interés.

Como ilustración adicional, pueden suministrarse *in vivo* afímeros codificados usando adenovirus y virus adenoasociados (VAA), que son virus de ADN bicatenario que ya se han aprobado para su uso en terapia génica en seres humanos.

#### Vectores de adenovirus

Un método ilustrativo para el suministro *in vivo* de una o más secuencias de ácido nucleico implica el uso de un vector de expresión de adenovirus ("AdV"). Los AdV son virus de ADN bicatenario, sin envuelta, que ni se integran en el genoma huésped ni se replican durante la división celular. La transferencia de genes de anticuerpos mediada por AdV ha mostrado eficacia terapéutica en una variedad de modelos de enfermedad diferentes avanzando hacia la clínica. Principalmente se ha seguido la expresión sistémica de AcM, mediante inyección de AdV s.c. y especialmente i.v. e intramuscular. Véase Wold *et al.* (2013) "Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy" Curr Gene Ther. 13(6):421-33; y Deal *et al.* "Engineering humoral immunity as prophylaxis or therapy" 2015 Curr Opin Immunol. 35:113-22. Otras vías de suministro se han centrado en una producción de AcM más local, tal como mediante administración intranasal, intratraqueal o intrapleural del AdV codificante. El uso de AdV como vectores oncolíticos es un enfoque popular particularmente para la generación de anticuerpos codificados en el sitio de tumores. Los genes foráneos suministrados mediante sistema de suministro génico adenoviral actual son episomales y, por tanto, tienen una baja genotoxicidad frente a células huésped. Por tanto, la terapia génica usando sistemas de suministro génico adenovirales puede ser considerablemente segura. La presente invención tal como se define en las reivindicaciones contempla específicamente el suministro de polipéptidos de tipo Affimer mediante expresión de constructos de compuesto de tipo Affimer codificado suministrados en forma de un sistema de suministro y vector adenoviral.

Los adenovirus se han empleado habitualmente como vector de suministro génico debido a su genoma de tamaño medio, facilidad de manipulación, alto título, amplia gama de células diana y alta infectividad. Ambos extremos del

genoma viral contienen ITR (repeticiones terminales invertidas) de 100-200 pb, que son elementos en cis necesarios para la replicación de ADN viral y el empaquetamiento. La región de E1 (E1A y E1B) del genoma codifica para proteínas responsables de la regulación de transcripción del genoma viral y unos pocos genes celulares. La región E2 (E2A y E2B) codifica para proteínas responsables de la replicación de ADN viral. De los vectores adenovirales desarrollados hasta ahora, habitualmente se usa el adenovirus incompetente para la replicación que tiene la región E1 delecionada y representa una elección a modo de ejemplo de AdV para generar los constructos de compuesto de tipo Affimer codificado de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones. La región E3 delecionada en vectores adenovirales puede proporcionar un sitio de inserción para transgenes (Thimmappaya, B. *et al.*, Cell, 31:543-551(1982); y Riordan, J. R. *et al.*, Science, 245:1066-1073(1989)).

Se pretende que un "vector de expresión de adenovirus" incluya los constructos que contienen secuencias de adenovirus suficientes para (a) soportar el empaquetamiento del constructo y (b) expresar un polinucleótido que codifica para un polipéptido incluyendo un polipéptido de tipo Affimer (la secuencia de tipo Affimer codificada). En determinadas realizaciones, la secuencia para un compuesto de tipo Affimer codificado puede insertarse en la región promotora de DA. Según una realización a modo de ejemplo, el adenovirus recombinante comprende la región E1B y E3 delecionadas y la secuencia de nucleótidos para un compuesto de tipo Affimer codificado se inserta en la región E1B y E3 delecionada.

#### Vectores de virus adenoasociado (VAA)

Los VAA (o "VAAr" por VAA recombinante) son virus de ADN monocatenario, pequeños, sin envuelta, capaces de infectar células tanto en división como no en división. De manera similar a AdV, los vectores basados en VAA permanecen en un estado episomal en el núcleo y presentan un riesgo limitado de integración. A diferencia de la durabilidad generalmente limitada de la transferencia génica mediada por AdV, la expresión transgénica puede persistir durante años tras la administración de vector de VAA recombinante (VAAr) intramuscular.

Alipogen tiparvovec (Glybera™), un VAAr que codifica para el gen de lipoproteína lipasa humano, se aprobó en 2012 como primer producto de terapia génica en Europa. Desde entonces, actualmente hay diversos productos de terapia génica basados en VAAr en evaluación clínica. En el contexto de la transferencia de genes de anticuerpos, una variedad de informes han demostrado la producción *in vivo* de un AcM anti-virus de inmunodeficiencia humano (VIH) en ratones tras la inyección intramuscular del VAAr que codifica para AcM. También se ha demostrado el potencial del vector de VAAr para terapia de combinación, es decir expresando dos AcM. De manera similar a AdV, lo más habitualmente se ha seguido una administración de VAAr intramuscular e i.v. Revisado en Deal *et al.* "Engineering humoral immunity as prophylaxis or therapy" 2015 Curr Opin Immunol. 35:113-22. También se ha demostrado que una variedad de sitios de administración adicionales logran efectos terapéuticos más locales, incluyendo vías intracraneal, intranasal, intravítrea, intratecal, intrapleural, e intraperitoneal. Con la utilidad de VAAr demostrada para la transferencia de genes de anticuerpos, la presente invención tal como se define en las reivindicaciones también contempla específicamente el uso de sistemas de VAAr para el suministro de secuencias de tipo Affimer codificadas *in vivo* y la producción de polipéptidos de tipo Affimer en el cuerpo de un paciente como consecuencia de la expresión del constructo de VAAr.

Una característica importante de VAA es que estos virus de transferencia génica son capaces de infectar células no en división y diversos tipos de células, haciendo que sean útiles en la construcción del sistema de suministro de compuesto de tipo Affimer codificado de esta invención tal como se define en las reivindicaciones. Se encuentran descripciones detalladas para el uso y la preparación de vectores de VAA a modo de ejemplo, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 5.139.941 y 4.797.368, así como LaFace *et al.*, Viology, 162:483486 (1988), Zhou *et al.*, Exp. Hematol. (NY), 21:928-933 (1993), Walsh *et al.*, J. Clin. Invest., 94:1440-1448(1994) y Flotte *et al.*, Gene Therapy, 2:29-37(1995). VAA es una buena elección de vehículos de suministro debido a su seguridad, es decir, la modificación por ingeniería genética (recombinante) no se integra en el genoma huésped. Asimismo, VAA no es patógeno y no está asociado con ninguna enfermedad. La eliminación de secuencias codificantes virales minimiza las reacciones inmunitarias frente a la expresión de genes virales y, por tanto, el VAA recombinante no provoca una respuesta inflamatoria.

Normalmente, un virus de VAA recombinante se produce cotransfectando un plásmido que contiene el gen de interés (es decir, la secuencia codificante para un polipéptido de tipo Affimer) flanqueado por las dos repeticiones terminales de VAA (McLaughlin *et al.*, J. Virol., 62:1963-1973 (1988); Samulski *et al.*, J. Virol., 63:3822-3828 (1989)) y un plásmido de expresión que contiene las secuencias codificantes de VAA de tipo natural sin las repeticiones terminales (McCarty *et al.*, J. Virol., 65:2936-2945 (1991)). Normalmente, los vectores virales que contienen un constructo de compuesto de tipo Affimer codificado se ensamblan a partir de polinucleótidos que codifican para el polipéptido que contiene compuesto de tipo Affimer, elementos reguladores adecuados y elementos necesarios para la expresión del compuesto de tipo Affimer codificado que median en la transducción celular. En una realización, se emplean vectores de virus adenoasociados (VAA). En una realización más específica, el vector de VAA es un AAV1, AAV6, o AAV8.

El vector de expresión de VAA que alberga la secuencia de tipo Affimer codificada unida mediante ITR de VAA, puede construirse insertando directamente la(s) secuencia(s) seleccionada(s) en un genoma de VAA del que se han

escindido los marcos de lectura abierta ("ORF") de VAA principales.

Para células eucariotas, las secuencias de control de la expresión incluyen normalmente un promotor, un potenciador, tal como uno derivado de un gen de inmunoglobulina, VS40, citomegalovirus, etc. (véase anteriormente), y una secuencia de poliadenilación que puede incluir sitios donadores y aceptores de corte y empalme. La secuencia de poliadenilación se inserta generalmente tras las secuencias transgénicas y antes de la secuencia de ITR en 3'.

La selección de estos y otros elementos reguladores y de vector comunes es convencional, y hay muchas secuencias de este tipo disponibles. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, y referencias citadas en el mismo, por ejemplo, en las páginas 3, 18-3, 26 y 16, 17-16, 27 y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1989. Evidentemente, no todos los vectores y secuencias de control de la expresión funcionarán igual de bien para expresar todos los transgenes de esta invención tal como se define en las reivindicaciones. Sin embargo, un experto en la técnica puede realizar una selección entre estas secuencias de control de la expresión sin alejarse del alcance de esta invención. Un experto en la técnica puede seleccionar secuencias de promotor/potenciador adecuadas usando la orientación proporcionada por esta solicitud. Tal selección es una cuestión de rutina y no es una limitación de la molécula o constructo.

#### Vectores de retrovirus

Los virus no citopáticos útiles en el contexto del suministro de constructos de compuesto de tipo Affimer codificado incluyen retrovirus, cuyo ciclo de vida implica transcripción inversa de ARN viral genómico para dar ADN con posterior integración proviral en ADN celular huésped. Se han aprobado retrovirus para ensayos de terapia génica en seres humanos. Los más útiles son los retrovirus que son deficientes para la replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retrovirales genéticamente alterados tienen utilidad general para la transducción de alta eficiencia de genes *in vivo*. Los expertos en la técnica conocen bien protocolos convencionales para producir retrovirus defectuosos para la replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una línea celular de empaquetamiento con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de empaquetamiento, recogida de partículas virales a partir de medios de cultivo tisular, e infección de las células diana con partículas virales).

Con el fin de construir un vector retroviral, la secuencia que codifica para el polipéptido de tipo Affimer se inserta en el genoma viral en el lugar de determinadas secuencias virales para producir un virus defectuoso para la replicación. Para producir viriones, se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes gag, pol y env pero sin los componentes de LTR (repetición terminal larga) y psi (<sup>Ψ</sup>) (Mann *et al.*, Cell, 33:153-159(1983)). Cuando se introduce un plásmido recombinante que contiene el gen de citocina, LTR y psi en esta línea celular, la secuencia de psi permite empaquetar el transcrito de ARN del plásmido recombinante en partículas virales, que entonces se secretan en los medios de cultivo (Nicolas y Rubinstein "Retroviral vectors", en: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez y Denhardt (eds.), Stoneham: Butterworth, 494-513(1988)). Después se recogen los medios que contienen los retrovirus recombinantes, opcionalmente se concentran y se usan para sistema de suministro génico.

Se ha notificado la transferencia génica satisfactoria usando tales vectores retrovirales de segunda generación. Kasahara *et al.* (Science, 266:1373-1376(1994)) prepararon variantes de virus de leucemia murino de Moloney en los que se inserta la secuencia de EPO (eritropoyetina) en el lugar de la región de la envuelta, produciendo por consiguiente proteínas quiméricas que tienen propiedades de unión novedosas. Probablemente, el presente sistema de suministro génico puede construirse según las estrategias construcción para el vector retroviral de segunda generación.

En determinadas realizaciones, el retrovirus es un "gamma-retrovirus", que se refiere a un género de la familia de retrovirus. Los gamma-retrovirus a modo de ejemplo incluyen virus de células madre de ratón, virus de leucemia murino, virus de leucemia felino, virus de sarcoma felino, y virus de reticuloendoteliosis aviar.

En determinadas realizaciones preferidas, el vector retroviral para su uso en la presente invención tal como se define en las reivindicaciones es un vector lentiviral, que se refiere a un género de retrovirus que son capaces de infectar células en división y no en división y normalmente producen altos títulos virales. Varios ejemplos de lentivirus incluyen VIH (virus de inmunodeficiencia humano: incluyendo VIH de tipo 1, y VIH de tipo 2); virus de anemia infecciosa equino; virus de inmunodeficiencia felino (VIH); virus de inmunodeficiencia bovino (VIB); y virus de inmunodeficiencia del simio (VIS).

Otra clase de vectores retrovirales ampliamente usados que pueden usarse para el suministro y la expresión de un compuesto de tipo Affimer codificado incluyen los basados en virus de leucemia murino (MuLV), virus de leucemia del gibón (GaLV) y combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, Buchscher *et al.*, J. Virol. 66:2731-2739, 1992; Johann *et al.*, J. Virol. 66: 1635-1640, 1992; Sommerfelt *et al.*, Virol. 176:58-59, 1990; Wilson *et al.*, J. Virol.

63:2374-2378, 1989; Miller *et al.*, J. Virol. 65:2220-2224, 1991; y documento PCT/US94/05700).

Todavía otros vectores retrovirales que también pueden usarse en la presente invención tal como se define en las reivindicaciones incluyen, por ejemplo, vectores basados en espumavirus humano (HFV) u otros virus en el género *Spumavirus*. Los espumavirus (FV) son los retrovirus más grandes conocidos en la actualidad y están extendidos entre diferentes mamíferos, incluyendo todas las especies de primates no humanos, sin embargo están ausentes en los seres humanos. Esta apatogenicidad completa califica a los vectores de FV como vehículos de transferencia génica ideales para terapias genéticas en humanos y distingue claramente a los vectores de FV como sistema de suministro génico para vectores derivados de VIH y también derivados de gamma-retrovirus.

Se describen vectores retrovirales adecuados para su uso en el presente documento, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 5.399.346 y 5.252.479; y en las publicaciones WIPO WO 92/07573, WO 90/06997, WO 89/05345, WO 92/05266 y WO 92/14829, que proporcionan una descripción de métodos para introducir eficazmente ácidos nucleicos en células humanas usando tales vectores retrovirales. Otros vectores retrovirales incluyen, por ejemplo, vectores de virus de tumor de mama de ratón (por ejemplo, Shackleford *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:9655-9659, 1988), lentivirus, y similares.

Los sistemas de suministro de virus retrovirales adicionales que pueden adaptarse fácilmente para el suministro de un transgén que codifica para un polipéptido de tipo Affimer incluyen, simplemente como ilustración, las solicitudes PCT publicadas WO/2010/045002, WO/2010/148203, WO/2011/126864, WO/2012/058673, WO/2014/066700, WO/2015/021077, WO/2015/148683, WO/2017/040815.

En determinadas realizaciones, un vector retroviral contiene todas las secuencias de acción en cis necesarias para el empaquetamiento y la integración del genoma viral, es decir, (a) una repetición terminal larga (LTR), o porciones de la misma, en cada extremo del vector; (b) sitios de unión a cebador para síntesis de ADN de cadena negativa y positiva; y (c) una señal de empaquetamiento, necesaria para la incorporación de ARN genómico en viriones. Pueden encontrarse más detalles referentes a vectores retrovirales en Boesen, *et al.*, 1994, Biotherapy 6:291-302; Clowes, *et al.*, 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Kiem, *et al.*, 1994, Blood 83: 1467-1473; Salmons y Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4: 129-141; Miller, *et al.*, 1993, Met. Enzymol. 217:581-599; y Grossman y Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3: 110-114.

En determinadas realizaciones, el retrovirus es un retrovirus competente para la replicación recombinante que comprende: una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína GAG retroviral; una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína POL retroviral; una secuencia de ácido nucleico que codifica para una envuelta retroviral; una secuencia de polinucleótido oncorretroviral que comprende secuencias de repetición terminal larga (LTR) en el extremo 5' y 3' de la secuencia de polinucleótido oncorretroviral; un casete que comprende un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) operativamente unido a una secuencia codificante para un polipéptido de tipo Affimer en el que el casete está posicionado en 5' con respecto a la región U3 de la LTR en 3' y en 3' con respecto a la secuencia que codifica para la envuelta retroviral; y secuencias de acción en cis para transcripción inversa, empaquetamiento e integración en una célula diana.

En determinadas realizaciones, el retrovirus es un retrovirus competente para la replicación recombinante que comprende: una proteína GAG retroviral; una proteína POL retroviral; una envuelta retroviral; un polinucleótido retroviral que comprende secuencias de repetición terminal larga (LTR) en el extremo 3' de la secuencia de polinucleótido retroviral, una secuencia de promotor en el extremo 5' del polinucleótido retroviral, siendo el promotor adecuado para la expresión en una célula de mamífero, un dominio de ácido nucleico de gag, un dominio de ácido nucleico de pol y un dominio de ácido nucleico de env; un casete que comprende una secuencia de tipo Affimer codificada, en el que el casete está posicionado en 5' con respecto a la LTR en 3' y está operativamente unido y en 3' con respecto al dominio de ácido nucleico de env que codifica para la envuelta retroviral; y secuencias de acción en cis necesarias para transcripción inversa, empaquetamiento e integración en una célula diana.

En determinadas realizaciones preferidas del retrovirus competente para la replicación recombinante, la envuelta se elige de una de las envueltas de virus anfotrópico, politrópico, xenotrópico, 10A1, GALV, virus endógeno de babuino, RD114, rabdovirus, alfavirus, virus del sarampión o influenza.

En determinadas realizaciones preferidas del retrovirus competente para la replicación recombinante, la secuencia de polinucleótido retroviral se modifica por ingeniería a partir de un virus seleccionado del grupo que consiste en virus de leucemia murino (MLV), virus de leucemia murino de Moloney (MoMLV), virus de leucemia felino (FeLV), retrovirus endógeno de babuino (BEV), virus endógeno porcino (PERV), el retrovirus derivado de gato RD114, retrovirus de mono ardilla, virus relacionado con virus de leucemia murino xenotrópico (XMRV), virus de reticuloendoteliosis aviar (REV), o virus de leucemia del gibón (GALV).

En determinadas realizaciones preferidas del retrovirus competente para la replicación recombinante, el retrovirus es un gamma-retrovirus.

En determinadas realizaciones preferidas del retrovirus competente para la replicación recombinante, hay un

segundo casete que comprende una secuencia codificante para una segunda proteína terapéutica, tal como otro polipéptido inhibidor de punto de control, un polipéptido coestimulante y/o una citocina inmunoestimulante (simplemente como ejemplos), por ejemplo, en el sentido 3' del casete. En determinados casos, el segundo casete puede incluir un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) o un minipromotor o un promotor de polIII operativamente unido a la secuencia codificante para la segunda proteína terapéutica.

En determinadas realizaciones preferidas del retrovirus competente para la replicación recombinante, es un vector replicante retroviral anfotrópico, no lítico, que, preferiblemente, infecta de manera selectiva y se replica en las células del microentorno tumoral.

Otros vectores virales como constructos de expresión

En el contexto de transferencia de genes de compuesto de tipo Affimer codificado intratumoral con vector, los virus oncolíticos tienen una clara ventaja, ya que pueden seleccionar específicamente como diana células tumorales, reforzar la expresión de polipéptido de tipo Affimer terapéutico, y amplificar las respuestas terapéuticas antitumorales. Los virus oncolíticos, que se superponen con determinados sistemas virales descritos anteriormente, fomentan respuestas antitumorales mediante destrucción selectiva de célula tumorales e inducción de inmunidad antitumoral sistémica. Los mecanismos de acción no están completamente esclarecidos pero es probable que dependan de la replicación viral dentro de células transformadas, la inducción de muerte celular primaria, la interacción con elementos antivirales de células tumorales y el inicio de inmunidad antitumoral innata y adaptiva. Revisado en Kaufman *et al.* 2015 "Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs" Nat Rev Drug Discov. 14(9):642-62. Muchos de los virus oncolíticos que están actualmente en la clínica tienen un tropismo natural para proteínas de superficie celular que se expresan de manera aberrante por células cancerosas. Hasta ahora, AdV, poxvirus, coxsackievirus, poliovirus, virus del sarampión, virus de la enfermedad de Newcastle, reovirus, y otros han entrado en ensayos clínicos en fase temprana. En 2015, la FDA y la EMA aprobaron talimogen laherparepvec (T-VEC, Imlygic™), un virus del herpes oncolítico armado con el gen para factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). La naturaleza de autoperpetuación de los virus oncolíticos hace que sean una plataforma atractiva para la transferencia de genes de compuesto de tipo Affimer codificado de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones, ya que los productos transgénicos pueden amplificarse junto con la replicación viral, maximizando de ese modo el efecto terapéutico. Liu *et al.* 2008 "Oncolytic adenoviruses for cancer gene therapy" Methods Mol Biol. 433:243-58.

En el caso de polipéptidos de tipo Affimer que son proteínas de fusión grandes, es decir, que comprenden otros dominios de proteína más allá de un único dominio de tipo Affimer, la expresión intratumoral local puede presentar una estrategia atractiva para superar una escasa penetración en tumores sólidos si y cuando esto pueda suponer un problema. Beckman *et al.* (2007) "Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors" Cancer 109(2):170-9; y Dronca *et al.* 2015 "Immunomodulatory antibody therapy of cancer: the closer, the better" Clin Cancer Res. 21(5):944-6. Asimismo, la administración intratumoral del constructo de compuesto de tipo Affimer codificado y la expresión local concomitante del polipéptido de tipo Affimer pueden crear un mejor índice terapéutico cuyas toxicidades limitantes de la dosis pueden prevenir de lo contrario alcanzar la concentración intratumoral eficaz para la eficacia cuando el polipéptido de tipo Affimer se suministra (o expresa) de manera sistémica.

En el caso de los polipéptidos de tipo Affimer inmuno-oncológicamente activos de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones, tales como inhibidores de punto de control o agonistas coestimulantes, la naturaleza inmunomoduladora de estos compuestos de tipo Affimer es muy relevante para el uso de virus oncolíticos. De hecho, para la terapia con virus oncolíticos, es deseable anular las redes de inhibidor de punto de control inmunitario y crear de ese modo un entorno proinflamatorio dentro del cáncer. Actualmente hay en curso numerosos ensayos clínicos para evaluar la combinación de virus oncolíticos y administración de AcM inmunomoduladores convencionales. Kaufman *et al.* 2015 "Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs" Nat Rev Drug Discov. 14(9):642-62; y Lichty *et al.* 2014 "Going viral with cancer immunotherapy" Nat Rev Cancer. 14(8):559-67. Sin embargo, el tratamiento sistémico con AcM de bloqueo de puntos de control puede conducir a graves efectos adversos relacionados con el sistema inmunitario, destacando la oportunidad para terapias locales, por ejemplo mediante virus oncolíticos armados con compuesto de tipo Affimer codificado. Diferentes estudios han seguido este enfoque y pueden adaptarse fácilmente para su uso con los compuestos de tipo Affimer codificados objeto. Dias *et al.* armaron un AdV oncolítico competente y deficiente para la replicación con un AcM anti-CTLA-4 humano. Dias *et al.* 2012 "Targeted cancer immunotherapy with oncolytic adenovirus coding for a fully human monoclonal antibody specific for CTLA-4" Gene Ther. 19(10):988-98. Otro sistema recientemente descrito (y que puede adaptarse para su uso con los compuestos de tipo Affimer codificados de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones) implicó virus vaccinia oncolíticos armados con AcM Fab, scFv o de longitud completa anti-proteína de muerte celular programada murina 1 (PD-1). Reflejando la replicación de virus, los niveles de AcM en el tumor presentaron un pico 3-5 días tras la inyección intratumoral a 9 ó 30 µg/ml, dependiendo del modelo de tumor. Los niveles de AcM en suero siguieron la misma tendencia, pero tres o más veces inferior, aunque la detección de AcM se perdió después de 5 días. Los AcM expresados de manera intratumoral duraron más tiempo en comparación con la inyección intratumoral de proteína de AcM anti-PD-1, con un seguimiento limitado a 11 días tras la inyección. No se notificó la expresión de Fab y scFv. Las respuestas antitumorales del virus armado o bien con scFv o bien con

AcM anti-PD-1 fueron superiores al virus no armado y tan eficaces como la combinación del virus no armado e inyecciones sistémicas de proteína de AcM anti-PD-1. Kleinpeter *et al.* 2016 "Vectorization in an oncolytic vaccinia virus of an antibody, a Fab and a scFv against programmed cell death-1 (PD-1) allows their intratumoral delivery and an improved tumor-growth inhibition" *Oncimmunology*. 5(10):e1220467 (en línea). También recientemente, la administración intratumoral de una combinación de un AdV oncolítico y un AdV dependiente de agente auxiliar, armado con un mini-anticuerpo anti-PD-L1 (tal como proteína de fusión de CH2-CH3 de scFv), mejoró el efecto antitumoral de la terapia de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) en ratones. Los beneficios de mini-anticuerpo anti-PD-L1 producido de manera local no pudieron lograrse mediante la infusión de IgG anti-PD-L1 más células T con CAR y la administración conjunta de un AdV no armado. Tanoue *et al.* 2017 "Armed oncolytic adenovirus expressing PD-L1 mini-body enhances anti-tumor effects of chimeric antigen receptor cells T in solid tumors" *Cancer Res.* 77(8):2040-51. También se contempla el uso de este sistema, particularmente en combinación con terapia de células T con CAR, para su uso en el suministro de un compuesto de tipo Affimer codificado a un tumor diana.

Pueden emplearse otros vectores virales como sistema de suministro génico en la presente invención tal como se define en las reivindicaciones. Los vectores derivados de virus tales como virus vaccinia (Puhlmann M. *et al.*, *Human Gene Therapy*, 10:649-657(1999); Ridgeway, "Mammalian expression vectors", en: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Rodriguez and Denhardt, eds. Stoneham: Butterworth, 467-492(1988); Baichwal y Sugden, "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes", en: Kucherlapati R, ed. *Gene transfer*. Nueva York: Plenum Press, 117-148(1986) y Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10(1988)), lentivirus (Wang G. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 104(11):R55-62(1999)), virus del herpes simple (Chamber R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92:1411-1415(1995)), poxvirus (GCE, NJL, Krupa M, Esteban M., *The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer*, *Curr Gene Ther* 8(2):97-120(2008)), reovirus, virus del sarampión, virus del bosque Semliki, y poliovirus pueden usarse en los presentes sistemas de suministro para transferir el gen de interés al interior de células. Ofrecen varias características atractivas para diversas células de mamífero. También se incluyen virus de hepatitis B.

#### b. Vectores no virales

En 1990, Wolff *et al.* mostraron cómo la inyección de ADN de plásmido desnudo (ADNp) en el músculo esquelético de ratones conducía a la expresión local de la proteína codificada, iniciando el campo de productos terapéuticos basados en ADN. Véase Wolff *et al.* 1990 "Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*" *Science*. 247(4949 Pt 1):1465-8. El uso de "ADNp" para suministrar compuestos de tipo Affimer codificados de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones evita la necesidad de un virus como vector biológico, y presenta una plataforma atractiva para la transferencia de genes de compuesto de tipo Affimer codificado. En comparación con vectores virales, se considera que ADNp es poco inmunogénico (permitiendo, por ejemplo, dosificación repetida), es más económico de producir, enviar, y almacenar, y tiene una vida útil de almacenamiento mucho más prolongada. Tras entrar en el núcleo, el ADNp permanece en un estadio episomal sin integración no replicante, y se pierde durante la descomposición de la envuelta nuclear en la mitosis. El ADNp no tiene restricciones definidas con respecto al tamaño del transgén en comparación con vectores virales, y su naturaleza modular permite una clonación molecular directa, haciendo que sean fáciles de manipular y diseñar para uso terapéutico. Hardee *et al.* 2017 "Advances in non-viral DNA vectors for gene therapy" *Genes*. 8(2):65. Se usan plásmidos en aproximadamente el 17 % de los ensayos clínicos de terapia génica en curso o completados, y se muestra que son seguros y se toleran bien.

El método de administración de ADN puede tener un gran impacto sobre la expresión transgénica. La transferencia de genes de compuestos de tipo Affimer codificado mediada por ADN *in vivo* puede usar tales métodos físicos de transfección usados para la transferencia de genes de anticuerpos, tales como electroporación o inyección hidrodinámica. La electroporación presenta la propagación de campos eléctricos dentro de tejidos, lo cual induce un aumento transitorio en la permeabilidad de la membrana celular. La electrotransferencia de ADN es un procedimiento de múltiples etapas, que implica (i) migración electroforética de ADN hacia la membrana plasmática, (ii) acumulación de ADN e interacción con la membrana plasmática, y (iii) paso intracelular del ADN al núcleo, tras lo cual puede comenzar la expresión génica. Heller LC. 2015 "Gene electrotransfer clinical trials" *Adv Genet.* 89:235-62. Se ha evaluado la administración intramuscular, intratumoral e intradérmica en ensayos clínicos y también son tejidos diana adecuados para la electroporación de constructos de compuesto de tipo Affimer codificado.

La transfección de base hidrodinámica usa la inyección i.v. de altos volúmenes de ADNp, que impulsan moléculas de ADN fuera de la circulación sanguínea y al interior de tejido. Otros métodos de suministro físicos posiblemente menos invasivos incluyen sonoporación y magnetofección. También puede mejorarse la captación de ADN complejando las moléculas con vehículos de suministro químicos (por ejemplo, lípidos o polímeros catiónicos y nanopartículas de lípidos). Tales técnicas también pueden aplicarse a la transferencia de genes de compuesto de tipo Affimer codificado mediada por ADN *in vivo*.

Además de la elección del método de suministro, la expresión de transgenes de compuesto de tipo Affimer codificado puede mejorarse modificando la constitución de constructos de ADNp. Véase, por ejemplo, Hardee *et al.* 2017 "Advances in non-viral DNA vectors for gene therapy" *Genes* 8(2):65; y Simeikova *et al.* 2015 "Towards

effective non-viral gene delivery vector" *Biotechnol Genet Eng Rev.* 31(1-2):82-107. El ADNp convencional consiste en una unidad de transcripción y estructura principal bacteriana. La unidad de transcripción porta la secuencia de tipo Affimer codificada junto con elementos reguladores. La estructura principal bacteriana incluye elementos tales como un gen de resistencia a antibióticos, un origen de replicación, motivos de CpG no metilados, y posiblemente señales de expresión crípticas. Algunas de estas secuencias se requieren para la producción de ADN de plásmido. Sin embargo, en general, para la terapia génica con compuesto de tipo Affimer codificado terapéutico, la presencia de una estructura principal bacteriana será probablemente contraproducente. Sin embargo, hay una variedad de tipos diferentes de vectores mínimos disponibles que pueden seleccionarse, incluyendo ADN de minicírculo (ADNmc) que ya se usa para transferencia de genes de anticuerpos y puede adaptarse fácilmente para la transferencia de genes de compuesto de tipo Affimer codificado. Los minicírculos son moléculas de plásmido carentes de secuencias bacterianas, generadas mediante un procedimiento de recombinación, restricción y/o purificación. Simcikova *et al.* 2015, citado anteriormente. La eliminación de la estructura principal bacteriana ha mostrado una eficiencia de transfección superior y una expresión transgénica prolongada en una variedad de tejidos.

En el presente documento también se proporciona un ácido nucleico lineal, o casete de expresión lineal ("LEC"), que es capaz de suministrarse de manera eficiente a un sujeto mediante electroporación y que expresa la secuencia de tipo Affimer codificada incluida en el mismo. El LEC puede ser cualquier ADN lineal carente de cualquier estructura principal de fosfato. El LEC puede contener un promotor, un intrón, un codón de terminación, y/o una señal de poliadenilación. La expresión de la secuencia que codifica para compuesto de tipo Affimer codificado puede controlarse por el promotor.

#### Vectores de plásmido

En determinadas realizaciones, los constructos de compuestos de tipo Affimer codificados objeto se suministran como vectores de plásmido. Los vectores de plásmido se han descrito extensamente en la técnica y los conocen bien los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, citado anteriormente. En los últimos años, se han usado vectores de plásmido como vacunas de ADN para suministrar genes que codifican para antígeno a células *in vivo*. Son particularmente ventajosos para esto porque reducen las preocupaciones de seguridad con respecto a otros vectores. Sin embargo, estos plásmidos, que tienen un promotor compatible con la célula huésped, pueden expresar un epítipo peptídico codificado por ácido nucleico dentro del plásmido. Los expertos habituales en la técnica conocen bien otros plásmidos. Adicionalmente, pueden diseñarse plásmidos de manera personalizada usando enzimas de restricción y reacciones de ligación para eliminar y añadir fragmentos de ADN específicos. Pueden suministrarse plásmidos por una variedad de vías parenterales, mucosas y tópicas. Por ejemplo, el plásmido de ADN puede inyectarse por vías intramuscular, intradérmica, subcutánea, u otras. También puede administrarse mediante pulverizaciones o gotas intranasales, supositorio rectal y por vía oral. También puede administrarse en la epidermis o una superficie mucosa usando una pistola génica. Los plásmidos pueden administrarse en una disolución acuosa, secos sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de suministro de ADN incluyendo, pero sin limitarse a, liposomas, dendrímeros, coqueato y microencapsulación.

Para expandir la aplicación y eficiencia del uso de ADN de plásmido para suministrar un constructo de compuesto de tipo Affimer codificado a tejido *in vivo*, pueden seguirse diferentes enfoques basándose en principios que producen una eficacia global o expresión de AcM superior en informes de la técnica anterior. Una primera estrategia se basa simplemente en administrar dosis de ADNp múltiples o repetidas. Kitaguchi *et al.* 2005 "Immune deficiency enhances expression of recombinant human antibody in mice after nonviral *in vivo* gene transfer" *Int J Mol Med* 16(4):683-8; y Yamazaki *et al.* 2011 "Passive immune-prophylaxis against influenza virus infection by the expression of neutralizing anti-hemagglutinin monoclonal antibodies from plasmids" *Jpn J Infect Dis.* 64(1):40-9. Otro enfoque se refiere al uso de un adyuvante de suministro. La electrottransferencia de ADNp puede potenciarse mediante tratamiento previo del músculo con hialuronidasa, una enzima que descompone de manera transitoria ácido hialurónico, reduciendo la viscosidad de la matriz extracelular y facilitando la difusión de ADN. Yamazaki *et al.* 2011, citado anteriormente; y McMahon *et al.* 2001 "Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase: increased expression with reduced muscle damage" *Gene Ther.* 8(16):1264-70. Para la transferencia de genes de anticuerpos, esto condujo a un aumento de la expresión de AcM de aproximadamente 3,5 veces, alcanzando títulos pico en plasma de 3,5 µg/ml con 30 µg de ADNp, y puede adaptarse por un experto en la técnica para la transferencia de genes de compuesto de tipo Affimer codificado. Todavía otra estrategia se centra en modificación por ingeniería de anticuerpo o casete. Tras la optimización de codones, ARN y secuencia líder, se han alcanzado títulos pico de AcM o Fab en suero con electrottransferencia intramuscular de ADNp "optimizado". Véase, por ejemplo, Flingai *et al.* 2015 "Protection against dengue disease by synthetic nucleic acid antibody prophylaxis/immunotherapy" *Sci Rep.* 5:12616.

El propósito del plásmido es el suministro eficiente de secuencias de ácido nucleico y la expresión de polipéptidos de tipo Affimer terapéuticos en una célula o tejido. En particular, el propósito del plásmido puede ser lograr un alto número de copias, evitar posibles causas de inestabilidad de plásmido y proporcionar un medio para la selección de plásmidos. En cuanto a la expresión, el casete de ácido nucleico contiene los elementos necesarios para la expresión del compuesto de tipo Affimer codificado dentro del casete. La expresión incluye la transcripción eficiente de un gen insertado, secuencia de ácido nucleico, o casete de ácido nucleico con el plásmido. Por tanto, en un aspecto, se proporciona un plásmido para la expresión de constructo de compuesto de tipo Affimer codificado que

incluye un casete de expresión que comprende la secuencia codificante para el polipéptido de tipo Affimer; también denominada unidad de transcripción. Cuando se coloca un plásmido en un entorno adecuado para la expresión de epítipo, la unidad de transcripción expresará el polipéptido de tipo Affimer y cualquier otra cosa codificada en el constructo. La unidad de transcripción incluye una secuencia de control transcripcional, que está transcripcionalmente unida con una secuencia que codifica para elemento de respuesta inmunitaria celular. La secuencia de control transcripcional puede incluir secuencias de promotor/potenciador tales como secuencias de promotor/potenciador de citomegalovirus (CMV), tal como se describió anteriormente. Sin embargo, los expertos en la técnica reconocerán que se conoce una variedad de otras secuencias de promotor adecuadas para la expresión en células de mamífero, incluyendo células de pacientes humanos, y pueden usarse de manera similar en los constructos divulgados en el presente documento. El nivel de expresión del polipéptido de tipo Affimer dependerá del promotor asociado y de la presencia y activación de un elemento potenciador asociado.

En determinadas realizaciones, la secuencia de tipo Affimer codificada (que codifica para el polipéptido de tipo Affimer deseado) puede clonarse en un plásmido de expresión que contiene los elementos reguladores para la transcripción, traducción, estabilidad de ARN y replicación (es decir, incluyendo una secuencia de control transcripcional). Tales plásmidos de expresión se conocen bien en la técnica y un experto habitual será capaz de diseñar un constructo de expresión apropiado para producir un polipéptido de tipo Affimer recombinante *in vivo*.

#### Minicírculo

La transferencia de genes de anticuerpos basada en minicírculo (ADNmc) también puede adaptarse para el suministro de compuestos de tipo Affimer codificados a tejidos *in vivo*. En determinadas circunstancias, el ADN de plásmido usado para el suministro génico no viral puede provocar respuestas inflamatorias inaceptables. Cuando sucede esto, las respuestas inmunotóxicas se deben en gran medida a la presencia de motivos de CpG sin metilar y a sus secuencias estimulantes asociadas sobre plásmidos tras la propagación bacteriana de ADN de plásmido. La simple metilación de ADN *in vitro* puede ser suficiente para reducir una respuesta inflamatoria, pero puede dar como resultado una expresión génica reducida. La eliminación de islas de CpG mediante clonación, o la eliminación de secuencias no esenciales ha sido una técnica satisfactoria para reducir las respuestas inflamatorias. Yew *et al.* 2000 "Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs" *Mol Ther* 1(3), 255-62.

Dado que el ADN bacteriano contiene en promedio 4 veces más islas de CpG que el ADN de mamífero, una buena solución es eliminar completamente las regiones de control bacterianas, tales como el origen de replicación y los genes de resistencia a antibióticos, a partir de vectores de suministro génico durante el procedimiento de producción de plásmidos. Por tanto, el plásmido "original" se recombina para dar un "minicírculo" que generalmente comprende el gen que va a suministrarse (en este caso, la secuencia que codifica para compuesto de tipo Affimer codificado) y regiones de control adecuadas para su expresión, y un miniplásmido que generalmente comprende el resto del plásmido original.

Se necesita que la eliminación de secuencias bacterianas sea eficiente, usando el sitio de escisión más pequeño posible, al tiempo que se creen minicírculos de ADN superenrollados que consistan únicamente en elementos de expresión génica en regiones de control apropiadas (preferiblemente de mamífero). Algunas técnicas para la producción de minicírculos usan recombinación mediada por integrasa de fago lambda ( $\lambda$ ) bacteriana para producir ADN de minicírculo. Véase, por ejemplo, Darquet, *et al.* 1997 *Gene Ther* 4(12): 1341-9; Darquet *et al.* 1999 *Gene Ther* 6(2): 209-18; y Kreiss, *et al.* 1998 *Appl Microbiol Biotechnol* 49(5):560-7).

Por tanto, realizaciones de constructos de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden procesarse en forma de ADN de minicírculo. El ADN de minicírculo se refiere a derivados de plásmido circular pequeños (2-4 kb) que se han liberado de todas las partes de vector procariota. Dado que los vectores de ADN de minicírculo no contienen ninguna secuencia de ADN bacteriana, es menos probable que se perciban como foráneos y se destruyan. Como resultado, estos vectores pueden expresarse durante periodos de tiempo más prolongados en comparación con determinados plásmidos convencionales. El tamaño más pequeño de los minicírculos también prolonga su capacidad de clonación y facilita su suministro al interior de células. En la técnica se conocen kits para producir ADN de minicírculo y están comercialmente disponibles (System Biosciences, Inc., Palo Alto, Calif.). Se proporciona información sobre ADN de minicírculo en Dietz *et al.*, *Vector Engineering and Delivery Molecular Therapy* (2013); 218, 1526-1535 y Hou *et al.*, *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, número de artículo: 14062 (2015) doi:10.1038/mtm.2014.62. Se proporciona más información sobre minicírculos en Chen Z Y, He C Y, Ehrhardt A, Kay M A. *Mol Ther.*, septiembre de 2003; 8(3):495-500 y los vectores de ADN de minicírculo logran una expresión sostenida reflejada por el nivel transcripcional y de cromatina activa. Gracey Maniar L E, Maniar J M, Chen Z Y, Lu J, Fire A Z, Kay M A. *Mol Ther.*, enero de 2013; 21(1):131-8.

Como ejemplo no limitativo, puede producirse un vector de ADN de minicírculo de la siguiente manera. Un casete de expresión, que comprende la secuencia que codifica para compuesto de tipo Affimer codificado junto con elementos reguladores para su expresión, está flanqueado por sitios de unión para una recombinasa. Una secuencia que codifica para la recombinasa está ubicada fuera del casete de expresión e incluye elementos para la expresión inducible (tales como, por ejemplo, un promotor inducible). Con la inducción de la expresión de recombinasa, se



recombina el ADN de vector, dando como resultado dos moléculas de ADN circular diferenciadas. Una de las moléculas de ADN circular es relativamente pequeña, formando un minicírculo que comprende el casete de expresión para el compuesto de tipo Affimer codificado; este vector de ADN de minicírculo carece de cualquier secuencia de ADN bacteriana. La segunda secuencia de ADN circular contiene la secuencia de vector restante, incluyendo las secuencias bacterianas y la secuencia que codifica para la recombinasa. Entonces puede aislarse por separado y purificarse el ADN de minicírculo que contiene la secuencia de tipo Affimer codificada. En determinadas realizaciones, puede producirse un vector de ADN de minicírculo usando plásmidos similares a pBAD.Φ.C31.hFIX y pBAD.Φ.C31.RHB. Véase, por ejemplo, Chen *et al.* (2003) Mol. Ther. 8:495-500.

Las recombinasas a modo de ejemplo que pueden usarse para crear un vector de ADN de minicírculo incluyen, pero no se limitan a, integrasa de bacteriófago Φ31 de *Streptomyces*, recombinasa Cre, y el complejo de integrasa /ADN topoisomerasa IV. Cada una de estas recombinasas cataliza la recombinación entre sitios distintos. Por ejemplo, la integrasa de Φ31 cataliza la recombinación entre sitios de attP y attB correspondientes, la recombinasa Cre cataliza la recombinación entre sitios loxP, y el complejo de integrasa /ADN topoisomerasa IV cataliza la recombinación entre sitios attP y attB de bacteriófago λ. En determinadas realizaciones, tal como, por ejemplo, con integrasa de Φ31 o con integrasa λ en ausencia de la proteína λ, la recombinasa media en una reacción irreversible para proporcionar una población única de productos circulares y, por tanto, altos rendimientos. En otras realizaciones, tales como por ejemplo, con recombinasa Cre o con integrasa λ en presencia de la proteína λ, la recombinasa media en una reacción reversible para proporcionar una mezcla de productos circulares y, por tanto, rendimientos inferiores. La reacción reversible mediante recombinasa Cre puede manipularse empleando sitios loxP71 y loxP66 mutantes, que se recombinan con alta eficiencia para proporcionar un sitio P71/66 funcionalmente alterado en la molécula de minicírculo y un sitio loxP de tipo natural en la molécula de minicírculo, desplazando de ese modo el equilibrio hacia la producción del producto de ADN de minicírculo.

La solicitud estadounidense publicada 20170342424 también describe un sistema que hace uso de un plásmido original que está expuesto a una enzima que provoca la recombinación en sitios de recombinación, formando de ese modo (i) un minicírculo que incluye la secuencia de tipo Affimer codificada y (ii) un miniplásmido que comprende el resto del plásmido original. Un sitio de recombinación está modificado en el extremo 5' de tal manera que su reacción con la enzima es menos eficiente que el sitio de tipo natural, y el otro sitio de recombinación está modificado en el extremo 3' de tal manera que su reacción con la enzima es menos eficiente que el sitio de tipo natural, estando ambos sitios modificados ubicados en el minicírculo tras la recombinación. Esto favorece a la formación de minicírculo.

#### c. Transferencia de genes de compuesto de tipo Affimer codificado mediada por ARN

Los ácidos nucleicos o polinucleótidos a modo de ejemplo para los polipéptidos de tipo Affimer codificados de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones incluyen, pero no se limitan a, ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos nucleicos de treosa (ANT), ácidos nucleicos de glicol (ANG), ácidos nucleicos peptídicos (ANP), ácidos nucleicos bloqueados (ANB), incluyendo ANB que tiene una configuración β-D-ribo, α-ANB que tiene una configuración α-L-ribo (un diastereómero de ANB), 2'-amino-ANB que tiene una funcionalización 2'-amino, y 2'-amino-α-ANB que tiene una funcionalización 2'-amino), ácidos nucleicos de etileno (ANE), ácidos nucleicos de ciclohexenilo (ANCe) o híbridos o combinaciones de los mismos.

ARNm presenta una plataforma emergente para la transferencia de genes de anticuerpos que puede adaptarse por los expertos en la técnica para el suministro de constructos de compuesto de tipo Affimer codificado de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones. Aunque los resultados actuales difieren considerablemente, en determinados casos los constructos de ARNm parecen ser capaces de rivalizar con los vectores virales en cuanto a los títulos de AcM en suero generados. Los niveles estaban en intervalos terapéuticamente relevantes dentro del plazo de horas tras la administración de ARNm, un desplazamiento marcado en la velocidad en comparación con ADN. El uso de nanopartículas lipídicas (LNP) para la transfección de ARNm, en vez de los métodos físicos normalmente requeridos para ADN, puede proporcionar ventajas significativas en determinadas realizaciones hacia el intervalo de aplicación.

En su estudio de 1990, Wolff *et al.* (1990, citado anteriormente) encontraron que, además de ADNp, la inyección intramuscular de ARNm transcrito *in vitro* (IVT) también condujo a la expresión local de la proteína codificada. No se siguió el ARNm tan activamente como el ADN en ese momento debido a su baja estabilidad. El progreso a lo largo de los últimos años ha permitido que el ARNm alcance al ADN y los vectores virales como herramienta para transferencia génica. Revisado en Sahin *et al.* (2014) "mRNA-based therapeutics: developing a new class of drugs" Nat Rev Drug Discov. 13(10):759-80. Desde el punto de vista conceptual, hay varias diferencias con estas plataformas de expresión. El ARNm no necesita entrar en el núcleo para ser funcional. Una vez que alcanza el citoplasma, el ARNm se traduce de manera instantánea. Los productos terapéuticos basados en ARNm se expresan de manera más transitoria en comparación con la transferencia génica mediada por ADN (o vector viral), y no suponen el riesgo de mutagénesis por inserción en el genoma huésped. La producción de ARNm es relativamente sencilla y económica. En cuanto a la administración, la captación de ARNm puede potenciarse usando electroporación. Broderick *et al.* 2017 "Enhanced delivery of DNA or RNA vaccines by electroporation" Methods Mol

Biol. 2017;1499:193-200. Sin embargo, el principal enfoque se ha centrado en métodos de transfección no físicos. De hecho, se ha desarrollado una variedad de formulaciones de complejación de ARNm, incluyendo nanopartículas lipídicas (LNP), que han demostrado ser portadores de ARNm seguros y muy eficientes para la administración en una variedad de tejidos e i.v., Pardi *et al.* 2015 "Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes" J Control Release 217:345-51. En línea con este avance, el ARNm de IVT ha alcanzado la etapa de evaluación clínica.

Beissert *et al.*, documento WO2017162266 "RNA Replicon for Versatile and Efficient Gene Expression", describen agentes y métodos adecuados para la expresión eficiente de compuestos de tipo Affimer de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones, tales como adecuados para el tratamiento inmunoterapéutico para la prevención y terapia de tumores. Por ejemplo, la secuencia que codifica para el polipéptido de tipo Affimer puede proporcionarse como replicón de ARN que comprende una secuencia de reconocimiento de la replicación en 5' tal como a partir de una secuencia de reconocimiento de la replicación en 5' de alfavirus. En determinadas realizaciones, el replicón de ARN comprende una secuencia de reconocimiento de la replicación en 5' (modificada) y un marco de lectura abierto que codifica para el polipéptido de tipo Affimer, en particular ubicado en el sentido 3' con respecto a la secuencia de reconocimiento de la replicación en 5' de tal manera que la secuencia de reconocimiento de la replicación en 5' y el marco de lectura abierto no se superponen, por ejemplo la secuencia de reconocimiento de la replicación en 5' no contiene un codón de iniciación funcional y, preferiblemente, no contiene ningún codón de iniciación. Lo más preferiblemente, el codón de iniciación del marco de lectura abierto que codifica para el polipéptido de tipo Affimer está en el sentido 5' → 3' del replicón de ARN.

En determinadas realizaciones, para evitar la activación inmunitaria, pueden incorporarse nucleósidos modificados en el ARNm transcrito *in vitro*. En determinadas realizaciones, el ARN de IVT puede presentar los centros activos en 5' ocupados, tal como una IVT con centros activos ocupados con m7G5'ppp5'G2'-O-Met. La traducción eficiente del ARNm modificado puede garantizarse retirando el ARN bicatenario. Además, las UTR en 5' y 3' y la cola de poli(A) pueden optimizarse para una eficiencia translacional y estabilidad intracelular mejoradas. Véase, por ejemplo, Stadler *et al.* (2017) Nature Medicine 23:815-817 y Kariko *et al.*, documento WO/2017/036889 "Method for Reducing Immunogenicity of RNA".

En determinadas realizaciones, el ARNm que codifica para el polipéptido de tipo Affimer puede incluir al menos una modificación química descrita en el presente documento. Como ejemplo no limitativo, la modificación química puede ser 1-metilpseudouridina, 5-metilcitosina o 1-metilpseudouridina y 5-metilcitosina. En una realización, los polinucleótidos lineales que codifican para uno o más polipéptidos de tipo Affimer de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones que se producen usando únicamente métodos de síntesis enzimática de transcripción *in vitro* (IVT) se denominan "polinucleótidos de IVT". En la técnica se conocen métodos de producción de polinucleótidos de IVT y se describen en la solicitud PCT WO2013/151666.

En otra realización, los polinucleótidos que codifican para el polipéptido de tipo Affimer de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones tienen porciones o regiones que difieren en cuanto al tamaño y/o patrón de modificación química, posición de modificación química, porcentaje de modificación química o población de modificación química y combinaciones de los anteriores se conocen como "polinucleótidos quiméricos". Una "quimera" útil en la presente invención es una entidad que tiene dos o más partes o regiones incongruentes o heterogéneas. Tal como se usa en el presente documento, una "parte" o "región" de un polinucleótido se define como cualquier porción del polinucleótido que es menor que la longitud completa del polinucleótido. Tales constructos se enseñan, por ejemplo, en la solicitud PCT WO2015/034928.

En aún otra realización, los polinucleótidos de la presente invención que son circulares se conocen como "polinucleótidos circulares" o "circP". Tal como se usa en el presente documento, "polinucleótidos circulares" o "circP" significa un polinucleótido circular monocatenario que actúa sustancialmente como, y tiene las propiedades de, un ARN. También se pretende que el término "circular" abarque cualquier configuración secundaria o terciaria del circP. Tales constructos se enseñan, por ejemplo, en las solicitudes PCT WO2015/034925 y WO2015/034928.

ARNm a modo de ejemplo (y otros polinucleótidos) que pueden usarse para codificar polipéptidos de tipo Affimer de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones incluyen los que pueden adaptarse a partir de las memorias descriptivas y figuras, por ejemplo, de las publicaciones PCT WO2017/049275, WO2016/118724, WO2016/118725, WO2016/011226, WO2015/196128, WO/2015/196130, WO/2015/196118, WO/2015/089511, con el documento WO2015/105926 (este último titulado "Polynucleotides for the *In vivo* Production Of Antibodies").

La electroporación, tal como se describe a continuación, es un método a modo de ejemplo para introducir ARNm u otro polinucleótidos en una célula.

Las composiciones de nanopartículas que contienen lípidos han demostrado ser eficaces como vehículos de transporte al interior de células y/o compartimentos intracelulares para una variedad de ARN (y polinucleótidos relacionados descritos en el presente documento). Estas composiciones incluyen generalmente uno o más lípidos "catiónicos" y/o ionizable, fosfolípidos que incluyen lípidos poliinsaturados, lípidos estructurales (por ejemplo, esteroides), y lípidos que contienen polietilenglicol (PEG-lípidos). Los lípidos catiónicos y/o ionizables incluyen, por

ejemplo, lípidos que contienen amina que pueden protonarse fácilmente.

d. Suministro de constructos de compuesto de tipo Affimer codificado al interior de células diana

- 5 La introducción en célula huésped del sistema de suministro génico puede realizarse mediante diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Cuando se construye el presente sistema de suministro génico basándose en la construcción de vectores virales, el suministro puede realizarse como métodos de infección convencionales conocidos en la técnica.

- 10 Los métodos físicos para potenciar el suministro de constructos de compuesto de tipo Affimer codificado tanto virales como no virales incluyen electroporación (Neumann, E. *et al.*, EMBO J., 1:841(1982); y Tur-Kaspa *et al.*, Mol. Cell Biol., 6:716-718(1986)), bombardeo génico (Yang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572 (1990) en el que se carga ADN en partículas (por ejemplo, de oro) y se fuerza para lograr la penetración del ADN en las células,
- 15 sonoporación, magnetofección, suministro hidrodinámico y similares, todos los cuales los conocen los expertos en la técnica.

#### Electroporación

- 20 En los últimos años, ha habido un gran avance en la tecnología de suministro de ADN de plásmido que se usa para la producción *in vivo* de proteínas. Esto incluye optimización de codones para la expresión en células humanas, optimización de ARN para mejorar la estabilidad de ARNm así como traducción más eficiente a nivel ribosómico, la adición de secuencias líder específicas para potenciar la eficiencia de traducción, la creación de insertos sintéticos para potenciar adicionalmente la producción *in vivo* y el uso de protocolos de suministro de electroporación (EP)
- 25 adaptativos mejorados para mejorar el suministro *in vivo*. EP ayuda en el suministro de ADN de plásmido generando un campo eléctrico que permite que el ADN pase al interior de la célula de manera más eficiente. La electroporación *in vivo* es una técnica de suministro génico que se ha usado satisfactoriamente para el suministro eficiente de ADN de plásmido a muchos tejidos diferentes. Kim *et al.* "Gene therapy using plasmid DNA-encoded anti-HER2 antibody for cancers that overexpress HER2" (2016) Cancer Gene Ther. 23(10): 341-347 enseña un vector y sistema de
- 30 electroporación para inyección intramuscular y electroporación *in vivo* de los plásmidos que da como resultado la expresión de anticuerpo alta y sostenida en sueros; el plásmido y sistema de electroporación de Kim *et al.* pueden adaptarse fácilmente para el suministro *in vivo* de un plásmido para expresar un compuesto de tipo Affimer codificado de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones.

- 35 Por consiguiente, en determinadas realizaciones particulares de la presente divulgación, el constructo de compuesto de tipo Affimer codificado se introduce en células diana mediante electroporación.

- La administración de la composición mediante electroporación puede lograrse usando dispositivos de electroporación que pueden configurarse para suministrar a, un tejido deseado de un mamífero, un impulso de energía eficaz para
- 40 provocar que se formen poros reversibles en membranas celulares, y preferiblemente el impulso de energía es una corriente constante similar a una corriente previamente establecida introducida por un usuario. El dispositivo de electroporación puede comprender un componente de electroporación y un conjunto de electrodo o conjunto de gestión. El componente de electroporación puede incluir e incorporar uno o más de los diversos elementos de los dispositivos de electroporación, incluyendo: controlador, generador de forma de onda de corriente, dispositivo de
- 45 prueba de impedancia, dispositivo de registro de forma de onda, elemento de entrada, elemento de notificación de estado, puerto de comunicación, componente de memoria, fuente de potencia, e interruptor de potencia. La electroporación puede lograrse usando un dispositivo de electroporación *in vivo*, por ejemplo sistema CELLECTRA EP (VGX Pharmaceuticals, Blue Bell, Pa.) o electroporador Elgen (Genetronics, San Diego, Calif.) para facilitar la transfección de células mediante el plásmido.

- 50 El componente de electroporación puede funcionar como elemento de los dispositivos de electroporación, y los otros elementos son elementos (o componentes) independientes en comunicación con el componente de electroporación. El componente de electroporación puede funcionar como más de un elemento de los dispositivos de electroporación, que pueden estar en comunicación con todavía otros elementos de los dispositivos de electroporación
- 55 independientes del componente de electroporación. Los elementos de los dispositivos de electroporación que existen como partes de un dispositivo electromecánico o mecánico pueden no estar limitados dado que los elementos pueden funcionar como un dispositivo o como elementos independientes en comunicación entre sí. El componente de electroporación puede ser capaz de suministrar el impulso de energía que produce la corriente constante en el tejido deseado, e incluye un mecanismo de realimentación. El conjunto de electrodo puede incluir
- 60 una matriz de electrodos que tiene una pluralidad de electrodos en una disposición espacial, en el que el conjunto de electrodo recibe el impulso de energía a partir del componente de electroporación y suministra el mismo al tejido deseado a través de los electrodos. Al menos uno de la pluralidad de electrodos es neutro durante el suministro del impulso de energía y mide la impedancia en el tejido deseado y comunica la impedancia al componente de electroporación. El mecanismo de realimentación puede recibir la impedancia medida y puede ajustar el impulso de
- 65 energía suministrado por el componente de electroporación para mantener la corriente constante.

Una pluralidad de electrodos pueden suministrar el impulso de energía en un patrón descentralizado. La pluralidad de electrodos pueden suministrar el impulso de energía en el patrón descentralizado mediante el control de los electrodos en una secuencia programada, y la secuencia programada se introduce por un usuario en el componente de electroporación. La secuencia programada puede comprender una pluralidad de impulsos suministrados en secuencia, en la que cada impulso de la pluralidad de impulsos se suministra mediante al menos dos electrodos activos con un electrodo neutro que mide la impedancia, y en la que un impulso posterior de la pluralidad de impulsos se suministra por uno diferente de al menos dos electrodos activos con un electrodo neutro que mide la impedancia.

El mecanismo de realimentación puede realizarse o bien mediante hardware o bien mediante software. El mecanismo de realimentación puede realizarse mediante un circuito analógico en bucle cerrado. La realimentación se produce cada 50  $\mu$ s, 20  $\mu$ s, 10  $\mu$ s o 1  $\mu$ s, pero es preferiblemente una realimentación en tiempo real o instantánea (es decir, sustancialmente instantánea tal como se determina mediante técnicas disponibles para determinar el tiempo de respuesta). El electrodo neutro puede medir la impedancia en el tejido deseado y comunica la impedancia al mecanismo de realimentación, y el mecanismo de realimentación responde a la impedancia y ajusta el impulso de energía para mantener la corriente constante a un valor similar a la corriente previamente establecida. El mecanismo de realimentación puede mantener la corriente constante de manera continua e instantánea durante el suministro del impulso de energía.

Los ejemplos de dispositivos de electroporación y métodos de electroporación que pueden facilitar el suministro de los constructos de compuesto de tipo Affimer codificado de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones, incluyen los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 7.245.963; 6.302.874; 5.676.646; 6.241.701; 6.233.482; 6.216.034; 6.208.893; 6.192.270; 6.181.964; 6.150.148; 6.120.493; 6.096.020; 6.068.650; y 5.702.359. La electroporación puede llevarse a cabo mediante un dispositivo mínimamente invasivo.

En determinadas realizaciones, la electroporación se lleva a cabo mediante un dispositivo de electroporación mínimamente invasivo ("MID"). El dispositivo puede comprender a una aguja hueca, casete de ADN, y medios de administración de líquido, en el que el dispositivo está adaptado para accionar los medios de administración de líquido en uso para inyectar simultáneamente (por ejemplo, automáticamente) el constructo de ácido nucleico de tipo Affimer codificado en tejido corporal durante la inserción de la aguja en el tejido corporal. Esto tiene la ventaja de que la capacidad de inyectar el ADN y líquido asociado de manera gradual mientras está insertándose la aguja conduce a una distribución más uniforme del líquido a través del tejido corporal. El dolor experimentado durante la inyección puede reducirse debido a la distribución del ADN que está inyectándose a lo largo de una zona mayor.

El MID puede inyectar el constructo de ácido nucleico de tipo Affimer codificado en tejido sin el uso de una aguja. El MID puede inyectar el constructo de ácido nucleico de tipo Affimer codificado como una pequeña corriente o chorro con una fuerza tal que el ácido nucleico perfora la superficie del tejido y entra en el tejido y/o músculo subyacente. La fuerza detrás de la pequeña corriente o chorro puede proporcionarse mediante expansión de un gas comprimido, tal como dióxido de carbono a través de un micro-orificio dentro de una fracción de un segundo. Ejemplos de dispositivos de electroporación mínimamente invasivos, y métodos de uso de los mismos, se describen en la solicitud de patente estadounidense publicada n.º 20080234655; la patente estadounidense n.º 6.520.950; la patente estadounidense n.º 7.171.264; la patente estadounidense n.º 6.208.893; la patente estadounidense n.º 6.009.347; la patente estadounidense n.º 6.120.493; la patente estadounidense n.º 7.245.963; la patente estadounidense n.º 7.328.064; y la patente estadounidense n.º 6.763.264.

El MID puede comprender un inyector que crea un chorro de alta velocidad de líquido que perfora el tejido de manera indolora. Tales inyectores libres de aguja están comercialmente disponibles. Los ejemplos de inyectores libres de aguja que pueden usarse en el presente documento incluyen los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 3.805.783; 4.447.223; 5.505.697; y 4.342.310.

Un constructo de ácido nucleico de tipo Affimer codificado deseado en una forma adecuada para electrotransporte directo o indirecto puede introducirse (por ejemplo, inyectarse) usando un inyector libre de aguja en el tejido que va a tratarse, habitualmente poniendo en contacto la superficie de tejido con el inyector para accionar la administración de un chorro del agente, con fuerza suficiente como para provocar la penetración del ácido nucleico en el tejido. Por ejemplo, si el tejido que va a tratarse es una mucosa, piel o músculo, el agente se proyecta hacia la superficie de la mucosa o piel con fuerza suficiente como para provocar que el agente penetre a través del estrato córneo y al interior de las capas dérmicas, o al interior de tejido y músculo subyacente, respectivamente. Los inyectores libres de aguja son muy adecuados para administrar constructo de ácido nucleico de tipo Affimer codificado a todos los tipos de tejidos, incluyendo al interior de tumores (administración intratumoral).

El MID puede tener electrodos de aguja que someten el tejido a electroporación. Emitir impulsos entre múltiples pares de electrodos en una matriz de múltiples electrodos, por ejemplo configurada en patrones rectangulares o cuadrados, proporciona resultados mejorados con respecto a los de emitir impulsos entre un par de electrodos. Por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.702.359 titulada "Needle Electrodes for Mediated Delivery of Drugs and Genes" se divulga una matriz de agujas en la que pueden emitirse impulsos en una pluralidad de pares de agujas durante el tratamiento terapéutico. En la aplicación, se dispusieron agujas en una matriz circular, pero tienen

conectores y un aparato de conmutación que permite emitir impulsos entre pares opuestos de electrodos de aguja. Puede usarse un par de electrodos de aguja para suministrar el constructo de ácido nucleico de tipo Affimer codificado a células. Un dispositivo y sistema de este tipo se describe en la patente estadounidense n.º 6.763.264. Alternativamente, puede usarse un dispositivo de una única aguja que permite la inyección del ADN y la electroporación con una única aguja que se asemeja a una aguja de inyección normal y aplica impulsos de tensión inferior a los suministrados por los dispositivos actualmente usados, reduciendo por tanto la sensación eléctrica experimentada por el paciente.

El MID puede comprender una o más matrices de electrodos. Las matrices pueden comprender dos o más agujas del mismo diámetro o de diámetros diferentes. Las agujas pueden estar separadas de manera uniforme o no uniforme. Las agujas pueden tener entre 0,005 pulgadas y 0,03 pulgadas, entre 0,01 pulgadas y 0,025 pulgadas; o entre 0,015 pulgadas y 0,020 pulgadas. La aguja puede tener 0,0175 pulgadas de diámetro. Las agujas pueden estar separadas 0,5 mm, 1,0 mm, 1,5 mm, 2,0 mm, 2,5 mm, 3,0 mm, 3,5 mm, 4,0 mm, o más.

El MID puede consistir en un generador de impulsos y unos inyectores de vacuna de dos o más agujas que suministran el constructo de ácido nucleico de tipo Affimer codificado e impulsos de electroporación en una única etapa. El generador de impulsos puede permitir una programación flexible de parámetros de impulsos e inyección mediante un ordenador personal que se hace funcionar mediante tarjeta de memoria de tipo flash, así como registro y almacenamiento exhaustivos de datos de electroporación y de paciente. El generador de impulsos puede suministrar impulsos de una variedad de voltios durante breves periodos de tiempo. Por ejemplo, el generador de impulsos puede suministrar impulsos de 15 voltios de 100 ms de duración. Un ejemplo de un MID de este tipo es el sistema Elgen 1000 de Inovio Biomedical Corporation, que se describe en la patente estadounidense n.º 7.328.064.

El MID puede ser un dispositivo y sistema a CELLECTRA (Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, Pa.), que es un sistema de electrodos modular, que facilita la introducción de una macromolécula, tal como un constructo de ácido nucleico de tipo Affimer codificado, en células de un tejido seleccionado en un cuerpo. El sistema de electrodos modular puede comprender una pluralidad de electrodos de aguja; una aguja hipodérmica; un conector eléctrico que proporciona un enlace conductor desde un controlador de impulsos de corriente constante programable hasta la pluralidad de aguja electrodos; y una fuente de potencia. Un operario puede agarrar la pluralidad de electrodos de aguja que están montados en una estructura de soporte e insertarlos firmemente en el tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Después se suministra el ácido nucleico mediante la aguja hipodérmica en el tejido seleccionado. Se activa el controlador de impulsos de corriente constante programable y se aplica un impulso eléctrico de corriente constante a la pluralidad de electrodos de aguja. El impulso eléctrico de corriente constante aplicado facilita la introducción del ácido nucleico en la célula entre la pluralidad de electrodos. La muerte celular debida a sobrecalentamiento de células se minimiza limitando la disipación de potencia en el tejido gracias a los impulsos de corriente constante. El dispositivo y sistema Cellectra se describe en la patente estadounidense n.º 7.245.963.

El MID puede ser un sistema Elgen 1000 (Inovio Pharmaceuticals). El sistema Elgen 1000 puede comprender un dispositivo que proporciona una aguja hueca; y medios de administración de líquido, en el que el aparato está adaptado para accionar los medios de administración de líquido en uso para inyectar simultáneamente (por ejemplo, automáticamente) líquido, el constructo de ácido nucleico de tipo Affimer codificado descrito en el presente documento, en tejido corporal durante inserción de la aguja en dicho tejido corporal. La ventaja es la capacidad para inyectar el líquido de manera gradual mientras está insertándose la aguja que conduce a una distribución más uniforme del líquido a través del tejido corporal. También se cree que se reduce el dolor experimentado durante la inyección debido a la distribución del volumen de líquido que está inyectándose a lo largo de una zona mayor.

Además, la inyección automática de líquido facilita la monitorización y registro automáticos de una dosis real de líquido inyectado. Estos datos pueden almacenarse mediante una unidad de control con propósitos de documentación si se desea.

Se apreciará que la tasa de inyección puede ser o bien lineal o bien no lineal y que la inyección puede llevarse a cabo después de haberse insertado las agujas a través de la piel del sujeto que va a tratarse y mientras se insertan adicionalmente en el tejido corporal.

Los tejidos adecuados en los que puede inyectarse líquido mediante el aparato incluyen tejido tumoral, piel y otros tejidos epiteliales, tejido hepático y tejido muscular, simplemente como ejemplos.

El aparato comprende además medios de inserción de aguja para guiar la inserción de la aguja en el tejido corporal. La tasa de inyección de líquido se controla mediante la tasa de inserción de aguja. Esto tiene la ventaja de que tanto la inserción de aguja como la inyección de líquido pueden controlarse de tal manera que la tasa de inserción puede hacerse coincidir con la tasa de inyección según se desee. Además hace que el aparato sea más fácil de hacer funcionar por un usuario. Si se desea, pueden proporcionarse medios para insertar automáticamente la aguja en tejido corporal.

Un usuario puede elegir cuándo comenzar la inyección de líquido. Sin embargo, de manera ideal, la inyección se

comienza cuando la punta de la aguja ha alcanzado el tejido diana y el aparato puede incluir medios para detectar cuándo se ha insertado la aguja hasta una profundidad suficiente como para que comience la inyección del líquido. Esto significa que puede hacerse que la inyección de líquido comience de manera automática cuando la aguja ha alcanzado una profundidad deseada (que será normalmente la profundidad a la que comienza el tejido muscular). La profundidad a la que comienza el tejido muscular puede tomarse, por ejemplo, como una profundidad de inserción de aguja previamente establecida tal como un valor de 4 mm que se considerará suficiente para que la aguja atraviese la capa de piel.

Los medios de detección pueden comprender una sonda de ultrasonidos. Los medios de detección pueden comprender unos medios para detectar un cambio en la impedancia o resistencia. En este caso, los medios pueden no registrar en realidad la profundidad de la aguja en el tejido corporal sino más bien estar adaptados para detectar un cambio en la impedancia o resistencia a medida que la aguja se mueve desde un tipo diferente de tejido corporal al interior del músculo. Cualquiera de estas alternativas proporciona unos medios relativamente precisos y fáciles de hacer funcionar para detectar que puede comenzar la inyección. Adicionalmente puede registrarse la profundidad de inserción de la aguja si se desea y puede usarse para controlar la inyección de líquido de tal manera que el volumen de líquido que va a inyectarse se determina a medida que se registra la profundidad de inserción de aguja.

El aparato puede comprender además: una base para soportar la aguja; y un alojamiento para recibir la base en el mismo, en el que la base puede moverse con respecto al alojamiento de tal manera que la aguja se retrae dentro del alojamiento cuando la base está en una primera posición hacia atrás con respecto al alojamiento y la aguja se extiende fuera del alojamiento cuando la base está en una segunda posición hacia delante dentro del alojamiento. Esto resulta ventajoso para un usuario ya que el alojamiento puede alinearse sobre la piel de un paciente, y entonces pueden insertarse las agujas en la piel del paciente moviendo el alojamiento con respecto a la base.

Tal como se mencionó anteriormente, es deseable lograr una tasa controlada de inyección de líquido de tal manera que el líquido se distribuye de manera uniforme a lo largo de la longitud de la aguja a medida que se inserta en la piel. Los medios de administración de líquido pueden comprender medios de accionamiento de émbolo adaptados para inyectar líquido a una tasa controlada. Los medios de accionamiento de émbolo pueden activarse, por ejemplo, mediante un servomotor. Sin embargo, los medios de accionamiento de émbolo pueden accionarse al moverse la base en la dirección axial con respecto al alojamiento. Se apreciará que pueden proporcionarse medios alternativos para la administración de líquido. Por tanto, por ejemplo, puede proporcionarse un recipiente cerrado que puede apretarse para la administración de líquido a una tasa controlada o no controlada en lugar de un sistema de jeringa y émbolo.

El aparato descrito anteriormente puede usarse para cualquier tipo de inyección. Sin embargo, se prevé que sea particularmente útil en el campo de la electroporación y, por tanto, puede comprender además medios para aplicar una tensión a la aguja. Esto permite usar la aguja no sólo para inyección sino también como electrodo durante la electroporación. Esto es particularmente ventajoso ya que significa que el campo eléctrico se aplica en la misma zona que el líquido inyectado. Tradicionalmente ha habido un problema con la electroporación ya que es muy difícil alinear con precisión un electrodo con líquido previamente inyectado y, por tanto, los usuarios han tendido a inyectar un volumen de líquido mayor del requerido a lo largo de una zona mayor y aplicar un campo eléctrico a lo largo de una zona mayor para intentar garantizar un solapamiento entre la sustancia inyectada y el campo eléctrico. Usando la presente invención, puede reducirse tanto el volumen de líquido inyectado como el tamaño del campo eléctrico aplicado al tiempo que se logra un buen ajuste entre el campo eléctrico y el líquido.

La patente estadounidense n.º 7.245.963 de Draghia-Akli, *et al.* describe sistemas de electrodos modulares y su uso para facilitar la introducción de una biomolécula en células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Los sistemas de electrodos modulares pueden comprender una pluralidad de electrodos de aguja; una aguja hipodérmica; un conector eléctrico que proporciona un enlace conductor desde un controlador de impulsos de corriente constante programable hasta la pluralidad de electrodos de aguja; y una fuente de potencia. Un operario puede agarrar la pluralidad de electrodos de aguja que están montados en una estructura de soporte e insertarlos firmemente en el tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Después se administran las biomoléculas mediante la aguja hipodérmica en el tejido seleccionado. Se activa el controlador de impulsos de corriente constante programable y se aplica un impulso eléctrico de corriente constante a la pluralidad de electrodos de aguja. El impulso eléctrico de corriente constante aplicado facilita la introducción de la biomolécula en la célula entre la pluralidad de electrodos.

La publicación de patente estadounidense 2005/0052630 presentada por Smith, *et al.* describe un dispositivo de electroporación que puede usarse para facilitar eficazmente la introducción de una biomolécula en células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. El dispositivo de electroporación comprende un dispositivo electrocinético ("dispositivo EKD") cuyo funcionamiento se especifica mediante software o firmware. El dispositivo EKD produce una serie de patrones de impulsos de corriente constante programables entre electrodos en una matriz basándose en control y entrada de usuario de los parámetros de impulso, y permite el almacenamiento y la adquisición de datos de forma de onda de corriente. El dispositivo de electroporación también comprende un disco de electrodo sustituible que tiene una matriz de electrodos de aguja, un canal de inyección central para una aguja de inyección, y un disco de guía extraíble.

Las matrices de electrodos y métodos descritos en la patente estadounidense n.º 7.245.963 y la publicación de patente estadounidense 2005/0052630 pueden estar adaptados para una penetración profunda no sólo en tejidos tales como músculo, sino también en otros tejidos u órganos. Debido a la configuración de la matriz de electrodos, la

aguja de inyección (para administrar la biomolécula de elección) también se inserta completamente en el órgano diana, y la inyección se administra en perpendicular al tejido diana, en la zona que está previamente delineada por los electrodos. Los electrodos descritos en la patente estadounidense n.º 7.245.963 y la publicación de patente estadounidense 2005/005263 tienen preferiblemente 20 mm de longitud y son de calibre 21.

El uso de electroporación *in vivo* potencia la captación de ADN de plásmido en tejido tumoral, dando como resultado la expresión dentro del tumor, y suministra plásmidos a tejido muscular, dando como resultado la expresión sistémica de proteínas secretadas, tales como citocinas (véase, por ejemplo, el documento US8026223). Técnicas, vectores y dispositivos a modo de ejemplo adicionales para electroporación de transgenes de polipéptido de tipo Affimer en células *in vivo* incluyen las publicaciones PCT WO/2017/106795, WO/2016/161201, WO/2016/154473, WO/2016/112359 y WO/2014/066655.

Normalmente, los campos eléctricos necesarios para la electroporación de células *in vivo* son de magnitud generalmente similar a los campos requeridos para células *in vitro*. En una realización, la magnitud del campo eléctrico oscila desde aproximadamente 10 V/cm hasta aproximadamente 1500 V/cm, preferiblemente desde aproximadamente 300 V/cm hasta 1500 V/cm y preferiblemente desde aproximadamente 1000 V/cm hasta 1500 V/cm. Alternativamente, a intensidades de campo inferiores (desde aproximadamente 10 V/cm hasta 100 V/cm, y más preferiblemente desde aproximadamente 25 V/cm hasta 75 V/cm) la longitud de impulso es larga. Por ejemplo, cuando el campo eléctrico nominal es de aproximadamente 25-75 V/cm, si se prefiere que la longitud de impulso sea de aproximadamente 10 ms.

La longitud de impulso puede ser de aproximadamente 10 s a aproximadamente 100 ms. Puede haber cualquier número deseado de impulsos, normalmente de uno a 100 impulsos por segundo. El retardo entre conjuntos de impulsos puede ser cualquier tiempo deseado, tal como un segundo. La forma de onda, la intensidad de campo eléctrico y la duración de impulso también pueden depender del tipo de células y del tipo de moléculas que tienen que entrar en las células mediante electroporación.

También quedan abarcados dispositivos de electroporación que incorporan espectroscopía por impedancia electroquímica ("EIS"). Tales dispositivos proporcionan información en tiempo real sobre la eficiencia de electroporación antitumoral *in vivo*, en particular, permitiendo la optimización de condiciones. Pueden encontrarse ejemplos de dispositivos de electroporación que incorporan EIS, por ejemplo, en el documento WO2016/161201.

La captación de los constructos de ácido nucleico de tipo Affimer codificado de la presente invención tal como se definen en las reivindicaciones también puede potenciarse mediante electroporación de plasma, también denominada transfección en avalancha. En resumen, descargas de microsegundos crean microburbujas de cavitación en la superficie de electrodo. La fuerza mecánica creada por el derrumbamiento de las microburbujas en combinación con el campo magnético sirve para aumentar la eficiencia de transporte a través de la membrana celular en comparación con el transporte mediado por difusión asociado con la electroporación convencional. La técnica de electroporación de plasma se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 7.923.251 y 8.283.171. Esta técnica también puede emplearse *in vivo* para la transformación de células. Chaiberg, *et al* (2006) Investigative Ophthalmology & Visual Science 47:4083-4090; Chaiberg, *et al.*, patente estadounidense n.º 8.101.169 expedida el 24 de enero de 2012.

También se contemplan otras tecnologías de electroporación alternativas. También puede realizarse el suministro de ácido nucleico *in vivo* usando plasma frío. El plasma es uno de los cuatro estados fundamentales de la materia, siendo los otros sólido, líquido, y gas. El plasma es un medio eléctricamente neutro de partículas positivas y negativas no unidas (es decir, la carga global de un plasma es aproximadamente cero). Puede crearse un plasma calentando un gas o sometándolo a un fuerte campo electromagnético, aplicado con un láser o generador de microondas. Esto reduce o aumenta el número de electrones, creando partículas cargadas positivas o negativas denominadas iones (Luo, *et al.* (1998) Phys. Plasma 5:2868-2870) y va acompañado por la disociación de enlaces moleculares, si están presentes.

Se producen plasmas fríos (es decir, plasmas no térmicos) mediante el suministro de señales de alta tensión pulsadas a un electrodo adecuado. Los dispositivos de plasma frío pueden adoptar la forma de un dispositivo de chorro de gas o un dispositivo de descarga de barrera dieléctrica (DBD). Los plasmas de temperatura fría han atraído mucho entusiasmo e interés gracias a que proporcionan plasmas a temperaturas de gas relativamente bajas. Proporcionar plasmas a tal temperatura resulta interesante para una variedad de aplicaciones, incluyendo cicatrización de heridas, procesos antibacterianos, varias otras terapias médicas y esterilización. Tal como se indicó anteriormente, los plasmas chorro (es decir, plasmas no térmicos) se producen mediante el suministro de señales de alta tensión pulsadas a un electrodo adecuado. Los dispositivos de plasma frío pueden adoptar la forma de un dispositivo de chorro de gas, un dispositivo de descarga de barrera dieléctrica (DBD) o un suministro de potencia rico en armónicos de múltiples frecuencias.

Un dispositivo de descarga de barrera dieléctrica se basa en un procedimiento diferente para generar el plasma frío. Un dispositivo de descarga de barrera dieléctrica (DBD) contiene al menos un electrodo conductor cubierto por una capa dieléctrica. El trayecto de retorno eléctrico está formado por la masa que puede proporcionarse por el sustrato objetivo que se somete al tratamiento con plasma frío o proporcionando una masa incorporada para el electrodo. Pueden proporcionarse energía para el dispositivo de descarga de barrera dieléctrica mediante un suministro de potencia de alta tensión, tal como el mencionado anteriormente. Más generalmente, se introduce energía en el dispositivo de descarga de barrera dieléctrica en forma de tensión eléctrica de CC pulsada para formar la descarga de plasma. Gracias a la capa dieléctrica, la descarga se separa del electrodo conductor y se reduce el ataque del electrodo y el calentamiento de gas. Puede hacerse variar la amplitud y frecuencia de la tensión eléctrica de CC pulsada para lograr regímenes variables de funcionamiento.

Se ha empleado plasma frío para transfectar células con ácidos nucleicos foráneos. En particular, transfección de células tumorales (véase, por ejemplo, Connolly, *et al.* (2012) *Human Vaccines & Immune-therapeutics* 8: 1729-1733; y Connolly *et al* (2015) *Bioelectrochemistry* 103: 15-21).

En determinadas realizaciones ilustrativas, el constructo transgénico que codifica para el polipéptido de tipo Affimer de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones se suministra usando un dispositivo de electroporación que comprende: un aplicador; una pluralidad de electrodos que se extienden desde el aplicador, estando los electrodos asociados con una zona de recubrimiento; un suministro de potencia en comunicación eléctrica con los electrodos, estando el suministro de potencia configurado para generar una o más señales de electroporación para células dentro de la zona de recubrimiento; y un elemento de guía acoplado a los electrodos, en el que el elemento de guía está configurado para ajustar la zona de recubrimiento de los electrodos. Al menos una porción de los electrodos puede estar posicionada dentro del aplicador en una disposición cónica. La una o más señales de electroporación pueden estar asociadas, cada una, con un campo eléctrico. El dispositivo puede comprender además un potenciómetro acoplado al suministro de potencia y los electrodos. El potenciómetro puede estar configurado para mantener el campo eléctrico sustancialmente dentro de un intervalo predeterminado.

La una o más señales de electroporación pueden estar asociadas, cada una, con un campo eléctrico. El dispositivo puede comprender además un potenciómetro acoplado al suministro de potencia y los electrodos. El potenciómetro puede estar configurado para mantener el campo eléctrico dentro de un intervalo predeterminado para prevenir sustancialmente un daño permanente en las células dentro de la zona de recubrimiento y/o minimizar sustancialmente el dolor. Por ejemplo, el potenciómetro puede estar configurado para mantener el campo eléctrico a aproximadamente 1300 V/cm.

El suministro de potencia puede proporcionar una primera señal eléctrica a un primer electrodo y una segunda señal eléctrica a un segundo electrodo. La primera y segunda señales eléctricas pueden combinarse para producir una onda que tiene una frecuencia de latido. La primera y segunda señales eléctricas pueden tener, cada una, al menos una de una forma de onda unipolar y una forma de onda bipolar. La primera señal eléctrica puede tener una primera frecuencia y una primera amplitud. La segunda señal eléctrica puede tener una segunda frecuencia y una segunda amplitud. La primera frecuencia puede ser diferente de, o igual a, la segunda frecuencia. La primera amplitud puede ser diferente de, o igual a, la segunda amplitud.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene un tumor, comprendiendo el método: inyectar en el tumor una dosis eficaz de plásmido que codifica para un polipéptido de tipo Affimer; y administrar terapia de electroporación al tumor. En determinadas realizaciones, la terapia de electroporación comprende además la administración de al menos un impulso de tensión de aproximadamente 200 V/cm a aproximadamente 1500 V/cm a lo largo de una anchura de impulso aproximadamente 100 microsegundos a aproximadamente 20 milisegundos.

En determinadas realizaciones, el plásmido (o un segundo plásmido sometido a electroporación) codifica además para al menos una citocina inmunoestimulante, tal como seleccionado del grupo que codifica para IL-12, IL-15, y una combinación de IL-12 e IL-15.

Formulaciones que potencian la transfección

También pueden encapsularse constructos de ácido nucleico de tipo Affimer codificado en liposomas, preferiblemente liposomas catiónicos (Wong, T. K. *et al.*, *Gene*, 10:87(1980); Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190 (1982); y Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176 (1987)) o polymersomas (liposomas sintéticos) que pueden interaccionar con la membrana celular y fusionarse o experimentar endocitosis para producir la transferencia de ácido nucleico al interior de la célula. El ADN también puede formarse para dar complejos con polímeros (poliplejos) o con dendrímeros que pueden liberar directamente su carga en el citoplasma de una célula.

Los portadores ilustrativos útiles con respecto a esto incluyen micropartículas de poli(lactida-co-glicolida), poliacrilato, látex, almidón, celulosa, dextrano y similares. Otros portadores ilustrativos incluyen biovectores supramoleculares, que comprenden un núcleo hidrófilo no líquido (por ejemplo, un polisacárido u oligosacárido



reticulado) y, opcionalmente, una capa externa que comprende un compuesto anfifilo, tal como un fosfolípido (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.151.254 y las solicitudes PCT WO 94/20078, WO/94/23701 y WO 96/06638). La cantidad de agente activo contenido dentro de una formulación de liberación sostenida depende del sitio de implantación, la tasa y duración prevista de liberación y la naturaleza del estado que va a tratarse o prevenirse.

Pueden emplearse microesferas biodegradables (por ejemplo, polilactato-poliglicolato) como portadores para composiciones. Se divulgan microesferas biodegradables adecuadas, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 4.897.268; 5.075.109; 5.928.647; 5.811.128; 5.820.883; 5.853.763; 5.814.344, 5.407.609 y 5.942.252. Los sistemas de portador de proteína principal de hepatitis B modificada tal como se describen en el documento WO/99 40934, y referencias citadas en el mismo, también serán útiles para muchas aplicaciones. Otro sistema de portador/suministro ilustrativo emplea un portador que comprende complejos de material particulado-proteína, tales como los descritos en la patente estadounidense n.º 5.928.647, que pueden tener el beneficio añadido cuando se usan de manera intratumoral para suministrar la secuencia codificante para un compuesto de tipo Affimer.

Las nanopartículas poliméricas biodegradables facilitan la transferencia de ácido nucleico no viral a células. Se forman partículas pequeñas (aproximadamente 200 nm), positivamente cargadas (aproximadamente 10 mV), mediante el autoensamblaje de poli(beta-amino-ésteres) catiónicos, degradables mediante hidrólisis, y ADN de plásmido.

También pueden administrarse polinucleótidos a células mediante microinyección directa, permeabilizaciones celulares temporales (por ejemplo, administración conjunta de represor y/o activador con un agente de permeabilización celular), fusión a péptidos de translocación de membrana, y similares.

El suministro de ácido nucleico mediado por lípidos y la expresión de ácidos nucleicos foráneos, incluyendo ARNm, *in vitro* e *in vivo* ha sido muy satisfactorio. Las formulaciones no virales basadas en lípidos proporcionan una alternativa a terapias génicas virales. Los métodos de suministro de lípidos *in vivo* actuales usan inyección subcutánea, intradérmica, intratumoral, o intracraneal. Avances en las formulaciones de lípidos han mejorado la eficiencia de la transferencia génica *in vivo* (véase la solicitud PCT WO 98/07408). Por ejemplo, una formulación de lípidos compuesta por una razón equimolar de 1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetil-amonio)propano (DOTAP) y colesterol puede potenciar significativamente la transferencia génica *in vivo* sistémica. La formulación de lípidos de DOTAP:colesterol forma una estructura única denominada "liposoma de intercalación". Se notifica que esta formulación "intercala" ADN entre una bicapa invaginada o estructura de "jarrón". Las características beneficiosas de estas estructuras de lípidos incluyen un p positivo, estabilización coloidal mediante colesterol, empaquetamiento de ácido nucleico bidimensional y estabilidad en suero aumentada.

La tecnología de liposomas catiónicos se basa en la capacidad de lípidos anfipáticos, que presentan un grupo de cabeza positivamente cargado y una cola de lípido hidrófoba, para unirse a ADN o ARN negativamente cargado y formar partículas que entran generalmente en células mediante endocitosis. Algunos liposomas catiónicos también contienen un colípido neutro, que se piensa que potencia la captación de liposomas por células de mamífero. De manera similar, otros policationes, tales como poli-L-lisina y polietilen-imina, se complejan con ácidos nucleicos mediante interacción de carga y ayudan en la condensación de ADN o ARN para dar nanopartículas, que entonces son sustratos para la captación mediada por endosoma. Se han desarrollado varias de estas tecnologías de complejo de compuesto catiónico-ácido nucleico como posibles productos clínicos, incluyendo complejos con ADN de plásmido (ADNp), oligodesoxinucleótidos, y diversas formas de ARN sintético, y se usan como parte del sistema de suministro para los constructos de ácido nucleico de tipo Affimer codificado de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones.

Los constructos de ácido nucleico de tipo Affimer codificados divulgados en el presente documento pueden estar asociados con moléculas policationicas que sirven para potenciar la captación en células. Complejar el constructo de ácido nucleico con moléculas policationicas también ayuda a empaquetar el constructo de tal manera que se reduce su tamaño, lo cual se cree que ayuda con la captación celular. Una vez en el endosoma, el complejo se disocia debido al pH inferior, y las moléculas policationicas pueden perturbar la membrana del endosoma para facilitar el escape de ADN al interior del citoplasma antes de que pueda degradarse. Los datos preliminares muestran que las realizaciones de constructo de ácido nucleico tenían una captación potenciada al interior de SC con respecto a DC cuando se complejaba con las moléculas policationicas polilisina o polietilenimina.

Un ejemplo de moléculas policationicas útiles para complejarse con constructos de ácido nucleico incluye péptidos de penetración celular (CPP), ejemplos incluyen polilisina (descrita anteriormente), poliarginina y péptidos de Tat. Los péptidos de penetración celular (CPP) son péptidos pequeños que pueden unirse a ADN y, una vez liberados, penetran en membranas celulares para facilitar el escape del ADN desde el endosoma hasta el citoplasma. Otro ejemplo de un CPP se refiere a un péptido quimérico de 27 residuos, denominado MPG, que se mostró hace algún tiempo que se une a oligonucleótidos mc y bc de una manera estable, dando como resultado un complejo no covalente que protegía los ácidos nucleicos frente a la degradación mediante ADNasa y suministraba eficazmente oligonucleótidos a células *in vitro* (Mahapatro A, *et al.*, J Nanobiotechnol, 2011, 9:55). El complejo formaba partículas pequeñas de aproximadamente 150 nm a 1 um cuando se examinaron diferentes razones de péptido:ADN, y las

razones de 10:1 y 5:1 (150 nm y 1  $\mu$ m, respectivamente). Otro CPP se refiere a un tetrapéptido modificado [tetralisina que contiene grupos de guanidinocarbonilpirrol (GCP) (TL-GCP)], que se notificó que se une con alta afinidad a un ADN de plásmido de 6,2 kb dando como resultado un agregado cargado positivo de 700-900 nm (Li *et al.*, Agnew Chem Int Ed Engl 2015; 54(10):2941-4). También puede complejarse ARN mediante tales moléculas policatiónicas para su suministro *in vivo*.

Otros ejemplos de moléculas policatiónicas que pueden complejarse con los constructos de ácido nucleico descritos en el presente documento incluyen polímeros policatiónicos comercialmente disponibles tales como JETPRIME® e In vivo JET (Polypus-transfección, S.A., Illkirch, Francia).

En determinadas realizaciones, la presente invención es útil en un método de suministrar un ARNm (u otro polinucleótido) que codifica para un polipéptido de tipo Affimer a células de un paciente mediante administración de una composición de nanopartículas que comprende (i) un componente de lípido que comprende un compuesto de fórmula (I), un fosfolípido, un lípido estructural, y un PEG-lípido; y (ii) un ARNm (u otro polinucleótido), comprendiendo dicha administración poner en contacto dicha célula de mamífero con dicha composición de nanopartículas, mediante lo cual se suministra dicho ARNm (u otro polinucleótido) a dicha célula.

En realizaciones a modo de ejemplo, el PEG-lípido se selecciona del grupo que consiste en una fosfatidiletanolamina modificada con PEG, un ácido fosfatídico modificado con PEG, una ceramida modificada con PEG, una dialquilamina modificada con PEG, un diacilglicerol modificado con PEG y un dialquilglicerol modificado con PEG. En realizaciones a modo de ejemplo, el lípido estructural se selecciona del grupo que consiste en colesterol, fecosterol, sitosterol, ergosterol, campesterol, estigmasterol, brasicasterol, tomatidina, ácido ursólico, y alfa-tocoferol. En determinadas realizaciones preferidas, el lípido estructural es colesterol.

En realizaciones a modo de ejemplo, el fosfolípido incluye un resto seleccionado del grupo que consiste en fosfatidilcolina, fosfatidil-etanolamina, fosfatidil-glicerol, fosfatidil-serina, ácido fosfatídico, 2-lisofosfatidilcolina, y una esfingomielina. En determinadas realizaciones, el fosfolípido incluye uno o más restos de ácido graso seleccionados del grupo que consiste en ácido láurico, ácido mirístico, ácido miristoleico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido alfa-linolénico, ácido erúxico, ácido araquídico, ácido araquidónico, ácido fitanoico, ácido eicosapentaenoico, ácido behénico, ácido docosapentaenoico, y ácido docosahexaenoico. En determinadas realizaciones preferidas, el fosfolípido se selecciona del grupo que consiste en 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diesteroil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-diundecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DUPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-di-O-octadecenil-sn-glicero-3-fosfocolina (18:0 diéter PC), 1-oleoil-2-colesterilhemisuccinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (OChemPC), 1-hexadecil-sn-glicero-3-fosfocolina (C16 liso PC), 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-didocosahexaenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (ME 16,0 PE), 1,2-diesteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-didocosahexaenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de sodio de 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) (DOPG), y esfingomielina. En determinadas realizaciones preferidas, el fosfolípido es DOPE o DSPC.

Como ilustración adicional, el fosfolípido puede ser DOPE y dicho componente puede comprender de aproximadamente el 35 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles dicho compuesto, de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 20 % en moles DOPE, de aproximadamente el 38,5 % en moles a aproximadamente el 48,5 % en moles de lípido estructural, y aproximadamente el 1,5 % en moles de PEG-lípido. El componente de lípido puede tener aproximadamente el 40 % en moles de dicho compuesto, aproximadamente el 15 % en moles de fosfolípido, aproximadamente el 43,5 % en moles de lípido estructural, y aproximadamente el 1,5 % en moles de PEG-lípido.

En determinadas realizaciones, la razón p/p de componente de lípido con respecto a ARNm que codifica para polipéptido de tipo Affimer (u otro polinucleótido) es de desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 50:1 y más preferiblemente de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 40:1.

En determinadas realizaciones, el tamaño medio de dicha composición de nanopartículas es de desde aproximadamente 50 nm hasta aproximadamente 150 nm, e incluso más preferiblemente es de desde aproximadamente 80 nm hasta aproximadamente 120 nm.

En determinadas realizaciones, el índice de polidispersidad de dicha composición de nanopartículas es de desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 0,18, más preferiblemente desde aproximadamente 0,13 hasta aproximadamente 0,17.

En determinadas realizaciones, la composición de nanopartículas tiene un potencial zeta de aproximadamente -10 a aproximadamente +20 mV.

En determinadas realizaciones, la composición de nanopartículas comprende además un lípido catiónico y/o ionizable seleccionado del grupo que consiste en 3-(didodecilamino)-N1,N1,4-tridodecil-1-piperazintanamina (KL10), 14,25-ditridecil-15,18,21,24-tetraaza-octatriacontano (KL25), 1,2-dilinoileloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLin-DMA), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), 4-(dimetilamino)butanoato de heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo (DLin-MC3-DMA), 2,2-dilinoileil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-KC2-DMA), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DODMA), y (2R)-2-[(8-[(3P)-colest-5-en-3-ilo]octil)oxi]-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-ilo]propan-1-amina (octil-CLinDMA (2R)).

Ahora se describe a modo de ejemplo la invención tal como se define en las reivindicaciones. Estos ejemplos son ilustrativos y no se pretende que se interprete que limitan la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones.

Algunos datos en estos ejemplos se han producido con andamiajes que tienen una etiqueta de G6H C-terminal (es decir GHHHHHHH (SEQ ID NO: 104) como adición al extremo C-terminal del polipéptido). Esto es convencional en la técnica por facilidad de manipulación/detección para llevar a cabo los experimentos mostrados, por ejemplo usando vectores de clonación electra vector system® comerciales convencionales de ATUM, Newark, California, EE. UU. Son especialmente adecuados los plásmidos pMOTHER y pDAUGHTER, o vectores derivados de los mismos. Evidentemente, un operario experto puede usar fácilmente un sistema de clonación en paralelo basado en los mismos principios, o un sistema diferente basado en elecciones de operario.

#### V. Composiciones farmacéuticas

La presente invención es útil en composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de tipo Affimer descrito en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas encuentran uso en inmunoterapia. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas encuentran uso en inmunooncología. En algunas realizaciones, las composiciones encuentran uso en la inhibición del crecimiento tumoral. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas encuentran uso en la inhibición del crecimiento tumoral en un sujeto (por ejemplo, un paciente humano). En algunas realizaciones, las composiciones encuentran uso en el tratamiento de cáncer. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas encuentran uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto (por ejemplo, un paciente humano).

Las formulaciones se preparan para su almacenamiento y uso combinando un polipéptido de tipo Affimer purificado de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un portador o excipiente). Los expertos en la técnica consideran generalmente que los portadores, excipientes, y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables son componentes inactivos de una formulación o composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, un polipéptido de tipo Affimer descrito en el presente documento se liofiliza y/o se almacena en una forma liofilizada. En algunas realizaciones, se liofiliza una formulación que comprende un polipéptido de tipo Affimer descrito en el presente documento.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, tampones no tóxicos tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro de sodio; 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, alquilparabenos, tales como metil o propil-parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol; polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácido); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; hidratos de carbono tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones de formación de sales tales como sodio; complejos de metales tales como complejos de Zn-proteína; y tensioactivos no iónicos tales como TWEEN o polietilenglicol (PEG). (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22ª edición, 2012, Pharmaceutical Press, Londres).

Las composiciones farmacéuticas útiles en la presente invención pueden administrarse de cualquiera de varias maneras para tratamiento o bien local o bien sistémico. La administración puede ser tópica mediante parches epidérmicos o transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos; pulmonar mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador, intratraqueal, e intranasal; oral; o parenteral incluyendo intravenosa, intraarterial, intratumoral, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular (por ejemplo, inyección o infusión), o intracraneal (por ejemplo, intratecal o intraventricular).

La formulación terapéutica puede estar en forma de dosificación unitaria. Tales formulaciones incluyen comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, gránulos, disoluciones o suspensiones en agua o medios no acuosos, o supositorios. En composiciones sólidas tales como comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un portador farmacéutico. Los componentes de formación de comprimidos convencionales incluyen almidón de maíz, lactosa, sacarosa,

sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio o gomas, y diluyentes (por ejemplo, agua). Pueden usarse para formar una composición de formulación previa sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones, o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica del mismo. Después se subdivide la composición de formulación previa sólida en formas de dosificación unitarias de un tipo descrito anteriormente. Los comprimidos, pastillas, etc., de la formulación o composición pueden recubrirse o combinarse de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que proporciona la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o pastilla puede comprender una composición interna recubierta por un componente externo. Además, los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir a la disgregación y permite que el componente interno pase intacto a través del estómago o para retrasar su liberación. Puede usarse una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, tales materiales incluyen varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Los polipéptidos de tipo Affimer descritos en el presente documento también pueden atraparse en microcápsulas. Tales microcápsulas se preparan, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones tal como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22ª edición, 2012, Pharmaceutical Press, Londres.

En determinadas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas incluyen un polipéptido de tipo Affimer de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones complejo con liposomas. Los expertos en la técnica conocen métodos para producir liposomas. Por ejemplo, algunos liposomas pueden generarse mediante evaporación en fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Pueden extraerse liposomas a través de filtros de tamaño de poro definido para proporcionar liposomas con el diámetro deseado.

En determinadas realizaciones, pueden producirse preparaciones de liberación sostenida que comprenden polipéptidos de tipo Affimer descrito en el presente documento. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen un polipéptido de tipo Affimer, en las que las matrices están en forma de artículos conformados (por ejemplo, películas o microcápsulas). Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles tales como poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico), polilactidas, copolímeros de L-ácido glutámico y 7-etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT.TM. (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), acetato-isobutirato de sacarosa, y poli(D-(-)-ácido 3-hidroxibutírico).

### Ejemplos

Ejemplo 1: pueden combinarse mutaciones independientemente para modular la estabilidad

Se realizaron las siguientes mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1:

Mutaciones	Estabilidad (cambio en la Tf en comparación con SEQ ID NO: 1)
hSteA Y35W T51L N32G	+9,9 °C
hSteA Y35W Q42E M65I	+10,8 °C
hSteA Y35W Q42E M65I E29K K30E E33K	+14,8 °C
hSteA Y35W <sup>59</sup> AG-NK N32G	+8,6 °C
hSteA Y35W N32G M65I	+11,8 °C

Todas estas también aumentaron la Tf de hSteA Y35W.

Esto muestra que el orden de mutación no tiene importancia. Dicho de otro modo, esto demuestra que las mutaciones enseñadas en el presente documento para modular la estabilidad (por ejemplo Tf) pueden realizarse independientemente o combinarse independientemente.

Una ventaja de la invención es que las mutaciones particulares enseñadas en el presente documento para modular la estabilidad no dependen unas de otras para lograr sus efectos individuales.

Ejemplo 2: inserciones de péptido heterólogo

péptido heterólogo de prueba GGSGGSGGS insertado en L2 y L4

3 posiciones diferentes para cada bucle (9 combinaciones)

Estabilidad térmica medida en Optim 2

3r2 medido en ausencia de agente desnaturizante pero las estabildades estuvieron por encima del intervalo

3r2 medido de nuevo en presencia de GuHCl 1 M para llevar la Tf dentro del intervalo

3t4 medido en presencia de SYPRO Orange dado que no hay fluorescencia de triptófano intrínseca en este polipéptido

En resumen, a continuación se muestran diversas opciones ilustradas:

SQT (SEQ ID NO: 24 del documento WO 2009/136182)

```
MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYNTQVL[A][ST]NY
IKVRAGDNKYMHLKVENG[P][PGQN][ADR]VLTGYQVDKNKDDLTGF
```

3r2 (SEQ ID NO: 19)

```
MIPGGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEKETGKTWGLEAVEYKTQVD[A][G][L]NY
IKVRVN--GKYIHLKVEFS[L][PGQN][EDL]VLTGYQVDKNKDDLTGF
```

3t4 (SEQ ID NO: 23)

```
MIPGGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTGGETYGKLEAVEYKTQVD[A][G][T]NY
IKVRAGDNKYIHLKVEFS[L][PGQN][EDL]VLTGYQVDKNKDDLTGF
```

3r2 (SEQ ID NO: 19)/t4 (SEQ ID NO: 23)

...QVD[A]GGSGGSGGS[L]NYY...FKS[L]GGSGGSGGS[EDL]VLT... 0

3r2 (SEQ ID NO: 19)/t4 (SEQ ID NO: 23)

...QVD[GGSGGSGGS]GL]NYY...FKS[GGSGGSGGS]NEDL]VLT... -1

3r2 (SEQ ID NO: 19)/t4 (SEQ ID NO: 23)

...QVD[AG]GGSGGSGGS]]NYY...FKS[LP]GGSGGSGGS[DL]VLT... +1

Los resultados se muestran en la figura 1.

Esto demuestra que ventajosamente insertar péptidos heterólogos en los bucles de 3r2 no afecta de manera adversa a la estabilidad.

Para L2 Tf, 48-L2-50 > 49-L2-51 > 50-L2-52.

Para L4 Tf, 73-L4-78 es habitualmente lo más estable, excepto en combinación con 50-L2-52 en la que es con diferencia lo menos estable.

La combinación más estable es 48-L2-50 con 73-L4-78.

3t4 no proporcionó buenos datos, ni siquiera en presencia de SYPRO, excepto por una variante que fue claramente mucho menos estable que el resto. Esta es la misma combinación que para 3r2.

Por tanto, de la manera más adecuada las inserciones/bucles tanto para 3r2 como para 3t4 deben ser las siguientes:

L2 insertado entre los residuos D48 y G50, delecionando el residuo A49

L4 insertado entre los residuos L73 y E78, delecionando los residuos P74, G75, Q76 y N77 (usando la numeración de hSteA)

Ejemplo 3: proteínas de andamiaje a modo de ejemplo

Se demuestran proteínas de andamiaje a modo de ejemplo.

En este experimento, Tf se mide mediante DSC (r/t) y Optim 2 (3r).

Andamiajes a modo de ejemplo para aplicaciones de investigación:

3r1- hSteA Y35W N32G V48D M65I Q42E T51L (A59V ΔD61) (E29K K30E E33K) (SEQ ID NO: 18)

5 3r2 - hSteA Y35W N32G V48D M65I Q42E T51L (A59V G60N ΔD61 N62G) (E29K K30E E33K) (SEQ ID NO: 19)

Andamiajes a modo de ejemplo para aplicaciones terapéuticas:

SEQ ID NO: 20 3t1 - hSteA N32G V48D

SEQ ID NO: 21 3t2 - hSteA N32G V48D M65I

SEQ ID NO: 22 3t3 - hSteA N32G V48D M65I T51L

SEQ ID NO: 23 3t4 - hSteA N32G V48D M65I Q42E

SEQ ID NO: 24 3t5 - hSteA N32G V48D M65I Q42E T51L

10 La figura 2 muestra datos para la Tf como medida de la estabilidad térmica.

La figura 3 muestra la Tf medida a diferentes valores de pH.

La figura 4 muestra espectros de CD.

15 Se generaron datos de DSC para andamiajes a modo de ejemplo tal como anteriormente y se observaron los siguientes valores de Tf:

3t1 = 85.6 °C

20 3t2 = 89.2 °C

3t3 = 91.6 °C

25 3t4 = 92.4 °C

3t5 = 94.7 °C

Por tanto, se demostró que las proteínas de andamiaje a modo de ejemplo muestran una estabilidad mejorada.

30 Ejemplo 4: integridad estructural de proteínas de andamiaje

35 Las proteínas de andamiaje de la invención mantienen ventajosamente su integridad estructural cuando se completan con inserciones de péptido diana. Para demostrar esto, se midieron los espectros de CD de UV cercano y lejano para los andamiajes 3r2 y 3t4 con inserciones de péptido heterólogo. En este ejemplo, las inserciones de péptido heterólogo son inserciones de 9 meros que tienen la secuencia (GGG)<sub>3</sub> es decir GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 92).

40 Los espectros de CD de UV cercano informan sobre el entorno de las cadenas laterales aromáticas. Los picos, positivos o negativos, en un espectro de CD de UV cercano indican que el entorno alrededor de los residuos aromáticos está fijo. Esto se interpreta como que una proteína tiene una estructura terciaria fija. Añadir el péptido heterólogo (GGG)<sub>3</sub> a los bucles 2 y 4 da como resultado espectros de CD de UV cercano con la misma forma que los andamiajes "vacíos", pero con diferentes magnitudes, indicando que la adición de péptidos heterólogos no ha perturbado la estructura terciaria de las proteínas de andamiaje.

45 Los espectros de CD de UV lejano informan sobre la estructura secundaria bruta. La hélice alfa, la cadena beta y la espiral aleatoria tienen todas ellas espectros de CD de UV lejano claramente diferentes. Añadir el péptido heterólogo (GGG)<sub>3</sub> a los bucles 2 y 4 da como resultado espectros de CD de UV lejano con la misma forma que los andamiajes "vacíos", pero con diferentes magnitudes, indicando que la adición de péptidos heterólogos no ha perturbado la estructura secundaria bruta de las proteínas de andamiaje.

50 Haciendo referencia a la figura 5, los espectros de CD de UV lejano de 3r2 (línea continua) y 3r2(GGG)<sub>3</sub> (línea discontinua) muestran la elipticidad de residuo media ([θ]<sub>MRE</sub>). 3r2 es un andamiaje "vacío", cuyos bucles no contienen péptidos heterólogos. 3r2(GGG)<sub>3</sub> contiene la secuencia de péptido heterólogo GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 92) en el lugar de A49 (bucle 2) (es decir 48-<péptido heterólogo>-50) y en el lugar de P74-G75-Q76-N77 (bucle 4) (es decir 73-<péptido heterólogo>-78).

Haciendo referencia a la figura 6: los espectros de CD de UV lejano de 3t4 (línea continua) y 3t4(GGG)<sub>3</sub> (línea

discontinua) muestran la elipticidad de residuo media ( $[\theta]_{MRE}$ ). 3t4 es un andamiaje "vacío", cuyos bucles no contienen péptidos heterólogos. 3t4(GGS)<sub>3</sub> contiene la secuencia de péptido heterólogo GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 92) en el lugar de A49 (bucle 2) y en el lugar de P74-G75-Q76-N77 (bucle 4).

5 Haciendo referencia a la figura 7: los espectros de CD de UV cercano de 3r2 (línea continua) y 3r2(GGS)<sub>3</sub> (línea discontinua) muestran la elipticidad molar ( $[\theta]$ ). 3r2 es un andamiaje "vacío", cuyos bucles no contienen péptidos heterólogos. 3r2(GGS)<sub>3</sub> contiene la secuencia de péptido heterólogo GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 92) en el lugar de A49 (bucle 2) y en el lugar de P74-G75-Q76-N77 (bucle 4).

10 Haciendo referencia a la figura 8: los espectros de CD de UV cercano de 3t4 (línea continua) y 3t4(GGS)<sub>3</sub> (línea discontinua) muestran la elipticidad molar ( $[\theta]$ ). 3t4 es un andamiaje "vacío", cuyos bucles no contienen péptidos heterólogos. 3t4(GGS)<sub>3</sub> contiene la secuencia de péptido heterólogo GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 92) en el lugar de A49 (bucle 2) y en el lugar de P74-G75-Q76-N77 (bucle 4).

15 Por tanto, puede observarse que, a lo largo de las longitudes de onda medidas, la forma de los espectros para los andamiajes que portan inserciones de péptido heterólogo no son esencialmente diferentes de los andamiajes sin inserciones. Esto muestra que la estructura se ha mantenido con inserciones de péptido heterólogo. Esto se muestra para diferentes andamiajes a modo de ejemplo de la invención.

#### 20 Ejemplo 5: inmunogenicidad

Se modelizó la inmunogenicidad de polipéptidos según la presente invención.

25 % de rango es el % de rango de la afinidad predicha en comparación con un conjunto de 200000 péptidos humanos naturales aleatorios, por ejemplo un valor del 1 % significa que se predice que el péptido de 15 meros se une fuertemente a los primeros 1 % de los 200000 péptidos aleatorios. Cualquier rango por debajo del 10 % (es decir el 10 %-100 %) no se considera inmunogénico. Estos cálculos se llevaron a cabo usando el servidor NetMHCIIpan (v3.1). Se sometieron a prueba cuarenta y un alelos de MHC en total para cada secuencia. Esta representación gráfica muestra el resultado para un alelo (el alelo DRB1 1502) como ejemplo representativo.

30 Haciendo referencia a la figura 9, puede concluirse que las mutaciones enseñadas en el presente documento sólo producen pequeños movimientos hacia arriba o hacia abajo en la inmunogenicidad. Las representaciones gráficas son ampliamente similares a hSteA. No se ha introducido ninguna región inmunogénica. No se ha introducido ningún cambio/desviación con respecto al tipo natural.

#### 35 Ejemplo 6: estabilidad en suero

Se sometió a prueba la estabilidad, tal como la estabilidad en suero.

40 Se incubó cada proteína en suero humano (Sigma) a 37 °C durante hasta 16 días. Se extrajeron muestras en los días 0, 1, 2, 4, 8 y 16 y se mantuvieron congeladas hasta la medición. Se analizaron todas las muestras usando el sistema Wes simple Western (Protein Simple) para detectar la presencia de monómero y cualquier otra especie presente. La detección se realizó mediante un anticuerpo monoclonal anti-(His6). A lo largo del transcurso de este experimento, SQT mostró una reducción constante en el área del pico de monómero (figura 10a), mientras que otras proteínas permanecieron constantes. La reducción de la cantidad de monómero de SQT coincidió con un aumento de dímero de SQT (figura 10b). Esto se esperaba ya que SQT tiene V48L y, por tanto, todavía es capaz de dimerizarse.

50 No hubo ninguna evidencia de que apareciera ningún material a pesos moleculares inferiores, por ejemplo a partir de digestión con proteasa.

Se observan los mismos resultados en tampón (en lugar de suero).

55 Por tanto, se demuestra que los polipéptidos según la presente invención son estables y no se degradan significativamente en suero humano a lo largo del transcurso de tiempo mostrado, o de hecho en tampón de almacenamiento convencional.

#### Ejemplo 7: neutralidad biológica (unión a papaína)

60 La estefina A humana es un inhibidor de la cisteína proteasa papaína. Se sometieron a prueba la estefina A humana, SQT y variantes de hSteA denominadas 3r2 y 3t4 en un ensayo de actividad de papaína. También se sometieron a prueba 3r2 y 3t4 con péptidos heterólogos (GGSGGSGGS) (SEQ ID NO: 92) insertados entre los residuos 48-50 y 73-78 (numeración de residuos de hSteA). Se incubó papaína activada con una serie de dilución de cada variante antes de añadir sustrato (N-carbobencilo-Phe-Arg-7-amido-4-metilcumarina). Se midió la fluorescencia de cada reacción (excitación a 380 nm, emisión a 460 nm) durante 5 minutos tras la emisión de sustrato. En la figura 11 se presentan los datos. Aunque hSteA es un potente inhibidor de la papaína, ninguna de las variantes sometidas a

prueba mostró una inhibición significativa de la papaína para las concentraciones sometidas a prueba. Esto demuestra que se ha logrado una neutralidad biológica en proteínas de andamiaje a modo de ejemplo de la invención.

5 Ejemplo 8: construcción de biblioteca a modo de ejemplo

1. Preparación de vector

a. Digesto de SapI

- Mezcla de reacción:

60 µl de SapI (10 U/µl)

7,5 µl de MfeI-HF (20 U/µl)

150 µg de vector (contiene un gen truncado III; la biblioteca será andamiaje-ligador-gen III)

150 µl de tampón CutSmart (10x)

añadir H<sub>2</sub>O hasta 1500 µl

- Incubar a 37 °C durante 1 h (alícuotas de 500 µl).
- Comprobar la digestión satisfactoria sobre gel de agarosa.

b. Extracción con fenol/cloroformo

- Añadir un volumen de fenol/cloroformo (Sigma; 77617) a un volumen de la muestra (los volúmenes más grandes son más fáciles de manipular; 500 µl resultan ideales) en un tubo de 1,5 ml, asegurarse de que el tubo está completamente cerrado y mezclar exhaustivamente mediante inversión.

- Centrifugar la muestra a 13.000 x g durante 5 min (a temperatura ambiente).

- Transferir cuidadosamente la fase superior a un tubo nuevo (inicialmente 400 µl, después el resto).

- Añadir un volumen de cloroformo (Sigma; C0549) a la muestra, asegurarse de que el tubo está completamente cerrado y mezclar exhaustivamente mediante inversión.

- Centrifugar la muestra a 13.000 x g durante 5 min (a temperatura ambiente).

- Transferir cuidadosamente la fase superior a un tubo nuevo de 2 ml (inicialmente 400 µl, después el resto).

- Ahora se extrae el ADN.

c. Precipitación con etanol

- Añadir 0,1x volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5,2; ThermoFisher; R1181), 1 µl de glicógeno (Roche; 10901393001) y 2,5x volúmenes de etanol absoluto previamente enfriado (-20 °C) a la muestra extraída con fenol/cloroformo; mezclar exhaustivamente mediante inversión.

- Incubar las muestras a -80 °C durante al menos 2 h (es mejor durante la noche).

- Centrifugar el ADN precipitado en una centrifuga previamente enfriada a 16.000 × g / 4 °C durante 15 min.

- Retirar el sobrenadante mediante pipeta y lavar el sedimento añadiendo 400 µl de etanol al 70 % (v/v) previamente enfriado frente al sedimento.

- Centrifugar de nuevo a 16.000 × g / 4 °C durante 5 min.

- Retirar tanto etanol como sea posible cuidadosamente mediante pipeta.

- Dejar los tubos abiertos para que los sedimentos se sequen a temperatura ambiente.

- Volver a suspender el ADN en agua de calidad molecular (normalmente 100 µl).



d. Purificación con columnas Chromaspin TE-1000

- 5
  - Purificación adicional de ADN de vector digerido mediante columnas Chromaspin TE-1000 con el fin de retirar fragmentos de digestión de menos de 300 pb. El ADN de vector purificado estará en el flujo pasante. Esto no es una etapa de concentración. Pueden aplicarse 70-100 µl de ADN con una concentración máxima de 1 mg/ml.
  - Mezclar la suspensión espesa de las columnas mediante inversión (Takara Clontech; 636079).
- 10
  - Desprender el extremo de la columna y colocarlo en un tubo de recogida.
  - Retirar la tapa de la columna y colocarla junto con el tubo de recogida en un tubo Falcon de 15 ml.
- 15
  - Centrifugar a  $700 \times g$  / 4 °C durante 5 min.
  - Transferir la columna a un nuevo tubo de recogida y de nuevo a un tubo Falcon de 15 ml.
  - Aplicar la muestra cuidadosamente mediante pipeta sobre la suspensión espesa.
- 20
  - Centrifugar a  $700 \times g$  / 4 °C durante 5 min.
  - El ADN de vector purificado está ahora en el flujo pasante y puede transferirse a un tubo de 1,5 ml para su almacenamiento a -20 °C.

25 2. Preparación de inserto

a. Digesto de SapI

- 30
  - Mezcla de reacción:
    - 15 µg de ADN de biblioteca (biotinilado)
    - 75 µl de tampón CutSmart (10x)
    - 35 30 µl de SapI (10 U/µl)
    - añadir H<sub>2</sub>O hasta 750 µl
  - Dividir en 3x alícuotas de 250 µl.
  - Incubar a 37 °C durante 1 h (Eppendorf Thermomixer) y posteriormente inactivar mediante calor a 65 °C/20 min (bloqueo térmico).

45 b. Purificación de perlas I (perlas de estreptavidina)

- Preparar tampón de lavado (2x):
    - Tris-HCl 10 mM (pH 7,5)
    - 50 EDTA 1 mM
    - NaCl 2 M
  - Mezclar 50 µl de perlas de estreptavidina M280 (LifeTechnologies 11205D) con 1 ml de tampón de lavado (1x). Mezclar mediante vórtex durante  $\geq 5$  s.
  - Inmovilizar las perlas sobre un soporte magnético durante 1 min.
  - Retirar el sobrenadante y añadir de nuevo 1 ml de tampón de lavado (1x).
  - 60
    - Inmovilizar las perlas sobre un soporte magnético durante 1 min.
    - Retirar el sobrenadante y volver a suspender las perlas en 250 µl de tampón de lavado (2x).
  - 65
    - Añadir 250 µl de digesto a las perlas lavadas e incubar en una mezcladora de rodillos a temperatura ambiente

durante 15 min.

- Inmovilizar las perlas sobre un soporte magnético durante 2-3 min.

- 5     • Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo (contiene inserto de biblioteca digerido).

c. Purificación de perlas II (perlas AMPure)

- 10     • Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo (contiene inserto de biblioteca digerido).

- Añadir 600 µl de perlas AMPure a 250 µl de inserto digerido y purificado con estreptavidina. Incubar sobre una mezcladora de rodillos durante 10 min.

- 15     • Inmovilizar las perlas sobre un imán durante 2-3 min. Descartar el sobrenadante.

- Lavar las perlas con 1,1 ml de etanol al 70 % (v/v).

- Inmovilizar las perlas sobre un imán durante 2-3 min. Descartar el sobrenadante.

- 20     • Lavar de nuevo las perlas con 1,1 ml de etanol al 70 % (v/v).

- Inmovilizar las perlas sobre un imán durante 2-3 min. Descartar el sobrenadante.

- Secar al aire las perlas durante 10 min.

- 25     • Volver a suspender perlas en 50 µl de agua durante 2 min.

- Inmovilizar las perlas sobre un imán durante 2-3 min y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.

- 30     • Volver a suspender de nuevo las perlas en 50 µl de agua durante 2 min.

- Inmovilizar las perlas sobre un imán durante 2-3 min y transferir el sobrenadante al mismo tubo que el anterior.

- Comprobar la digestión y purificación satisfactorias sobre un gel de agarosa analítico.

35     3. Ligaciones de prueba y QC inicial

a. Ligaciones

40     Pruebas de diferentes razones de vector:inserto

- Mezcla de ligación (incluyen control negativo sin inserto):

100 ng de vector digerido

45     X ng de inserto de biblioteca digerido (X varía con la razón de ligación)

0,5 µl de ADN ligasa T4 (2000 U/µl)

50     2 µl de tampón de ADN ligasa T4 (10x)

Añadir H<sub>2</sub>O hasta 20 µl

- Incubar la mezcla de ligación a temperatura ambiente durante 30 min. Inactivar la ligasa a 65 °C durante 10 min.

55     b. Electroporaciones

- Colocar cubetas de electroporación (2 mm) en sus bolsas, tubos Eppendorf de 1,5 ml y agua estéril sobre hielo para enfriarlos previamente.

- 60     • Colocar alícuotas de células TG1 electrocompetentes sobre hielo para descongelar.

- Añadir 60 µl de agua estéril helada a 60 µl de células TG1.

- 65     • Añadir alícuotas de 2 µl de mezcla de ligación a tubos de 1,5 ml previamente enfriados.

- Añadir 25 µl de células TG1 diluidas a cada tubo y mezclar mediante movimientos rápidos.
- 5 • Transferir la mezcla de células/ADN a una cubeta previamente enfriada, colocar la cubeta en el electroporador y aplicar impulsos a las células (25 µF/200 ohm/2500 V).
- Añadir inmediatamente 975 µl de medio de recuperación, aspirar y expulsar con pipeta 3 veces y transferir suspensión celular a nuevos tubos de 1,5 ml.
- 10 • Incubar las células a 37 °C / 1000 rpm durante 1 h.
- Diluir las células  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  en 2YT y sembrar 50 µl sobre placas de agar 2YT complementadas con cloranfenicol 25 µg/ml y glucosa al 2 %. Se incuban las placas a 30 °C durante 16 h.
- 15 • Contar las ufc al día siguiente.
- c. Secuenciación
- 20 • Elegir la mejor razón de vector:inserto y escoger colonias a partir de las placas de recuento (192 en total) en 1 ml de 2YT complementado con cloranfenicol 25 µg/ml y glucosa al 2 %.
- Incubar a 37 °C / 800 rpm / 35 % de humedad durante la noche.
- Aislar ADN de fagémido y secuenciar con el cebador M13-RP.
- 25 4. Ligación a granel
- a. Ligación
- 30 • Mezcla de ligación (2x 3,5 ml):
- 15-20 µg de pALSphm-dummyT2 digerido con SapI
- X µg de inserto de biblioteca digerido con SapI (X depende de la razón de ligación óptima determinada)
- 35 70 µl de ADN ligasa T4 (2000 U/µl)
- 350 µl de tampón de ADN ligasa T4 (10x)
- 40 añadir agua libre de nucleasa hasta 3,5 ml
- ⇒ dividir en 14x alícuotas de 500 µl
- Incubar a 16 °C durante la noche.
- 45 • Inactivar la ligasa a 65 °C durante 10 min.
- b. Extracción con fenol/cloroformo
- 50 • Véase el punto 1.b
- c. Nuevo tamponamiento con unidades de filtro Amicon
- Añadir ADN extraído a una unidad de filtro Amicon (50 K). El volumen total debe ser de 500 µl. Pueden añadirse hasta 500 µl con agua libre de nucleasa si es necesario.
- 55 • Centrifugar la columna a  $3.000 \times g$  durante 10-15 min hasta que el volumen líquido en la columna superior se reduce hasta 30-50 µl.
- 60 • Descartar el flujo pasante y completar la muestra concentrada con 400 µl de agua libre de nucleasa. Mezclar el agua y la muestra y centrifugar de nuevo a  $3.000 \times g$  durante 10-15 min hasta que el volumen líquido en la columna superior se reduce hasta 30-50 µl.
- Volver a tamponar la muestra con un total de 8x400 µl de agua libre de nucleasa.

- Después de la última etapa de centrifugación, transferir cuidadosamente la columna invertida a un tubo de recogida nuevo. Centrifugar a  $1.000 \times g$  durante 2 min y transferir el ADN eluido desde el tubo de recogida hasta un tubo LoBind de ADN.

5

- Medir la concentración de ADN.

#### 5. Transformaciones a gran escala

##### 10 a. Aplicación de la biblioteca

- Descongelar el medio de recuperación a 37 °C y mantenerlo previamente calentado.
- Preparar un matraz desechable de 125 ml con 18-19 ml de medios 2YT y calentarlo previamente a 37 °C (19 ml para 1x transformación, 18 ml para 2x transformaciones).
- Colocar las cubetas (2 mm) en sus bolsas sobre hielo.
- Enfriar previamente el agua libre de nucleasa sobre hielo.
- Descongelar la ligación a granel y mantenerla sobre hielo.
- Descongelar las células TG1 sobre hielo durante aproximadamente 10 min.
- Añadir 60 µl de agua libre de nucleasa previamente enfriada a las células y 10 µl de la mezcla de ligación. Mezclar mediante movimientos rápidos.
- Transferir la mezcla de células/ligación diluida a una cubeta previamente enfriada y asegurarse de que las células están en la parte inferior de la cubeta golpeándola suavemente sobre la mesa.
- Colocar la cubeta en el electroporador y aplicar un impulso (25 µF / 200 ohm / 2500 V).
- No más de 10 s después del impulso, añadir 870 µl de medio de recuperación y aspirar y expulsar suavemente con pipeta 3 veces.
- Transferir las células transformadas al matraz de 125 ml preparado e incubarlas a 37 °C / 220 rpm durante 1 h. (Pueden combinarse dos transformaciones consecutivas en un matraz).
- Transferir el cultivo a un tubo de 50 ml y centrifugar a  $3.220 \times g$  durante 5 min. Descartar el sobrenadante y volver a suspender el sedimento celular en 1 ml de 2YT. Retirar 10 µl para diluciones en serie ( $10^{-2/-4/-5/-6/-7}$ ) y sembrar las células restantes sobre dos placas de bioensayo con agar 2YT (cloranfenicol 25 µg/ml, glucosa al 2 %) por transformación. Anotar el volumen sembrado en placa.
- Sembrar 20 µl de las diluciones  $10^{-5/-6/-7}$  sobre pequeñas placas de agar (agar 2YT con cloranfenicol 25 µg/ml, glucosa al 2 %).
- Incubar placas de bioensayo y placas de agar a 30 °C durante la noche.
- Repetir las transformaciones hasta que se han recogido suficientes células transformadas (~10x del objetivo para el tamaño de biblioteca). Pueden sellarse las placas de bioensayo con parafilm y almacenarse a 4 °C hasta que se han terminado todas las transformaciones.

##### 50 b. QC mediante secuenciación de Sanger

- Repetir las etapas del punto 3.c

##### 55 c. Combinación de células transformadas y producción de glicerol

- Preparar medios 2YT complementados con glicerol al 15 % (v/v) (concentración final).
- Añadir 10-15 ml de mezcla de 2YT/glicerol a una placa de bioensayo y raspar las colonias.
- Una vez que se han raspado todas las colonias, transferir la suspensión celular a la siguiente bandeja y continuar raspando las colonias. Si la suspensión se vuelve muy viscosa, puede completarse con medios nuevos. Sin embargo, el volumen final no debe superar 14 ml.

65

- Una vez que se han combinado las colonias de todas las transformaciones (procedentes del mismo lote), transferir la suspensión celular a un tubo Falcon de 15 ml.
- 5 • Medir la  $DO_{600}$  de cada tubo y combinar las suspensiones celulares dependiendo de la diversidad calculada a partir del recuento de placas para cada lote de transformación.
- Se producen alícuotas que contienen células que representan en exceso 15x veces la diversidad de la biblioteca y se almacenan a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 10 d. Pruebas de viabilidad de gliceroles
- Descongelar una alícuota de gliceroles de biblioteca combinada.
- 15 • Realizar diluciones en serie de disoluciones madre de glicerol combinadas en 2YT ( $10^{-6}/10^{-7}$ ).
- Sembrar 20  $\mu\text{l}$  de cada dilución en placas de LB-agar complementadas con cloranfenicol 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y glucosa al 2 % (duplicados). Incubar las placas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante la noche.
- 20 • Los números de ufc indican la concentración real de células viables por ml.
- 6. Propagación en fagos
- a. Cálculo de disolución madre de glicerol necesaria
- 25 • Basándose en cálculos anteriores referentes a la viabilidad de los gliceroles, calcular cuántos gliceroles se necesitarán para cubrir 10x la diversidad de biblioteca
- b. Cultivos de fagos
- 30 • Inocular 6x 500 ml de 2xYT previamente calentado que contiene cloranfenicol 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y glucosa al 5 % con gliceroles hasta  $DO_{600} = 0,08-0,1$  en matraces desechables de 2 litros para permitir una buena aireación.
- Hacer crecer a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación a 250 rpm hasta que la  $DO_{600}$  es de 0,5 (75-90 min).
- 35 • Opción: si la cantidad calculada de células no puede albergarse en seis matraces con una  $DO_{600} = 0,08-0,1$  entonces preparar algunos cultivos previos (mismos medios y matraces estériles), dejar crecer los cultivos durante 1 h y usar esos cultivos previos para inocular seis matraces de cultivo principales.
- 40 • Transferir los cultivos a recipientes de centrifuga cónicos de 500 ml (máx. 500 ml) y añadir  $2 \times 10^{12}$  fago auxiliar M13K07 por 500 ml de cultivo. Mezclar bien.
- Incubar sin agitación en un baño de agua a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 60 min.
- 45 • Centrifugar a 3.300 xg,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. Comprobar y volver a centrifugar si es necesario. Volver a suspender el sedimento de cada tubo de centrifuga en 2xYT que contiene cloranfenicol 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y kanamicina 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (y glucosa al 0,1 %). Usar 500 ml por 250 ml de cultivo original.
- Transferir el cultivo a matraces desechables de 2 l (máx. 500 ml por matraz). Pueden volver a usarse los matraces de la etapa de infección previa.
- 50 • Incubar con agitación (170 rpm) a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante la noche.
- c. Purificación de fagos
- 55 • Transferir alícuotas de PEG-NaCl (y recipientes de centrifuga de 0,5 l o 0,25 l si están disponibles) a la cámara frigorífica para enfriar previamente durante la noche.
- Se centrifuga el cultivo durante la noche a 3.300 xg /  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Se recupera el sobrenadante y se añaden 100 ml de PEG/NaCl previamente enfriado por 400 ml de sobrenadante. Es recomendable extraer previamente alícuotas de PEG/NaCl el día antes y dejarlas en la cámara frigorífica durante la noche ya que esto garantizará que se enfrían los tubos y el PEG y ayudará a la recuperación de fago.
- 60 • Se incuba la mezcla sobre hielo en la cámara frigorífica durante 2-3 h. No incubar con PEG durante la noche. Esto dará como resultado sedimentos más grandes, pero se deberán principalmente a ADN huésped y residuos
- 65

bacterianos.

- Se centrifuga la mezcla a 3.300 xg / 4 °C durante 30 min y se descarta el sobrenadante.
- 5 • Vuelven a suspenderse cada uno de los sedimentos resultantes en PBS (8 ml por 400 ml de SN + 100 ml de PEG/NaCl). Una vez suspendido completamente de nuevo todo el sedimento, transferir la disolución de fago a tubos Falcon de 50 ml y centrifugar de nuevo a 11.600 xg / 4 °C durante 10 min.
- 10 • Transferir el sobrenadante a tubos de 50 ml nuevos y añadir PEG/NaCl previamente enfriado (2 ml por 8 ml de PBS). Se mezcla bien la disolución mediante inversión y se deja sobre hielo durante 1 h.
- Se centrifuga la mezcla a 3.300 xg / 4 °C durante 30 min y se descarta el sobrenadante.
- 15 • Vuelve a suspenderse el sedimento en PBS (5 ml por 8 ml de PBS usados tras la primera precipitación), y se centrifuga a 11.600 xg durante 10 min para retirar cualquier residuo bacteriano restante.
- Se combina el sobrenadante (sin filtrar). Se añade glicerol a la disolución de fago (concentración final del 15 %) y se mezcla exhaustivamente.
- 20 • Ahora se preparan las disoluciones madre de fagos y deben almacenarse en PBS / glicerol al 15 % a 4 °C (no más de un par de días hasta que se determinan el título y los niveles de presentación) y después a -80 °C en alícuotas de tamaño de trabajo (cada alícuota de fago debe tener una representación en exceso de al menos 10x de la biblioteca). Usar tubos LoBind de proteínas.
- 25 • Es aconsejable determinar el título del fago tanto mediante densidad óptica como mediante infección de *E. coli*. Los niveles de presentación deben determinarse mediante inmunotransferencia de tipo Western.

d. Prueba de contaminación/infectividad

- 30 • Preparar un cultivo de 5 ml (medio 2YT complementado con tetraciclina 12 µg/ml) de células *E. coli* ER2738 a partir de una única colonia en un tubo ventilado de 14 cm.
- Incubar durante la noche en una incubadora orbital a 37 °C, 220 rpm.
- 35 • Medir la DO<sub>600</sub> de una dilución de 10<sup>-1</sup> del cultivo de ER2738 durante la noche.
- Si la DO<sub>600</sub> es <5, esto puede indicar que no será adecuado para la infección. Descartar el cultivo durante la noche y preparar un cultivo durante la noche nuevo.
- 40 • Preparar un cultivo de 20 ml a DO<sub>600nm</sub> = 0,18 - 0,20 diluyendo el ON en 2YT complementado con tetraciclina 12 µg/ml. Comprobar la DO<sub>600nm</sub>.
- Incubar a 37 °C, 220 rpm durante 45-90 min, hasta que las células alcanzan un intervalo de DO<sub>600</sub> de 0,50-0,70.
- 45 • Durante esta incubación, preparar lo siguiente:
  - Control de agar superior (comprobación de la contaminación):
  - Establecer un baño de agua a 45 °C y fundir agar superior en un microondas.
  - 50 ▪ Extraer alícuotas, 4 × 3 ml, de agar superior fundido en tubos ventilados de 14 cm y colocar en el baño de agua para enfriar durante al menos 30 min antes de usarse.
  - Preparar muestras de fagos mediante dilución en serie en PBS y colocar sobre hielo:
  - 55 1E10 ph/ml
  - 1E9 ph/ml
  - 60 1E8 ph/ml
  - Durante la segunda mitad de la incubación, añadir 10 µl de fago a un tubo de microcentrífuga de 2 ml.
  - Preparar otro tubo de microcentrífuga de 2 ml con 10 µl de PBS (este es el control negativo).
  - 65

- Dejar los tubos a temperatura ambiente hasta que se requiera.

- Control de fagos amplificados:

- 5 ▪ Preparar muestras de fagos mediante dilución en serie y colocarlas sobre hielo:

2E9 ph/ml

2E8 ph/ml

10

2E7 ph/ml

2E6 ph/ml

15

2E5 ph/ml

- Durante la segunda mitad de la incubación, añadir 10 µl de fago purificado diluido a tubos de 1,5 ml.

- Dejar los tubos a temperatura ambiente hasta que se requiera.

20

- Una vez que las células ER2738 alcanzan  $DO_{600} = 0,50-0,70$ , añadir 1 ml de células a cada tubo de 1,5 y 2 ml preparado. Mezclar todos los tubos mediante inversión.

- Incubar inmediatamente todos los tubos a 37 °C durante 15 min sin agitación.

25

- Después de la incubación de 15 min:

- Control de fagos amplificados: transferir los 3x tubos de microcentrífuga de 2 ml a un agitador de tubos a 37 °C, 1000 rpm e incubar durante una hora adicional.

30

- Control de agar superior (fago eluido): añadir 300 µl de la mezcla de células/fagos a los tubos ventilados de 14 cm preparados con agar superior. Mezclar suavemente agitando el tubo con remolinos y verter inmediatamente sobre placas de LB-agar complementadas con tetraciclina 12 µg/ml e inclinar la placa de modo que la disolución de agar superior cubre la placa. Dejar las placas con el agar hacia abajo en un lugar oscuro para permitir que el agar superior sedimente.

35

- Control de fagos amplificados: sembrar 50 µl de cada dilución sobre placas de LB-agar complementadas con carbenicilina 100 µg/ml o cloranfenicol 25 µg/ml o kanamicina 50 µg/ml.

40

- Incubar todas las placas con el agar hacia arriba a 37 °C durante la noche en una incubadora estática.

- Calcular los fagos infecciosos [uff/ml].

#### 7. Nivel de presentación (inmunotransferencia de tipo Western anti-gIIIp)

45

##### a. SDS-PAGE

- Preparar 1E11 fagos en 6,5 µl de PBS y añadir 2,5 µl de colorante de carga 4x y 1 µl de agente reductor 10x. Preparar muestras por duplicado.

50

- Incubar a 70 °C durante 10 min.

- Transferir la preparación de fagos a los pocillos de un gel BOLT Bis-Tris de 12 pocillos.

55

- Correr el gel a 200 V durante 22 min.

##### b. Inmunotransferencia

- Humedecer un papel de filtro (de bolsa azul) con agua MilliQ.

60

- Desprender la lámina de los apilamientos NC Mini/Regular y colocar el apilamiento con la bandeja de plástico en el dispositivo iBlot2.

- Desprender la capa de cobre/gel a partir del apilamiento y colocarla sobre la lámina retirada.

65

- Retirar y descartar el plástico delgado que recubre la membrana de nitrocelulosa del apilamiento.
- Abrir el casete que contiene el gel de SDS, retirar los pocillos y el borde inferior y colocarlos sobre la membrana de NC (de manera ideal sin reposicionamiento). Cualquier burbuja puede retirarse realizando cuidadosamente líneas sobre el gel con guantes húmedos.
- Colocar papel de filtro previamente humedecido sobre el gel y retirar cualquier burbuja haciendo rodar un rodillo por el papel de filtro.
- Colocar de nuevo la capa de cobre/gel sobre el papel de filtro (lado de gel orientado hacia abajo) y usar el rodillo de nuevo.
- Tomar un papel de filtro con un electrodo conectado de la capa de apilamientos NC Mini y colocarlo encima del apilamiento con el electrodo recubriendo la electrónica en el dispositivo iBlot2.
- Cerrar la tapa del dispositivo iBlot2 y esperar a que se ilumine “iniciar la última serie” en la pantalla. Reposicionar el papel de filtro con electrodo si es necesario.
- Elegir en “plantillas” el programa P0 (tarda 7 min).

#### c. Detección de gIIIp

- Transferir la membrana de nitrocelulosa sometida a inmunotransferencia a un tubo Falcon de 50 ml y añadir 5 ml de leche desnatada al 3 % (p/v) en TBS pH 7,5 al mismo.
- Incubar en un rodillo mezclador a TA durante 1 h.
- Descartar la disolución de bloqueo y lavar la membrana añadiendo 5 ml de TBS-T (0,05 %).
- Mezclar en un rodillo mezclador a TA durante 5 min. Repetir 2 veces más.
- Anticuerpo primario: añadir 5 ml de una dilución 1:1000 de anticuerpo anti-gIIIp en leche desnatada al 1 % (p/v) en TBS, pH 7,5.
- Incubar en un rodillo mezclador a TA durante 1 h.
- Lavar la membrana 3 veces con TBS-T como anteriormente.
- Anticuerpo secundario: añadir 5 ml de una dilución 1:2000 de anticuerpo anti-ratón acoplado con HRP en leche desnatada al 1 % (p/v) en TBS, pH 7,5.
- Incubar en un rodillo mezclador a TA durante 1 h.
- Lavar la membrana 3 veces con TBS-T como anteriormente.
- Detectar los anticuerpos unidos con 1,5 ml de un sustrato de quimioluminiscencia (por ejemplo, ECL). Dejar la disolución sobre la membrana durante 1 min, después inclinar la bandeja y extraer cualquier disolución de ECL en exceso con una toalla de papel.
- Obtener imágenes de la membrana.
- Guardar la imagen resultante, cuantificar las bandas y evaluar los niveles de presentación.

#### Ejemplo 9: proteínas de andamiaje a modo de ejemplo adicionales

La invención abarca andamiajes de estefina A con mutaciones tal como se describieron anteriormente con una determinada identidad de secuencia definida con referencia a la estefina A humana (SEQ ID NO: 1) tal como se menciona en las reivindicaciones. En este caso, se proporcionan ejemplos de andamiajes útiles según la presente invención que ilustran la funcionalidad a diferentes niveles de identidad de secuencia.

En este ejemplo, los polipéptidos de la invención comprenden una secuencia de aminoácidos derivada de SteA canina.

Las mutaciones con respecto a la secuencia de tipo natural canina están subrayadas (las mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 pueden identificarse mediante alineación de secuencias).



cSteA3r2: SEQ ID NO: 93

MMPGGLTEAKPATPEVQEIANEVKPKQLEKETGKTWQEFEEAVEYKTQVDAGLNYYIKVRVN-  
GKYIHLKIFKGLPGQNPTLTLTGYQTDKSKDDELTGF

5

cSteA3r2 con inserciones de péptido heterólogo de (GGG)<sub>3</sub> (en recuadro): SEQ ID NO: 94

MMPGGLTEAKPATPEVQEIANEVKPKQLEKETGKTWQEFEEAVEYKTQVDGGSGSGSGSGLNYYIK  
VRVN-GKYIHLKIFKGLGGSGSGSGSPTLTLTGYQTDKSKDDELTGF

10 Se han expresado satisfactoriamente.

Las medidas de Tf a modo de ejemplo son las siguientes:

cSteA 3r2, Tf = 79,2 °C

15

cSteA 3r2 con (GGG)<sub>3</sub> en los bucles 2 y 4, Tf = 83,6 °C

Esto demuestra que pueden insertarse péptidos heterólogos en las posiciones tal como se enseña con referencia a hSteA.

20

Las secuencias a modo de ejemplo adicionales basadas en cSteA (los cambios con respecto a cSteA de tipo natural están subrayados) incluyen:

cSteAtA SEQ ID NO: 95

25

MIPGGLTEAK PATPEVQEIA NEVKPQLEEK TGETYQEFEEA VEYKTQVDAG  
INYYIKVRVG DNSYIHLKIF KGLPGQNPTL TLTGYQTDKS KDELDTGF

cSteAtA comprende un conjunto mínimo de mutaciones que tienen las ventajas de prevenir un posible inicio ambiguo de la traducción (M2I, vuelve a la secuencia de hSteA), retirar un sitio de glicosilación (N32G) y minimizar la dimerización por intercambio de dominio (V48D, ya descrita). Estas mutaciones son útiles y pueden realizarse de manera individual.

30

cSteAtB, SEQ ID NO: 96

MIPGGLTEAK PATPEVQEIA NEVKPQLEEK TGETYQEFEEA VEYKTQVDAG  
INYYIKVRVG DNSYIHLKIF KSLPGQNE~~DL~~ TLTGYQTDKS KDELDTGF

35

cSteAtB incluye las mutaciones mínimas y mutaciones adicionales para hacer ventajosamente que la "entrada" y "salida" del bucle 4 sean iguales que hSteA (G72S, P78E y T79D, todas vuelven a la secuencia de hSteA).

40

cSteAtC, SEQ ID NO: 97

MIPGGLTEAK PATPEVQEIV NEVKPQLEEK TGETYQE~~LEA~~ VEYKTQVDAG  
INYYIKVRVG DNSYIHLKIF KGLPGQNPTL TLTGYQTDKS KDELDTGF

45

cSteAtC incluye las mutaciones mínimas y mutaciones adicionales con respecto a cSteA de tipo natural para "devolver" los residuos de vuelta a la secuencia humana (residuos que se encontró que eran desestabilizantes en hSteA (A20V, F38L, ambas que vuelven a la secuencia de hSteA)). Esto tiene la ventaja de hacer que el polipéptido basado en cSteA sea más estable.

cSteAtD, SEQ ID NO: 98

50

MIPGGLTEAK PATPEVQEIV NEVKPQLEEK TGETYQE~~LEA~~ VEYKTQVDAG  
INYYIKVRVG DNSYIHLKIF KSLPGQNE~~DL~~ TLTGYQTDKS KDELDTGF

cSteAtD combina incluir las mutaciones mínimas y mutaciones para hacer que la "entrada" y "salida" del bucle 4 sean iguales que hSteA (G72S, P78E y T79D, todas vuelven a la secuencia de hSteA).

55

cSteAtIAL, SEQ ID NO: 99

MIPGGLTEAK PATPEVQEIA NEVKPQLEEK TGETYQEFEA VEYKTQVDGGSGGSGGS  
 INYYIKVRVG DNSYIHLKIF KGLGGSGGSGGSPTL TLTGYQTDKS KDDELTGF

Como cSteAtA pero incluyendo inserciones de péptido heterólogo de GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 92) (en recuadro), una en el lugar del residuo 48 y una en el lugar de los residuos 74 – 77.

5

cSteAt2BL, SEQ ID NO: 100

MIPGGLTEAK PATPEVQEIA NEVKPQLEEK TGETYQEFEA VEYKTQVDGGSGGSGGS  
 INYYIKVRVG DNSYIHLKIF KSLGGSGGSGGSEDL TLTGYQTDKS KDDELTGF

10 Como cSteAtB, pero incluyendo inserciones de péptido heterólogo de GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 92) (en recuadro), una en el lugar del residuo 48 y una en el lugar los de residuos 74 – 77.

cSteAt3CL (SEQ ID NO: 101)

MIPGGLTEAK PATPEVQEIV NEVKPQLEEK TGETYQELEA VEYKTQVDGGSGGSGGS  
 15 INYYIKVRVG DNSYIHLKIF KGLGGSGGSGGSPTL TLTGYQTDKS KDDELTGF

Como cSteAtC pero incluyendo inserciones de péptido heterólogo de GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 92) (en recuadro), una en el lugar del residuo 48 y una en el lugar de los residuos 74 – 77.

20 cSteAt4DL (SEQ ID NO: 102)

MIPGGLTEAK PATPEVQEIV NEVKPQLEEK TGETYQELEA VEYKTQVDGGSGGSGGS  
 INYYIKVRVG DNSYIHLKIF KSLGGSGGSGGSEDL TLTGYQTDKS KDDELTGF

25 Como cSteAtD pero incluyendo inserciones de péptido heterólogo de GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 92) (en recuadro), una en el lugar del residuo 48 y una en el lugar de los residuos 74 – 77.

#### Andamiajes a modo de ejemplo adicionales

30 cSteA de tipo natural ya contiene los residuos beneficiosos E42 e I65 e I51 (T51L es lo más preferido, pero T51I es igual de bueno). El mutante mínimo cSteAA (anteriormente) es equivalente a 3t5 derivado de la secuencia de hSteA.

En este caso, se demuestra un equivalente a hSteA 3r1 usando la secuencia canina, que se facilita a continuación (cSteAr1).

35 cSteAr1 (SEQ ID NO: 103)

MMPGGLTEAKPATPEVQEIANEVKPQLEKETGKTWQEFEEAVEYKTQVDAGLNYYIKVRVG\_  
 NKYIHLKIFKGLPGQNPTLTTLTGYQTDKSKDDELTGF

40 cSteA 3r2 ya se presentó anteriormente (SEQ ID NO: 93).

Ejemplo 10: Tf aumentadas

Se produjeron polipéptidos que tenían mutación/mutaciones tal como se describe en el presente documento.

45 En este ejemplo, los polipéptidos se basaron en la secuencia de SteA humana (SEQ ID NO: 1) con mutaciones tal como se describe; a continuación se muestran datos referentes a SteA humana de tipo natural.

Tabla de sustituciones de estabilidad creciente

Mutación	Efecto sobre la Tf (°C)
E29M	+0,7
E29K K30E E33K	+3,9
N32G	+3,5
T34K	+3,0
T34R	+2,6
T34V	+2,2
Q42E	+3,2

T45V	+1,8
T45I	+1,0
T51I	+4,8
T51L	+4,6
T51V	+4,4
T51F	+1,0
A59V	+3,9
A59I	+3,4
A59L	+1,1
A59L G60N D61G N32K	+0,8
A59V G60 D61N N62K	+1,0
A59 G60N G61G N62K	+1,3
A59 G60N ΔD61 N62G	+2,0
A59 G60 ΔD61 N62	+2,2
A59L G60N ΔD61 N62G	+3,1
A59V G60N D61G N32K	+3,4
A59I G60N ΔD61 N62G	+3,6
A59I G60N D61G N62K	+3,6
A59V G60N ΔD61 N62G	+3,9
A59V G60 ΔD61 N62	+4,7
K63R	+1,7
M65I	+5,5
M65V	+3,9
L67I	+1,0
N90T	+1,4

## Ejemplo 11: Tf reducidas

Se produjeron polipéptidos que tenían mutación/mutaciones tal como se describe en el presente documento.

- 5 En este ejemplo, los polipéptidos se basaron en la secuencia de SteA humana (SEQ ID NO: 1) con mutaciones tal como se describe; a continuación se muestran datos referentes a SteA humana de tipo natural.

## Tabla de sustituciones de estabilidad decreciente

Mutación	Efecto sobre la Tf (°C)
A12I	-6,5
A12V	-4,5
I16L	-5,7
V20A	-10,6
V20I	-9,1
V20L	-5,2
V20I L38A	-16,7
V20L L38A	-15,3
V20L L38V	-11,0
V20I L38V	-10,4
Q26E	-3,2
T31K	-7,4
N32D	-3,8
N32H	-1,6
T34D	-3,7
T34P	-1,9
L38A	-12,8
L38V	-7,8
L38F	-7,2
A40I	-8,0
A40V	-2,8
Q42D	-2,7
V48E	-6,7
V48D	-6,2
V48G	-4,8
V48A	-2,5
V48L	-2,0
G50S	-7,5
T51A	-2,4
Y54D T83D Q86E	-21,0

A59 G60P ΔD61 N62P	-9,7
A59 G60P D61P N62K	-6,9
A59 G60P ΔD61 N62G	-3,8
A59 G60P D61G N62K	-1,4
A59 G60 D61N N62K	-1,1
T83D Q86E	-4,8

#### Ejemplo 12: demostraciones de diversos agentes de unión a 3r2 y diversos agentes de unión de tipo 4 (canino)

##### Biblioteca de tipo 3r2

Las figuras 12 -14 muestran los resultados de selecciones frente a receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (Her2), el anticuerpo terapéutico monoclonal humanizado trastuzumab, y ligando de muerte programada humano 1 (PD-L1), sometidos a prueba en un "ensayo iQue". Estos datos muestran que los reactivos de tipo Affimer pueden unirse de manera estrecha y específica a dianas, sin reactividad cruzada con proteínas relacionadas y no relacionadas. Estos datos también muestran que los resultados de los reactivos de tipo Affimer son repetibles, dado que las secuencias de bucle se representan con frecuencia múltiples veces en un ensayo iQue, proporcionando resultados similares.

El dispositivo de selección Intellicyt iQue es un ensayo de perlas multiplexado, basado en citometría de flujo, en el que las proteínas diana y los controles relevantes se inmovilizan sobre perlas indexadas de manera fluorescente. Se incubaba el reactivo de tipo Affimer con las perlas y se une a la proteína diana, después se detecta el complejo con un anticuerpo anti-HA marcado con Alexa488. Para la selección, se usan ensayos iQue para seleccionar los mejores reactivos de tipo Affimer basándose en su afinidad y selectividad frente a la diana deseada. De manera ideal, los reactivos de tipo Affimer mostrarán una fuerte señal positiva con respecto a la perla recubierta en su diana, pero no con respecto a ninguna de las otras perlas.

En las figuras 12 - 14, ID de trabajo de Affimer es un identificador interno; los péptidos heterólogos se presentan (insertan) en las posiciones del bucle 2 y el bucle 4. La secuencia de aminoácidos se determina a partir de datos de secuenciación de ADN. Las dianas sometidas a prueba en el ensayo iQue fueron EGFR, mlgG2b, hlgG1 Fc, hPD-L2, Her2 (R&D), hPD-L1, trastuzumab, hlgG, Her2 (Sino), Her 3, mPD-L1, Avastin, Humira, Rituximab, mPD-L2, Her 4 y un control sin diana. FL1-A es la señal medida. QSHxx, donde xx es un número, se refiere a un tipo específico de perla indexada de manera fluorescente.

La figura 12 muestra el resultado de un ensayo iQue para agentes de unión a Her2.

La figura 13 muestra el resultado de un ensayo iQue para agentes de unión a Trastuzumab.

La figura 14 muestra el resultado de un ensayo iQue para agentes de unión a PD-L1 humano.

Las figuras 15 y 16 muestran datos de ELISA de múltiples puntos típicos, en los que se recubre un reactivo de tipo Affimer sobre una placa de 96 pocillos y se usa como reactivo de captura. Estos datos muestran que los agentes de unión identificados o bien en un ELISA de fagos (sobre placas, pero con el reactivo de tipo Affimer unido a un fago) o bien en un ensayo iQue (sobre perlas, pero con un reactivo de tipo Affimer purificado) pueden detectar diana en una aplicación de ELISA típica, que la señal puede valorarse, y, particularmente para PD-L1, puede detectarse una baja concentración de diana.

En este caso, se recubrieron reactivos de tipo Affimer identificados para PD-L1 (figura 15) y Her2 (figura 16) sobre placas de ELISA a una concentración fija. Después de lavar y bloquear, se valoran las dianas biotiniladas apropiadas y se dejan unirse a los reactivos de tipo Affimer recubiertos. Después de un lavado adicional, se usa estreptavidina-HRP para detectar la presencia de diana capturada con el uso de un sustrato apropiado. Ambos reactivos de tipo Affimer anti-PD-L1 se unen a PD-L1 biotinilado a bajas concentraciones y PD-L1 biotinilado no se une a la placa de ELISA (controles sin recubrimiento; cada clon estaba en una placa de ELISA independiente, y cada una contenía su propio control sin recubrimiento). Los reactivos de tipo Affimer anti-Her2 no funcionan tan bien como los reactivos de tipo Affimer anti-PD-L1, con señales globales inferiores, pero sí que demuestran una respuesta valorable. En este caso, Her2 biotinilado sí que interacciona ligeramente con la placa de ELISA a la concentración más alta sometida a prueba.

La figura 15 muestra datos de ELISA para dos reactivos de tipo Affimer anti-PD-L1 diferente (clones A8 y G8).

La figura 16 muestra datos de ELISA para dos reactivos de tipo Affimer anti-Her2 diferentes (clones C4 y E10).

##### Biblioteca de tipo 4 (andamiaje canino)

La biblioteca de tipo 4, basada en el supuesto homólogo canino de estefina A, se ha usado para seleccionar reactivos de tipo Affimer frente a PD-L1 canino, específicamente los que inhibirán la interacción entre PD-1 canino y

PD-L1 canino. El resultado de un ensayo iQue para estos reactivos (figura 17; descripción de dispositivo de selección iQue como anteriormente) muestra que también puede usarse este andamiaje canino para encontrar reactivos de unión específicos. En este caso, los 6 reactivos de tipo Affimer principales muestran reactividad cruzada frente a Fc humano, el PD-L1 canino usado en el procedimiento de selección es una proteína de fusión de PD-L1 canino / Fc humano. En vez de unirse realmente a PD-L1 canino, en realidad son reactivos de unión muy buenos frente al dominio Fc humano. El uso de un andamiaje basado en una proteína no humana tal como una proteína canina es útil para producir productos (bio)terapéuticos no humanos tales como productos (bio)terapéuticos caninos, que deben ser mucho menos inmunogénicos y, por tanto, tolerarse mejor que un producto terapéutico derivado de una especie diferente.

La figura 17 muestra el resultado de un ensayo iQue para detectar agentes de unión frente a PD-L1 canino mediante reactivos de tipo Affimer basados en estefina A canina. En la figura 17, las dianas sometidas a prueba en el ensayo iQue fueron PD-L1 canino, VEGFR2 humano, péptido SMA(4A6)+BA, Fc humano, PD-1 canino, amina-PEG11, mlgG2b, fumonisina y péptido SMA (2A9) + BA, así como un control sin diana.

Un uso industrial para el andamiaje canino es generar reactivos terapéuticos caninos. De manera adecuada, los reactivos de tipo Affimer caninos se unen a su diana, y de manera adecuada lo hacen de tal manera que perturban la unión del ligando natural para tener un efecto biológico. En esta selección, se deseaba encontrar reactivos de tipo Affimer caninos que evitaban la unión de PD-1 canino a PD-L1 canino, que tendrán el potencial de usarse como inhibidores de punto de control en el tratamiento del cáncer. En este caso, se sometieron a prueba once de los reactivos de tipo Affimer anti-PD-L1 canino para determinar su capacidad para inhibir la interacción de PD-L1 canino con PD-1 canino en un ELISA de competición. Los resultados mostraron que algunos reactivos de tipo Affimer caninos eran capaces de unirse a PD-L1 canino con aproximadamente la misma afinidad que PD-1 canino, y otros con un intervalo de afinidades inferiores.

A continuación, se recubrió una placa de ELISA con PD-1 canino. Por separado, se incubó PD-L1 canino biotinilado con una valoración de los diferentes reactivos de tipo Affimer, y PD-1 canino como control (las reacciones de competición). Entonces, tras la incubación, se incuban estas reacciones de competición con la placa de ELISA recubierta. Cuando no hay ninguna inhibición, el PD-L1 biotinilado será libre de unirse al PD-1 en la superficie de la placa, y esto dará una alta señal al detectarse con un reactivo de estreptavidina-HRP y sustrato adecuado. Sin embargo, si el reactivo de tipo Affimer se une a PD-L1 canino de tal manera que inhibe la unión a PD-1, dará una señal baja. La figura 18 muestra los datos de ELISA de competición para los reactivos de tipo Affimer caninos con afinidades similares a PD-1, y la figura 19 muestra los datos para reactivos de tipo Affimer caninos que tienen afinidades inferiores a PD-1.

La figura 18 muestra ELISA de competición para reactivos de tipo Affimer caninos que se unen a cPD-L1 con afinidad similar a PD-1 canino. Las curvas son ajustes a un modelo logístico de 4 parámetros.

La figura 19 muestra ELISA de competición para reactivos de tipo Affimer caninos que se unen a cPD-L1 con afinidad inferior a PD-1 canino. Las curvas son ajustes a un modelo logístico de 4 parámetros.

Todos los compuestos de tipo Affimer en las figuras 12 - 14 son 3r2 (SEQ ID NO: 19) excepto por mlgG2b G12 y Zika NS1 C12, véase a continuación.

IgG2b G12 de ratón tiene el andamiaje de adhirón ("andamiaje de tipo 2", el consenso de estefinas vegetales, por tanto no relacionado con la estefina A humana). La secuencia es la siguiente:

MSAATGVRVPGNENSLEIEELARFAVDEHNKKENALLEFVRVVKAKEQXXXXXXXXXTMYLTLEAKDGG  
KKKLYEAKVWVKXXXXXXXXXNFKELQEFKPVGDAAAHHHHHHG (SEQ ID NO: 105)

Los compuestos de tipo Affimer caninos tienen las mutaciones M2I, N32G y V48D con respecto a cSteA de tipo natural (subrayadas); la siguiente secuencia:

MIPGGLTEAK PATPEVQEIA NEVKPQLEEK TGETYQFEA VEYKTQVDAG INYIKVRVG DNSYIHLKIF  
KGLPGQNPTL TLTYQTDKS KDELDTGF (SEQ ID NO: 106)

En este ejemplo, Zika NS1 C12 también se basa en el andamiaje de adhirón:

MSAATGVRVPGNENSLEIEELARFAVDEHNKKENALLEFVRVVKAKEQXXXXXXXXXTMYLTLEAKDGG  
KKKLYEAKVWVKXXXXXXXXXNFKELQEFKPVGDG (SEQ ID NO: 107)

## REIVINDICACIONES

1. Polipéptido que es adecuado para su uso como proteína de andamiaje y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 % de identidad con respecto a los residuos de aminoácido 1 a 98 de SEQ ID NO: 1;

caracterizado porque dicho polipéptido comprende una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionadas del grupo que consiste en:

N32G, T51L, T51V, M65V, A59I, E29M, T34V, T34R, T45I, T45V, T51F, A59L, L67I, (E29K, K30E, E33K), (A59L, G60N, D61G, N62K), (A59V, D61N, N62K), (G60N, D61G, N62K), (G60N, ΔD61, N62G), ΔD61, (A59L, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, D61G, N62K), (A59I, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, G60N, ΔD61, N62G), (A59V, ΔD61), L38A, V20I, A40I, L38V, A12I, A12V, I16L, V20L, Q26E, T31K, N32D, N32H, T34D, T34P, A40V, Q42D, V48E, V48G, V48A, T51A, (V20I, L38A), (V20L, L38A), (V20I, L38V), (V20L, L38V), (Y54D, T83D, Q86E), (G60P, ΔD61, N62P), (G60P, D61P, N62K), (G60P, ΔD61, N62G), (G60P, D61G, N62K), (D61N, N62K) y (T83D, Q86E);

en el que dicho polipéptido tiene una Tf superior a la Tf del polipéptido con la secuencia MIPRGLSEAK PATPEIQEIV DKVKPQLEEK TNETYGKLEA VQYKTQVLAS TNYIKVRAG DNKYMHLKVF NGPPGQNADR VLTGYQVDKN KDELTGF.

2. Polipéptido según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido comprende además al menos una inserción de péptido heterólogo, en el que dicha inserción de péptido heterólogo comprende un péptido heterólogo insertado en una de las siguientes posiciones con respecto a SEQ ID NO: 1:

a) 47-<péptido heterólogo>-55

b) 46-<péptido heterólogo>-54

c) 46-<péptido heterólogo>-50

d) 48-<péptido heterólogo>-50

e) 49-<péptido heterólogo>-51

f) 50-<péptido heterólogo>-52

g) 66-<péptido heterólogo>-85

h) 67-<péptido heterólogo>-84

i) 70-<péptido heterólogo>-74

j) 72-<péptido heterólogo>-74

k) 71-<péptido heterólogo>-73

l) 72-<péptido heterólogo>-81

m) 73-<péptido heterólogo>-80

n) 79-<péptido heterólogo>-81

o) 80-<péptido heterólogo>-81

p) 82-<péptido heterólogo>-83

q) 72-<péptido heterólogo>-77

r) 73-<péptido heterólogo>-78

s) 74-<péptido heterólogo>-79

t) 4-<péptido heterólogo>-5.

3. Polipéptido según la reivindicación 2, en el que dicho polipéptido comprende dos inserciones de péptido

heterólogo, una primera inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (a) a (f), y una segunda inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (g) a (s).

- 5 4. Polipéptido según la reivindicación 2, en el que dicho polipéptido comprende dos inserciones de péptido heterólogo, una primera inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (a) a (f), y una segunda inserción de péptido heterólogo en la posición (t).
- 10 5. Polipéptido según la reivindicación 2, en el que dicho polipéptido comprende dos inserciones de péptido heterólogo, una primera inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (g) a (s), y una segunda inserción de péptido heterólogo en la posición (t).
- 15 6. Polipéptido según la reivindicación 2, en el que dicho polipéptido comprende tres inserciones de péptido heterólogo, una primera inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (a) a (f), y una segunda inserción de péptido heterólogo en cualquiera de las posiciones (g) a (s), y una tercera inserción de péptido heterólogo en la posición (t).
- 20 7. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 es: N32G.
- 25 8. Polipéptido según cualquier reivindicación anterior, en el que dicho polipéptido comprende además una o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 seleccionadas del grupo que consiste en: G4R, G4W, V48D, V48E, G50S, Y35W, Y43W, Y53W, Y54W, Y64W, F70W, Y85W, F98W, (K71N S72G L73P), o (E78A L80R).
- 30 9. Polipéptido según cualquier reivindicación anterior, que comprende cinco o menos mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1.
- 35 10. Polipéptido según la reivindicación 9, en el que dichas cinco o menos mutaciones se seleccionan del grupo que consiste en N32G, Y35W, V48D, M65I, Q42E y T51L.
- 40 11. Polipéptido según la reivindicación 9, en el que dichas cinco o menos mutaciones se seleccionan del grupo que consiste en N32G, V48D, M65I, Q42E y T51L.
- 45 12. Polipéptido según la reivindicación 9, que tiene cada una de las mutaciones en uno de los siguientes grupos:  
i) N32G V48D  
ii) N32G V48D M65I  
iii) N32G V48D M65I T51L  
iv) N32G V48D M65I Q42E  
v) N32G V48D M65I Q42E T51L.
- 50 13. Polipéptido según la reivindicación 12, que tiene cada una de las mutaciones iv) N32G, V48D, M65I y Q42E.
- 55 14. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que tiene cada una de las mutaciones en uno de los siguientes grupos:  
a) N32G Y35W V48D M65I Q42E T51L (A59V ΔD61) (E29K K30E E33K)  
b) N32G Y35W V48D M65I Q42E T51L (A59V G60N ΔD61 N62G) (E29K K30E E33K).
- 60 15. Polipéptido según la reivindicación 14, que tiene cada una de las mutaciones b) N32G Y35W V48D M65I Q42E T51L (A59V G60N ΔD61 N62G) (E29K K30E E33K).
- 65 16. Polipéptido según cualquier reivindicación anterior, en el que dicho péptido heterólogo tiene de 6 a 36 aminoácidos de longitud.
17. Proteína de fusión que comprende:  
a. un polipéptido según cualquier reivindicación anterior; y

b. una o más secuencias de aminoácidos adicionales seleccionadas del grupo que consiste en: secuencias de señal de secreción, secuencias de ligador peptídico, etiquetas de afinidad, dominios transmembrana, secuencia de retención en superficie celular, secuencias de reconocimiento de sustrato para modificaciones postraduccionales, dominios de multimerización para crear estructuras multiméricas de la proteína agregando mediante interacciones proteína-proteína, restos de polipéptido de prolongación de la semivida, secuencias de polipéptido para alterar la localización tisular y el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, uno o más polipéptidos adicionales según cualquier reivindicación anterior que se unen a la misma diana o a dianas diferentes, y una o más secuencias de polipéptido de tipo Affimer adicionales que se unen a la misma diana o a dianas diferentes.

18. Proteína de fusión según la reivindicación 17, que comprende uno o más restos de polipéptido de prolongación de la semivida seleccionados del grupo que consiste en un dominio Fc o porción del mismo, una proteína de albúmina o porción de la misma, un resto de polipéptido de unión a albúmina, transferrina o porción de la misma, un resto de polipéptido de unión a transferrina, fibronectina o porción de la misma, o un resto de polipéptido de unión a fibronectina.

19. Polipéptido según la reivindicación 18, en el que el dominio Fc o una porción del mismo conserva unión a FcN.

20. Polipéptido según la reivindicación 18, en el que el dominio Fc o una porción del mismo es de IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM o una subclase (isotipo) de las mismas tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 o IgA2.

21. Polipéptido según la reivindicación 18, en el que el dominio Fc o una porción del mismo conserva función efectora seleccionada de unión a C1q, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptor de células B, o una combinación de las mismas.

22. Polipéptido según la reivindicación 18, en el que el resto de polipéptido de prolongación de la semivida aumenta la semivida en suero de la proteína en al menos 5 veces con respecto a su ausencia de la proteína.

23. Polipéptido según cualquier reivindicación anterior, que es un polipéptido de afimero.

24. Ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.

25. Vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 24.

26. Biblioteca que comprende una población de polipéptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en la que al menos dos polipéptidos individuales dentro de dicha población comprenden inserciones de péptido heterólogo diferentes.

27. Biblioteca que comprende una población de ácidos nucleicos, comprendiendo dichos ácidos nucleicos secuencias de nucleótidos que codifican para una población de polipéptidos según la reivindicación 26.

28. Célula huésped que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, un ácido nucleico según la reivindicación 24, o una biblioteca según la reivindicación 26 ó 27.

29. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, para su uso en medicina.

30. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, para su uso en la preparación de un medicamento.

31. Método para identificar un péptido capaz de unirse a una estructura de interés, comprendiendo dicho método:

(i) proporcionar un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 que comprende una inserción de péptido heterólogo;

(ii) poner en contacto dicho polipéptido con dicha estructura de interés; y

(iii) monitorizar la asociación entre el polipéptido y la estructura de interés;

en el que la asociación del polipéptido con la estructura de interés identifica el péptido como péptido candidato capaz de unirse a dicha estructura.



32. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 como proteína de andamiaje.

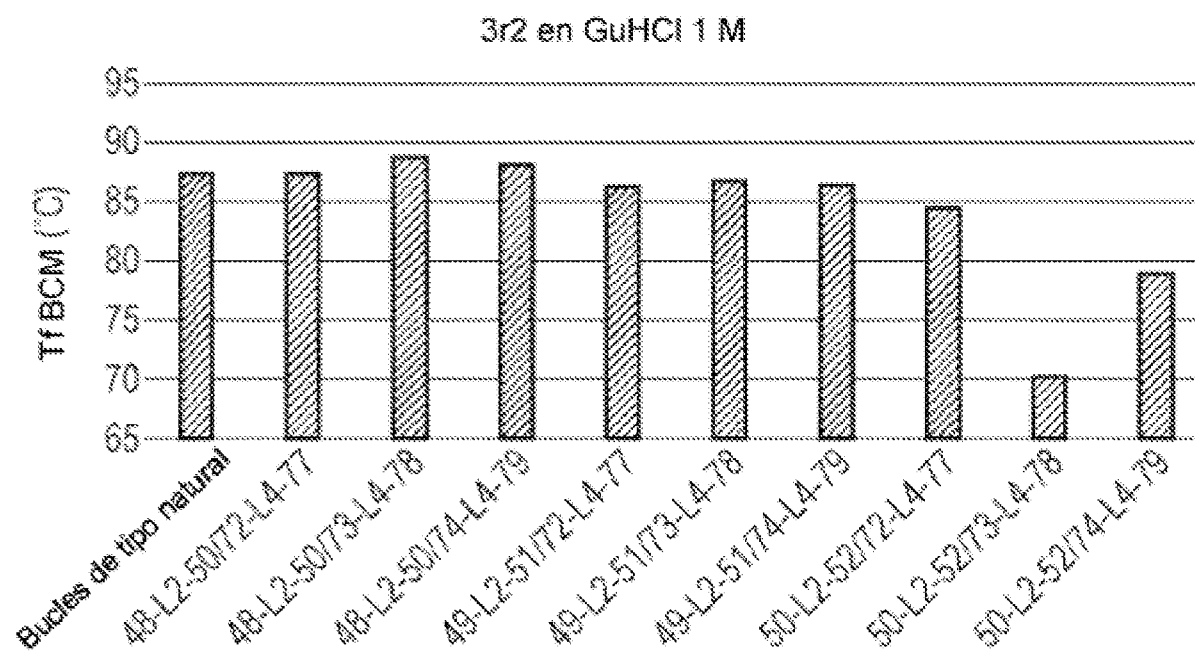


FIG. 1

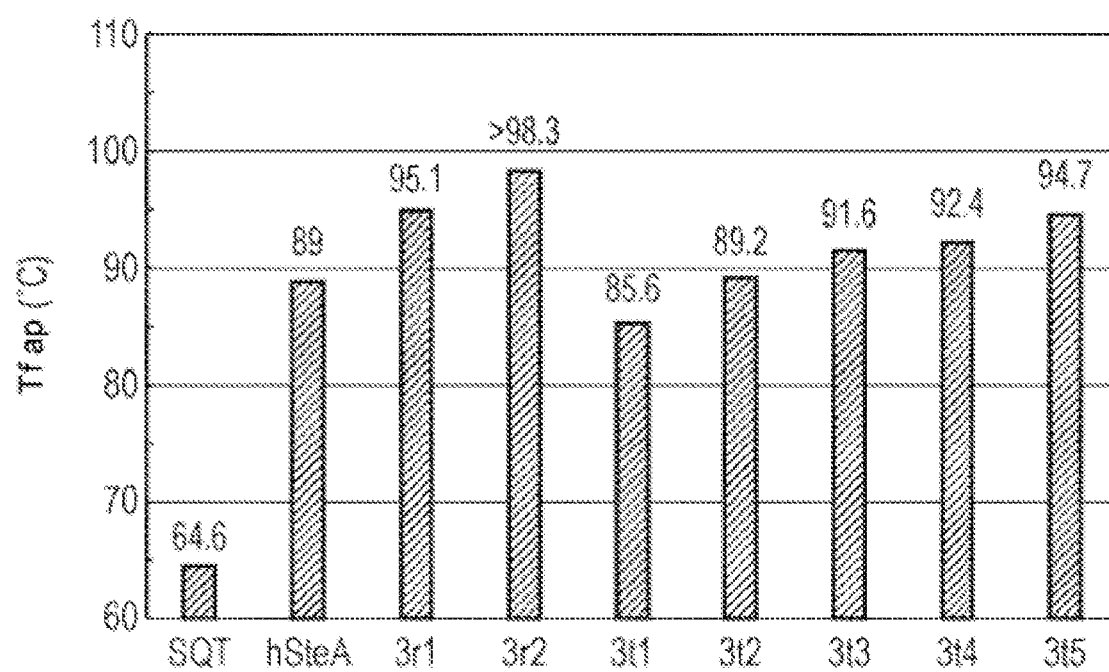


FIG. 2

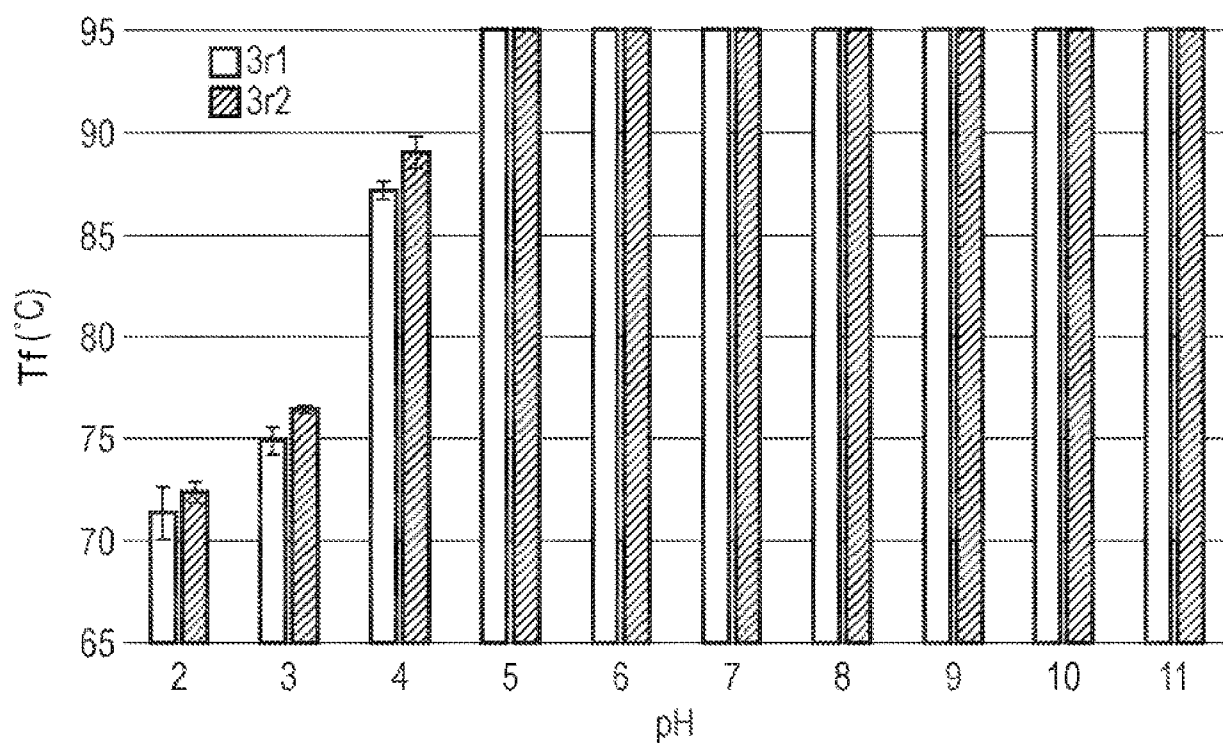


FIG. 3

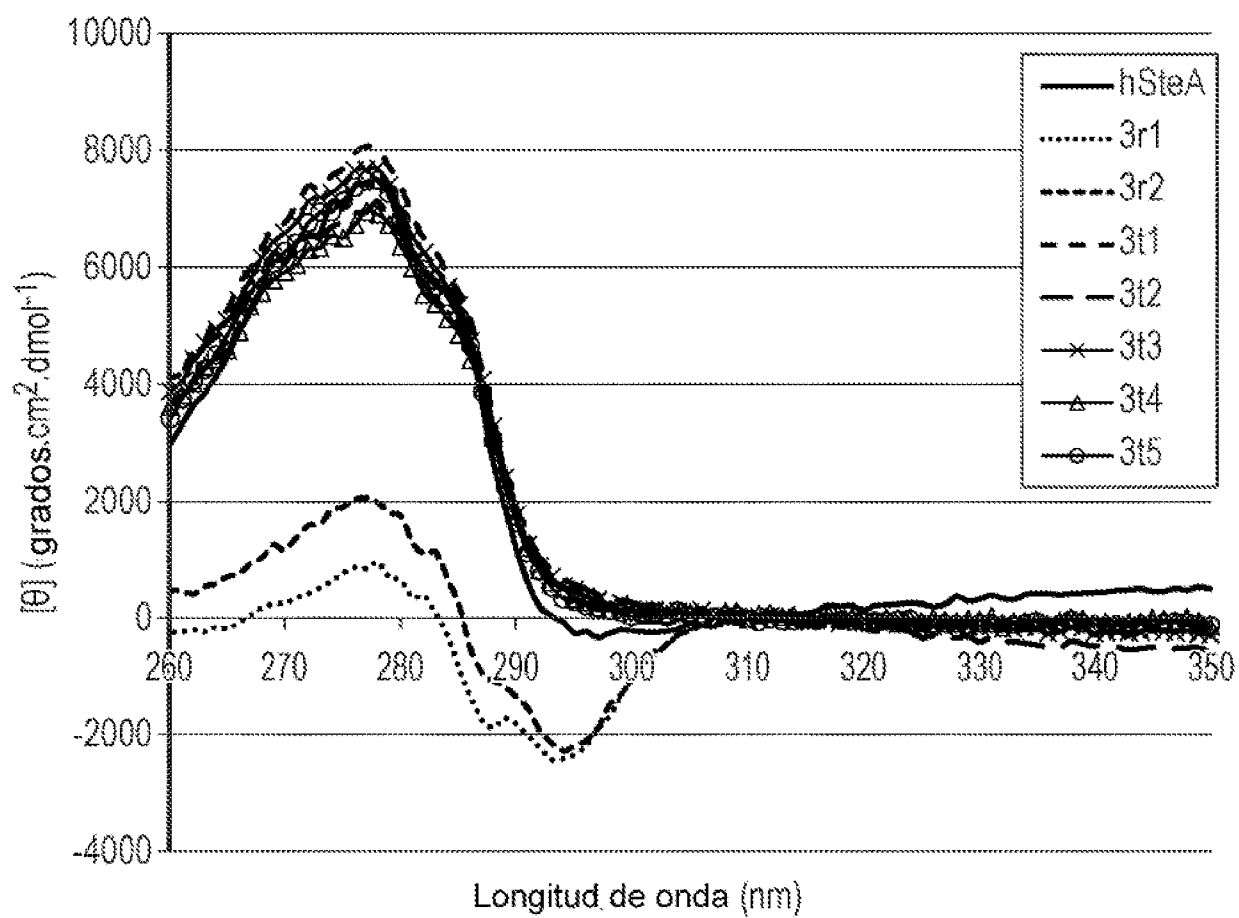


FIG. 4a

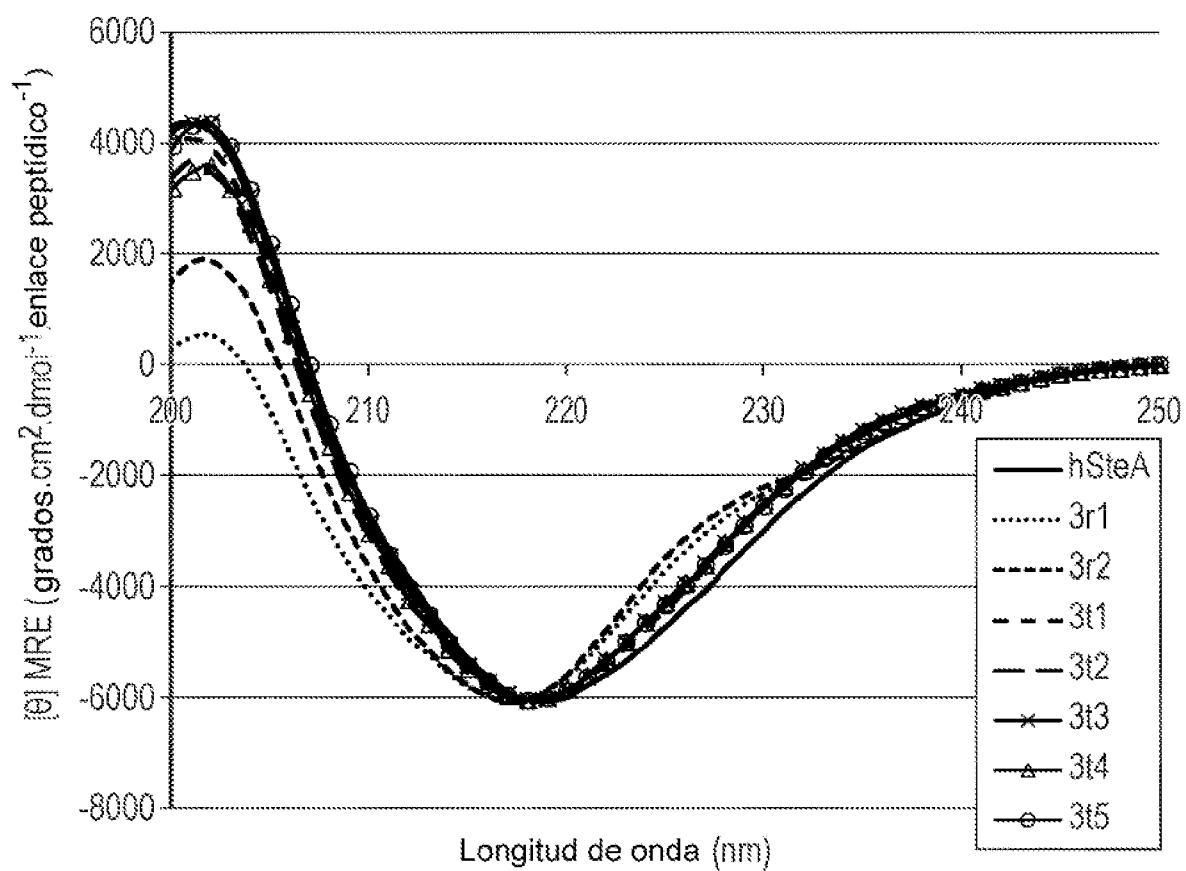


FIG. 4b

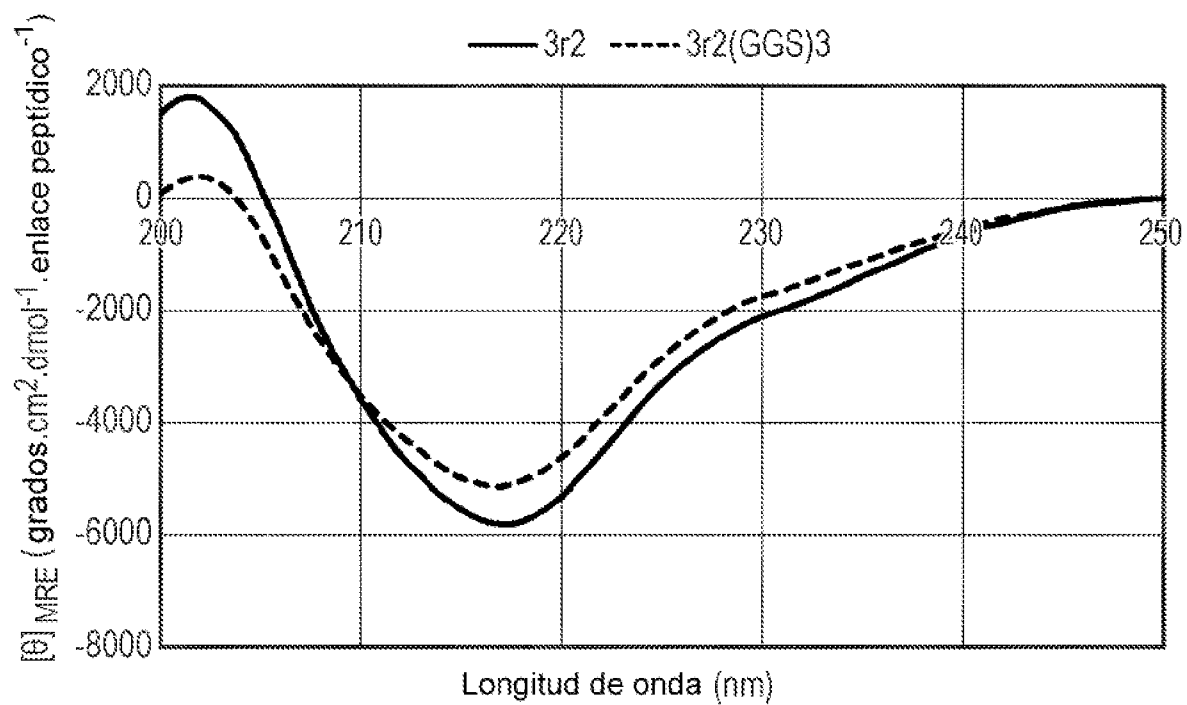


FIG. 5

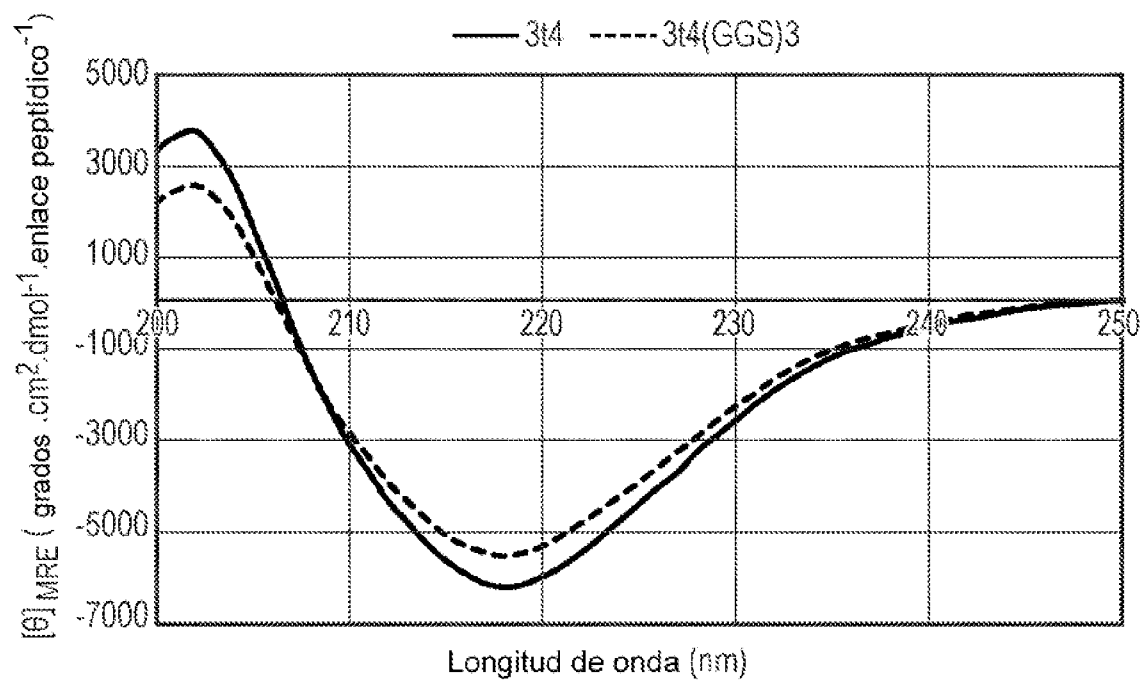


FIG. 6

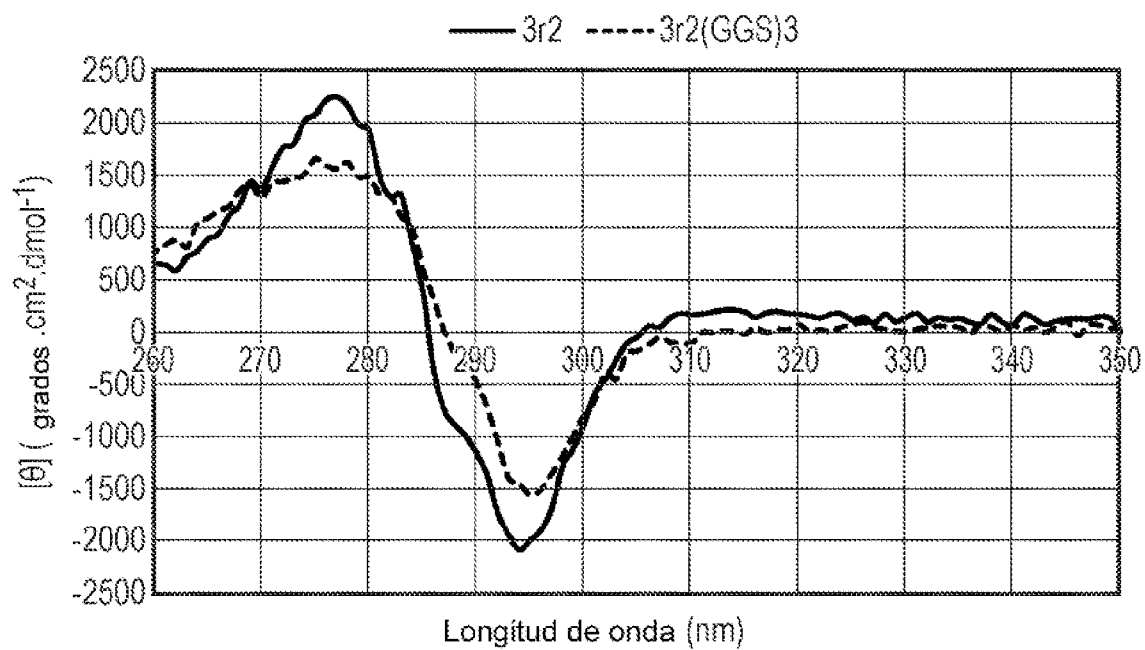


FIG. 7

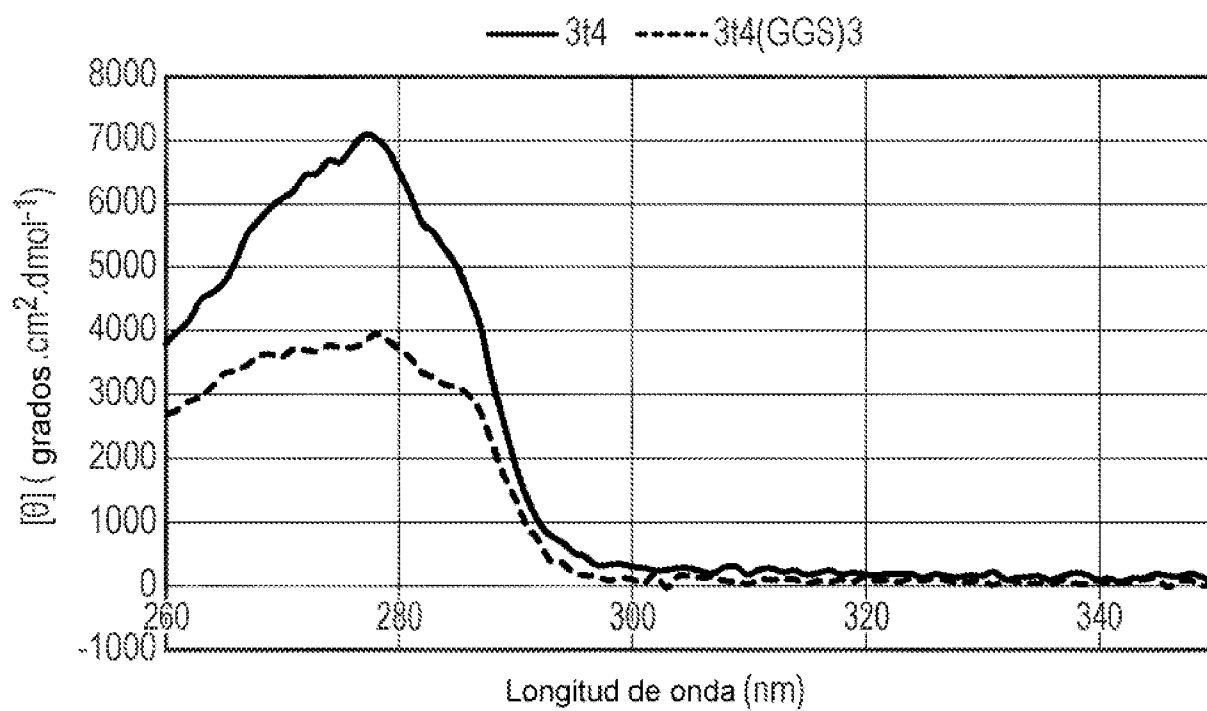


FIG. 8

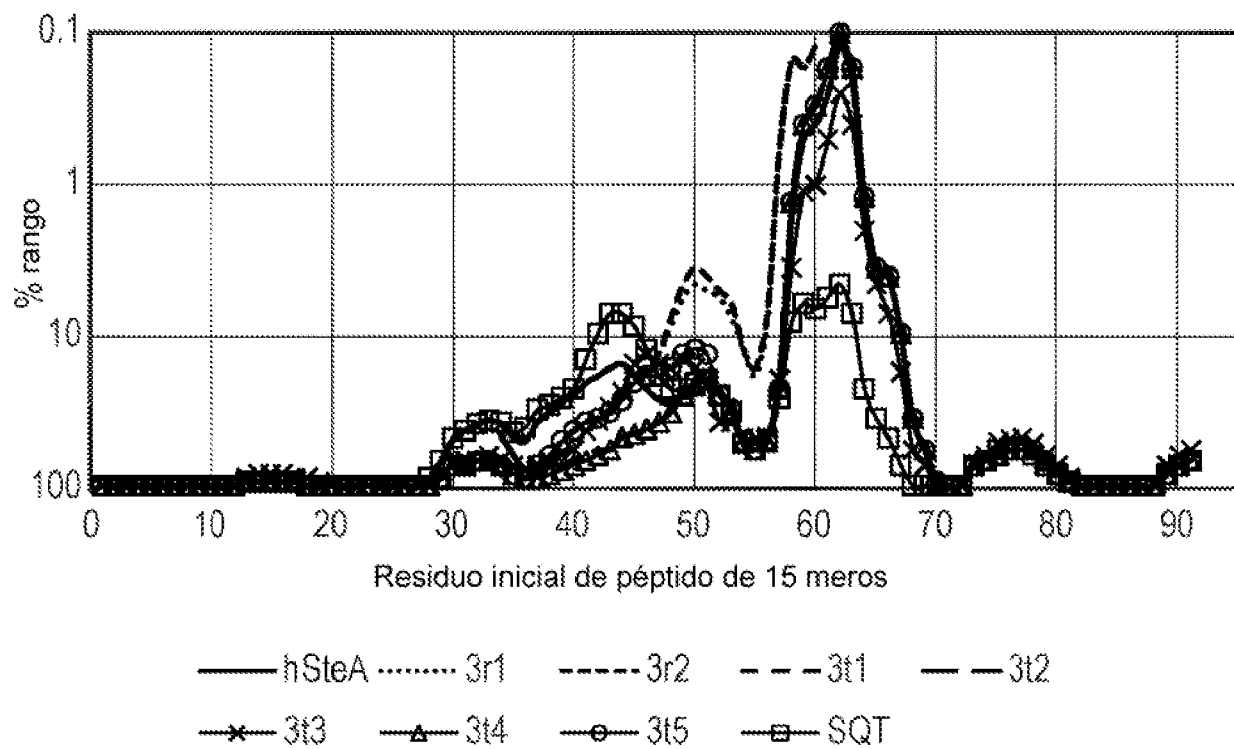


FIG. 9

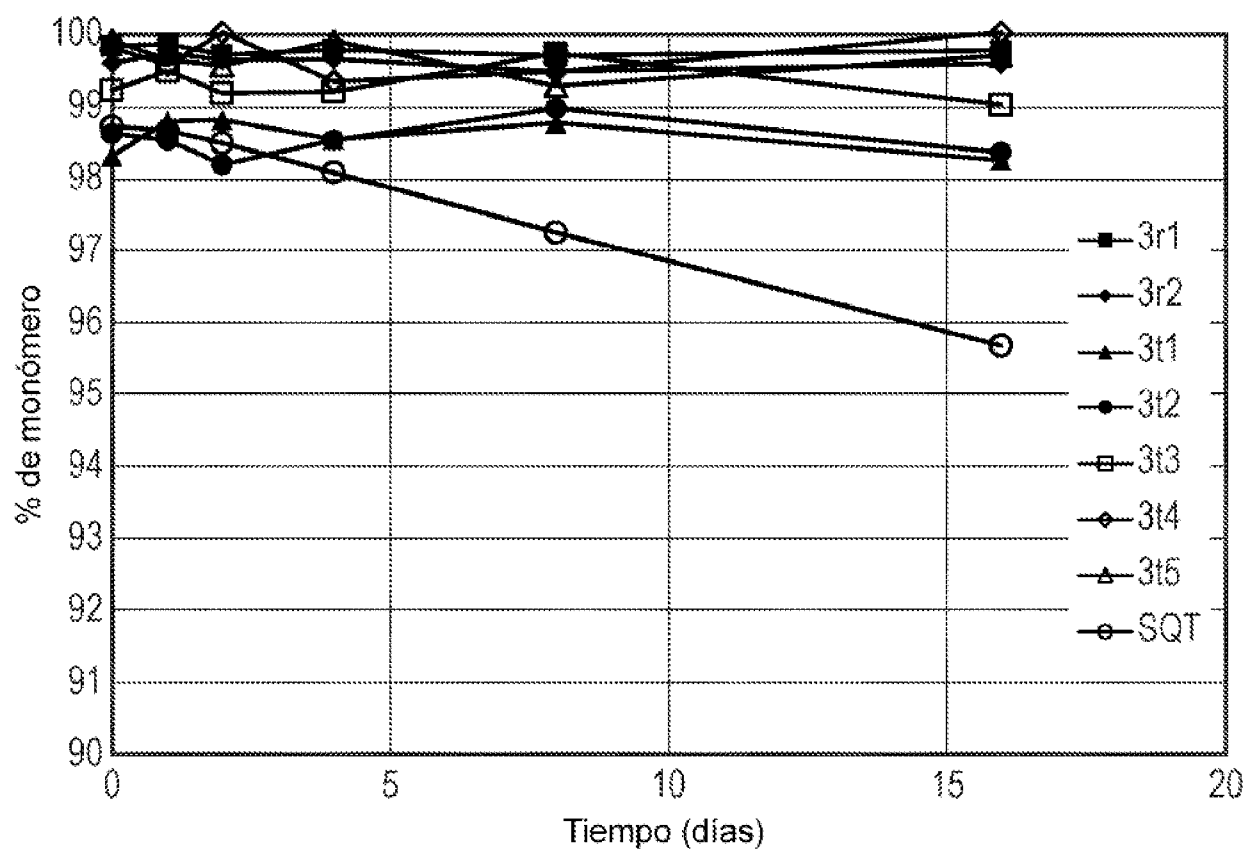


FIG. 10a

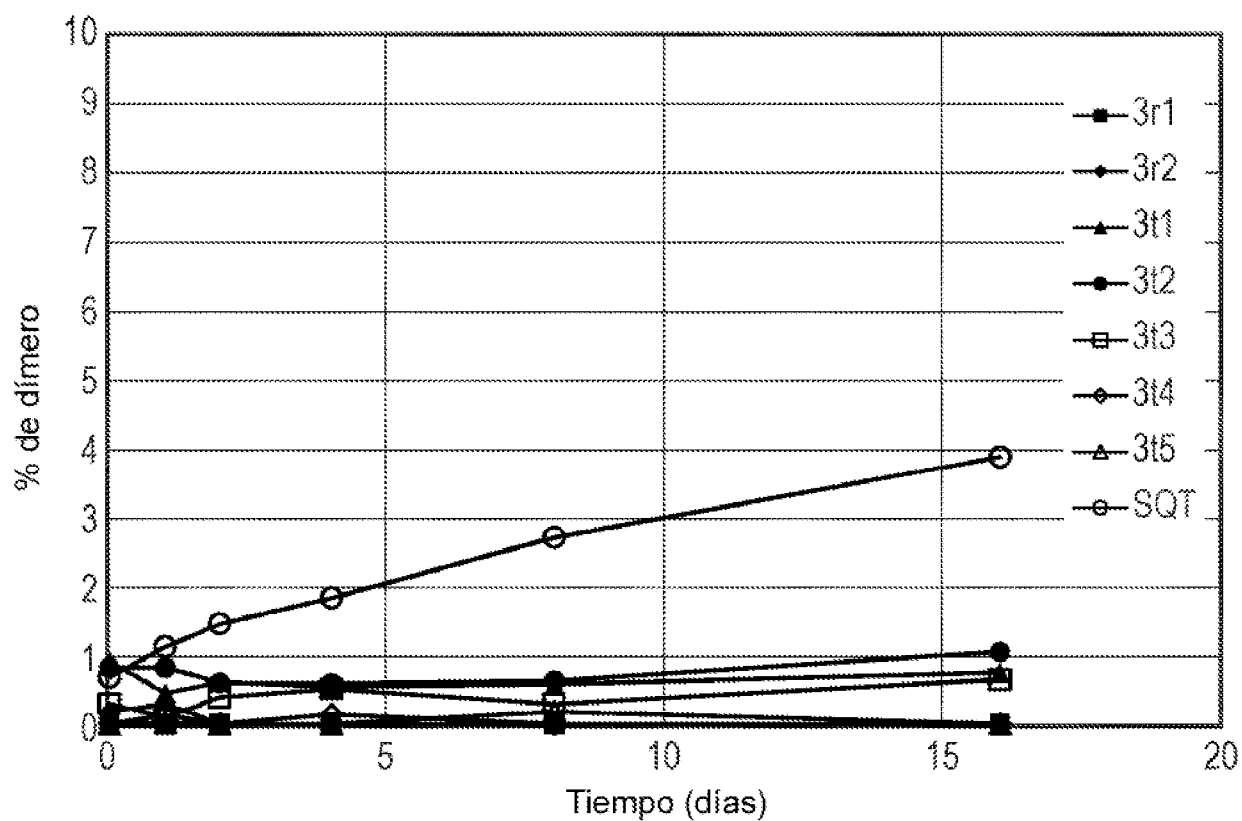


FIG. 10b

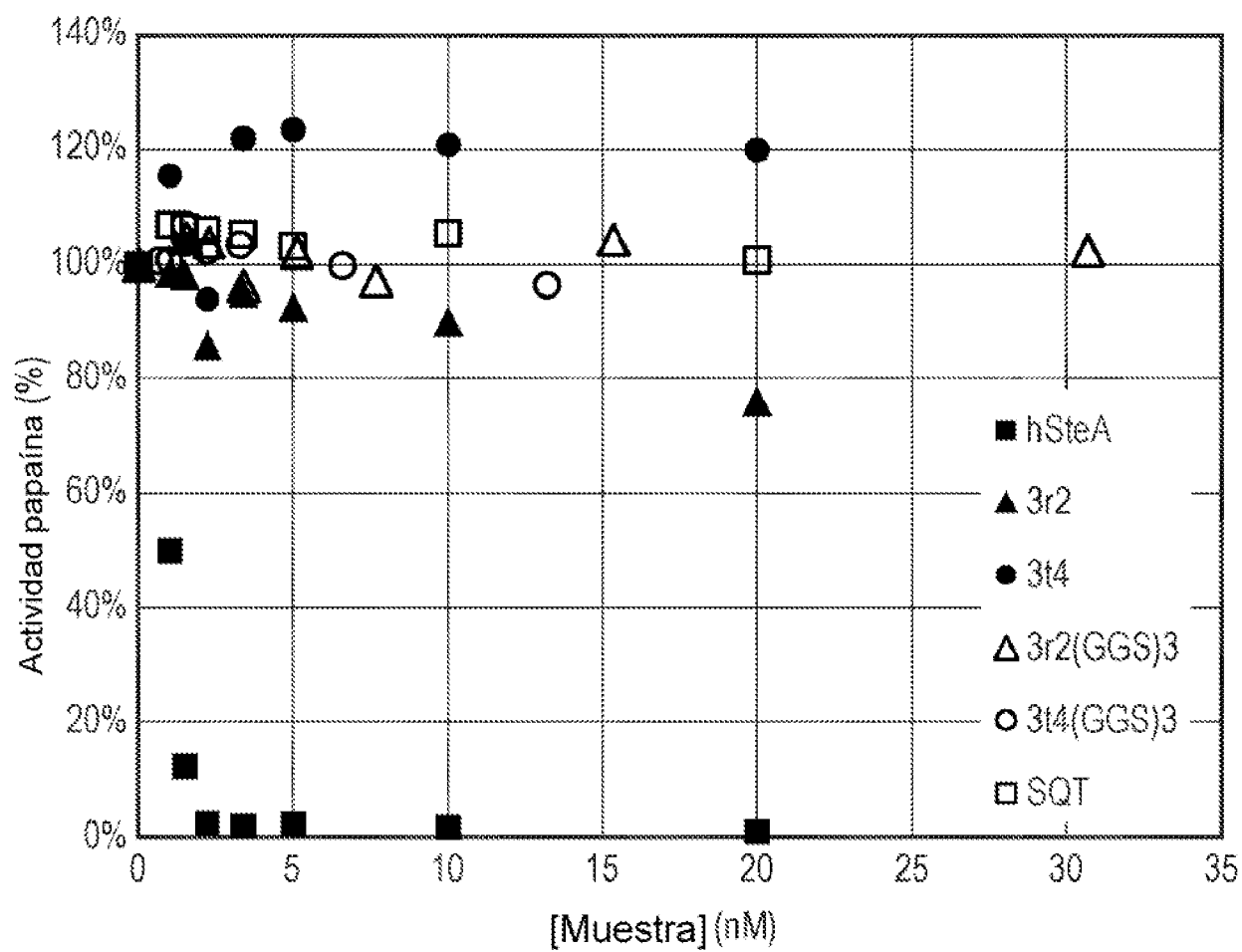


FIG. 11



ID de trabajo de Affimer	EGFR (FL1-A de QSH01)	mIgG2b (FL1-A de QSH03)	Fc de hIgG1 (FL1-A de QSH05)
PBS (BLANCO)	1774	1167	1230
PBS (BLANCO)	1734	1232	950
PBS (BLANCO)	1705.5	1156	1062.5
NEGATIVE - - HA (NEGATIVO)	1768.5	1265.5	974
NEGATIVE - - HA (NEGATIVO)	1667.5	1132	1025
NEGATIVE - - HA (NEGATIVO)	1666	1136	1100
NEGATIVE - - HA (NEGATIVO)	1637.5	1027.5	1228.5
MIGG2B G12 - HA (POSITIVO)	1813	158466	1095
MIGG2B G12 - HA (POSITIVO)	1772	155424.5	1094
MIGG2B G12 - HA (POSITIVO)	1679	118498.5	1003
MIGG2B G12 - HA (POSITIVO)	1668	134053	1162
00451_644628	1722	1235	963
00451_644620	1764	1110	1154
00451_644599	1817	1224	1055
00451_644624	1717	1081.5	1144
00451_644654	1642	1055	1154
00451_644622	1543	1213	1052
00451_644633	1785	1141	1062
00451_644617	1750	1087	998
00451_644605	1736	1183	1051.5
00451_644671	1536	1052	1219
00451_644607	1725	1188.5	1117.5
00451_644691	1779	1127.5	1130
00451_644614	1768	1216	1087
00451_644634	1718	1142	1128.5
00451_644657	1627	1093	1097
00451_644644	1687.5	1174	1070
00451_644696	1771	1101.5	1141
00451_644670	1620	1030	1086
00451_644668	1689	1104.5	1115
00451_644588	1726	1167	1267
00451_644695	1796.5	1221	1232
00451_644656	1766	1134	1022

①  
↓

FIG. 12

Ⓐ →

hPD-L2 (FL1-A de QSH06)	Her2 (R&D) (FL1-A de QSH08)	hPD-L1 (FL1-A de QSH10)	Trastuzumab (FL1-A de QSH11)	hlgG (FL1-A de QSH13)
1303	866	1413	1543	1076
1223.5	808	1220.5	1376.5	995.5
1240	882	1200	1529	904.5
1243	822	1287	1359	1076
1064	790	1121	1252	976.5
1220	801	1471.5	1551.5	1033
1105	718	1024.5	1472	1058
1140	868	980.5	1469	1084.5
1240	1053	1452.5	1446.5	1215.5
1181	866	1087.5	1448	1037
1264	1011	1297	1529	1091
1276	2452.5	1164	1458	977.5
1284	2398	1282	1400	1044
1280.5	2129.5	1132	1495	1000
1152	1962	1146	1373	931
1134	1864.5	1080	1222	1003
1208.5	1027.5	1265	1551	1019
1235	930	1098	1255.5	1089.5
1323.5	867.5	1108	1327	979
1170	950.5	1178.5	1359	1084
1057	931	1022	1319	1009
1275	785	1052	1103	962
1165	893	1057	1470	954
1103	868	1249	1470.5	1208
1310.5	858	1327	1477	1038
1117	759	1115	1280.5	1101
1217	864	1383.5	1453	1067
1260	820	1197.5	1255	1043
1066	865.5	1205.5	1381	989
1248	729	1186.5	1341.5	1074
1167	849	1210	1451	1074
1280.5	968.5	1323.5	1411	1089
1286	965.5	1499	1437	1060

← (A)

(2)  
↓

FIG. 12 (Continuación)

(B) →

Her2 (Sino) (FL1-A de QSH15)	Her3 (FL1-A de QSH16)	mPD-L1 (FL1-A de QSH18)	Control sin diana (FL1-A de QSH22)	Avastin (FL1-A de QSH23)
1046	1411	1164.5	1623	1213
748.5	1303	1181	1373	1149
926	1292	1177	1491	1143
678	1343	1202	1465	1027.5
717.5	1408	1178	1381	1154
874	1410.5	1182.5	1559	1019
879	1208	1104.5	1392.5	1091
872	1268	1058.5	1221	1170
940	1370	1002.5	1506	1140.5
973	1431.5	1041	1408	1158.5
1003	1423	1229.5	1402	987
102773.5	1435	1272.5	1442	1092
91635	1435	1087.5	1485	1221.5
86041	1274.5	1122	1544.5	1278
84281	1361.5	1057	1342	1223
82266	1225	1117	1372	1095
14155	1206.5	1155	1388	1173
13150.5	1292	1017	1359	1244
3728	1408	1105	1336	1103
3138	1330	1108	1493	1029
1550	1217.5	1114	1352.5	1100
1547.5	1400	1076	1513	1315.5
1518	1361	1013	1497.5	1363.5
1434.5	1275.5	1225	1479.5	1131.5
1399.5	1370	1167	1435.5	1062
1356.5	1308	1114	1372	1208
1348	1237.5	1057	1493	1123.5
1348	1324	1121	1502	1163.5
1340	1205.5	1035	1332	941.5
1337	1315.5	1187	1516.5	1155.5
1334	1430.5	1160	1588	1189
1324	1528	1218.5	1350.5	1108
1308	1305	1141	1594	1183

← (B)

(3)  
↓

FIG. 12 (Continuación)

(C) →

Humira (FL1-A de QSH25)	Rituximab (FL1-A de QSH26)	mPD-L2 (FL1-A de QSH27)	Her4 (FL1-A de QSH28)
990	2200	1242	1476.5
969	2059.5	1185.5	1397
926.5	1876.5	1181	1421
947.5	2073	1147.5	1254
863	1885	1119	1303
1014	2079	1074.5	1461
906	2005	1044	1375
853	2026.5	971	1311
996	2145	1177	1415
1039.5	2147	1149	1365
966	1998.5	1130	1462.5
963	2099.5	1099.5	1387.5
1108	2152	1001	1521
960	1975	1181	1345
1006	2023.5	1175.5	1404
968	1903	1081	1313.5
922.5	2046	1036	1466
985	1947	1111	1326.5
942	1979	1183	1291
989	2084	1181	1383
903.5	1929	1103	1283
896	2036	1059.5	1513
1052	2096.5	1224	1342
1044	2108	1119	1266.5
906	1984	1181	1406
855	2048.5	1183	1491
984	1971	1114	1332
981	2030	1197	1434
884	2032	996.5	1346
969	1939	1081	1293
1051	2005.5	1189	1418
861	2172	1273	1484.5
1004	2067	1212	1324

←C

④  
↓

FIG. 12 (Continuación)

↑  
①

00451_644719	1785	1130	1158
00451_644689	1663	1222	1057.5
00451_644631	1548	1244.5	1181
00451_644658	1693.5	1183.5	1022
00451_644717	1734	1172	1087
00451_644661	1753.5	1054.5	968.5
00451_644708	1780.5	1206.5	1172.5
00451_644655	1814	1155	1117
00451_644706	1626	993	1284
00451_644629	1763.5	1125	1116
00451_644619	1769.5	1122	1110
00451_644652	1643	1127	1041.5
00451_644609	1750	1179.5	1273
00451_644659	1729	1160.5	1099
00451_644703	1641.5	1061.5	939
00451_644660	1714	1121	1182
00451_644612	1733	1262	1021.5
00451_644667	1706	1261	983
00451_644653	1699	1132	959.5
00451_644645	1716	1139.5	1057.5
00451_644596	1830.5	1235	1103
00451_644643	1571	1009	990
00451_644697	1635.5	1127	1183.5
00451_644598	1690	1266	1121
00451_644707	1717	1269.5	1221
00451_644583	1708	1383.5	1237
00451_644714	1725	1151.5	1200
00451_644642	1693	1171	1150
00451_644621	1590	1153	1073
00451_644711	1615.5	961.5	1088
00451_644636	1644.5	1175	1158
00451_644632	1695	1113.5	1003.5
00451_644582	1830	1154	1173
00451_644722	1654	1179	1196
00451_644584	1736.5	1165	1100

⑤ ↓

FIG. 12 (Continuación)



		②			
	1149	876.5	1240	1382	1077.5
	1190	910	1141.5	1388	993
	1375	760	1115	1348	969
	1209.5	884	1224.5	1324	966.5
	1170	977	1159	1308.5	935.5
	1267	892	1151	1513.5	979.5
	1198	808	1130	1357	1056
	1238	907	1372.5	1222	1047
	1246	806	1162	1299	949
	1076.5	836	1322.5	1296	1139
	1063	830	1323	1248	997
	1218	917	1081	1210	981
	1053	876	1227	1513	1052
	1275	802	1300	1464	960
	1119	831	1039	1459.5	911.5
	1071	839	1095	1446	974
	1243	822	1078	1413	1061
	1127	923.5	1002	1388	1124
	1149	801	1042.5	1305	1012
	1079	795	1123	1434	1066.5
	1299.5	874	1262	1411	1019
	1100	736	983	1452.5	909
	1262	860.5	1036.5	1334.5	960
	1194	963	1282	1454	1026.5
	1310.5	995	1278.5	1296	1038.5
	1215.5	720.5	1196.5	1270	1000.5
	1225	885	989	1454.5	985
	1309	796	1097	1432	1058
	1229.5	1028	1275.5	1256	1100
	1095.5	831.5	1216	1319	915
	1339.5	857	1102.5	1524.5	1057
	1168.5	878	1079	1356	1000
	1397	1017	1413.5	1426	1170
	1206	864	1219	1306.5	976
	1301	982	1173	1534	1036
①		⑥		⑤	

FIG 12 (Continuación)

FIG. 12 (Continuación)

③

1284	1360.5	992.5	1315	1193
1272.5	1287	1109	1477.5	1187
1268	1384.5	1030	1451	1342
1263	1323	1103	1338	1036
1259	1429	1219	1395.5	1128
1251	1337	1276	1287.5	1176
1245.5	1510	1140	1587	1097
1238	1302.5	1194	1269.5	1113
1237	1162	1096.5	1393	965
1225.5	1467	1170.5	1407	1149
1219	1404.5	1224	1411	1181
1205	1224	1113	1264	969
1195.5	1421	1153	1396	1416
1177.5	1442.5	1286	1380.5	1073.5
1162.5	1280	1113.5	1477.5	1111
1141	1365	1003	1543.5	1067.5
1141	1464	1213	1451	1353
1128	1434	1117	1564	1110
1123.5	1211	1125	1318	1125
1086	1439	1070.5	1410	1171
1084	1456.5	1162	1652	1275
1084	1378	1004.5	1370	1198.5
1081.5	1409	1174.5	1478	1075
1077	1507	1230	1392	1179
1071	1422	1230.5	1470	1248
1068	1424	1280.5	1308	1159
1065	1392	1154	1590.5	1228.5
1052	1364	1206	1472	1076
1051	1445	1371	1435	1189
1049	1404	1168	1360.5	1000
1038	1357	1115	1470.5	1103
1036	1297	1205	1409	1039.5
1035	1470	1287	1411	1187
1030	1650	1289	1537	1233.5
1029	1399	1217.5	1415	1162

⑦

← (E)      (F) →

FIG. 12 (Continuación)

	↑ ④		
977.5	2038	1078	1310.5
969	1982	1146	1303.5
964	2036.5	1065	1425
1024	2136	981	1334.5
972	2070	1123.5	1391
958	2025	1144	1386
884.5	2077	1105	1403.5
801	2147.5	1136.5	1416
934	2086.5	1054.5	1314.5
1068	1964	1058.5	1294
972	1958	1110.5	1411
888	1924	1019	1440
1165	2105.5	1183.5	1240
903.5	2001	1053.5	1452.5
904	2105	957	1434.5
872	2057.5	1151	1362
961.5	2021	1217.5	1427
853.5	1950	1085	1368.5
882.5	1901	1060	1235.5
998	1927	1035.5	1286
1035	2172	1121.5	1461.5
922.5	1878	1138	1308.5
897	1992	1030	1329.5
927.5	2019.5	1134	1478
942	2105.5	1130	1573
967.5	2089	1075	1424
1004	1812.5	1275.5	1396.5
974.5	1950.5	1112.5	1335
950	2071	1148	1404
963	1976	1105	1367
950	1922	1073	1316
957	2159	1094	1440
954	2027	1232	1504
1058.5	2024	1405	1237
956	2086	1179	1407
←ⓕ	⑧ ↓		

FIG. 12 (Continuación)



↑  
⑤

00451_644680	1976	1310	1095
00451_644724	1720	1272.5	1246
00451_644716	1761	1069.5	1079
00451_644641	1730	1200	986
00451_644692	1842	1135	1221
00451_644682	1804	1218	1130
00451_644712	1752	1163	1130
00451_644587	1836	1170.5	1309.5
00451_644597	1846	1216	1148
00451_644713	1867.5	1239.5	1191.5
00451_644585	1577	1073	1349.5
00451_644592	1726	1187	1211
00451_644603	1604	1078	1027
00451_644646	1604.5	1109	1104.5
00451_644580	1824	1303	1133
00451_644581	1857	1221	1197
00451_644702	1736	1227	1018
00451_644677	1848	1383	1222
00451_644594	1829	1112	1165.5
00451_644630	1631	1074	1041
00451_644676	1725	1244	1160
00451_644684	1644	1200	1186
00451_644673	1523	1073	958.5
00451_644593	1678	1302	1065
PBS (BLANK)	1939	1294	1143
00451_644611	1749	1232	1210
00451_644613	1709	1172	1058.5
00451_644710	1639	1203	1124
00451_644674	1663.5	1173.5	1017
00451_644726	1670	1108	1202.5
00451_644600	1723	1222	1052
00451_644690	1638.5	1173	1138
00451_644693	1599	1163	1093
00451_644627	1490	1144.5	1243.5
00451_644586	1749	1323	1155.5

⑨

FIG. 12 (Continuación)

Ⓞ→

		6			
	1280.5	793	1257	1217.5	1119
	1249	885	1265	1157	1016
	1207	895	1391	1211	973
	1166.5	823.5	1450	1245	1016
	1240	735.5	1151	1227	1074
	1266	753	1214	1367.5	1101
	1359.5	914	1310.5	1446.5	1148
	1240	984	1316	1265	1097
	1151	927	1202	1248	1020
	1343	906	1275	1367	1068
	1014	956	1019	1377	1031
	1305	1002	1364	1413	1073.5
	1221	875.5	1282.5	1154	1050
	1041	860	1504	1181	1047
	1295	825.5	996.5	1488.5	1127
	1192	887	1290.5	1501	1060.5
	1246	775.5	1295.5	1343.5	969
	1242	913.5	1362	1287.5	1082.5
	1203	821.5	1002	1437	958
	1047	790	1119	1245.5	960.5
	1265	999.5	1241	1577	1003
	1247	1008.5	1334.5	1397	1041
	1154	795	950	1251.5	971
	1238	945.5	1354	1404.5	1085
	1200	810	1139	1187.5	963
	1343	884	1334	1362	1039
	1138.5	868	1025	1359	944
	1176	1014	1074	1315	954
	1194	782	1183	1400.5	953.5
	1221	892	1299.5	1369.5	1095
	1194	890.5	1127	1319	1158
	1357	880.5	1244.5	1178.5	1125
	1332	926.5	1093	1321	1082
	1109	1005	1143.5	1333.5	1035
	1281	876.5	1195.5	1414	1086
G		10			H

FIG. 12 (Continuación)

	1028	1364	1270.5	1489	1073.5
	1025.5	1421.5	1222	1519.5	1011.5
	1020	1295.5	1157	1539	1213.5
	1012.5	1346	1199	1547	1128.5
	1012	1577	1178	1372	1283
	1003	1551	1225.5	1403.5	1135
	1003	1426	1206.5	1426	1132.5
	995	1387.5	1280	1513	1129
	991	1243	1114	1230	1136
	987	1361.5	1215.5	1453	1087
	986	1403	1186	1400	1109
	985	1352.5	1128.5	1543	1138
	985	1384.5	1197	1184	969.5
	984.5	1357	1113	1344.5	1081
	983.5	1491.5	1124	1526.5	1147.5
	981	1293.5	1065	1488	1211
	980.5	1381	1170	1430	1092
	974	1432	1185	1594	1098.5
	973.5	1279.5	1305	1358.5	1149.5
	973	1363.5	1133.5	1311	1101
	969.5	1446	1254	1383	1203
	968	1340.5	1241	1606	1268.5
	967	1283	1061	1330	1021
	966	1368	1041	1453	1141
	963	1343	1262	1520.5	1216
	960	1439	1205.5	1409.5	971.5
	954	1361.5	1189	1429.5	1117
	953	1334	1001	1285.5	1154
	950	1238	1027	1383	1172
	947	1278	1116	1470	1130
	945	1389	1251.5	1521.5	1078
	944.5	1292	1316	1396	1362
	941	1504	1187	1543	1224
	940	1252.5	1138	1332.5	1224.5
	939.5	1498.5	988.5	1324	1187.5

⑧

1016	2116	1103	1456
871	2112	1136	1531.5
1089	1925	1144	1411
1011	2010.5	1117	1415
1019.5	1991.5	1084	1561
1039	1995	1025	1528
957	2162	1258	1339
1018.5	1935	1027	1379.5
990	1945	1068	1307.5
971	2079.5	1133	1448
1007.5	2025	1068	1480.5
1017.5	1997.5	1093	1429
832	1854	969	1383
952.5	2040	1076	1210
1122	2102.5	1292	1489
971	2110.5	1095	1483
995.5	2115	1197.5	1290.5
995.5	2086.5	1150.5	1448
1069	2173	1186	1397
952	2000	990	1531
904	1949	1045	1434
1065	2013.5	1052	1415
963	1889	1108	1413
937	1923	1167	1424.5
1028	1987	1224.5	1367
1086	2082.5	1273	1437
890	2061.5	1051.5	1385
1007	2021.5	1177	1427
980.5	2054	1043	1434
930.5	1972.5	1122	1454
949	2068	1076	1348
1077	2060	1125.5	1394
897.5	2173	1130	1553
920	2078	1195	1357
934	2066.5	1260	1519

①

⑫

FIG. 12 (Continuación)

⑨

00451_644648	1739	1155	1114
00451_644669	1823	1081	1054
00451_644705	1765	1058	1082
00451_644604	1701	1270	1184
00451_644679	1848	1458	1144
00451_644675	1707	1152	1251
00451_644623	1809	1136	1037.5
00451_644595	1677	1186.5	1139.5
00451_644625	1596	1159.5	1144
00451_644681	1767	1183	1193
00451_644683	1833	1070	1139.5
00451_644601	1783.5	1046.5	1117
00451_644694	1908	1108	1275.5
00451_644678	1817	1108.5	1174
00451_644704	1896	1158.5	1100
00451_644649	1656	1131.5	1206
00451_644608	1809	1136	1139.5
00451_644718	1811	1098	971
00451_644637	1722	1294	1099.5
00451_644615	1747	1227	1044
00451_644699	1671.5	1161	1035.5
00451_644626	1501	1101.5	1184
00451_644639	1531.5	1170	1046
00451_644701	1734	1159	1132
00451_644723	1691	1273	1175.5
00451_644610	1812	1216	1215
00451_644647	1737.5	1041	1077
00451_644618	1817.5	1056	1079
00451_644727	1761	1270	1031
00451_644662	1583	1150.5	1052
00451_644638	1763	1100	1070.5
00451_644698	1704	1173	1213
00451_644709	1792	1103	1023.5
00451_644602	1702.5	1121	1159

⑬

FIG. 12 (Continuación)

⑪

FIG. 12 (Continuación)

	938.5	1373	1065	1328
	938	1348.5	1132	1479
	935.5	1286	1106	1265
	930.5	1423	1099	1398.5
	925	1470.5	1395	1487.5
	922	1338	1300	1162
	921.5	1454.5	960	1445
	920	1313	1171	1421
	919	1337	1159.5	1300
	915	1302.5	1182.5	1515.5
	912	1329	1248.5	1534
	911.5	1318	1036.5	1443
	904.5	1477.5	1016	1329
	904	1353.5	937	1456
	904	1446	1235.5	1451
	903.5	1382.5	1045	1259
	901.5	1462	1093	1488.5
	901	1262	1144	1388
	888.5	1255	1114.5	1227.5
	885	1275.5	1176	1317
	878	1421	1194	1415
	871.5	1378.5	1235	1515
	868	1329	1140	1320
	867.5	1389.5	1216	1329
	860	1434	1043.5	1305
	857	1356	1368.5	1360
	853	1279.5	1092	1354
	849	1265	1117	1463.5
	848	1308	1292	1461
	847	1310.5	1005.5	1381
	845.5	1329	1262	1411
	839	1405	1056	1448
	837	1366.5	1187	1318
	837	1272	1198.5	1363
	833.5	1479	1122	1504

FIG. 12 (Continuación)

↑  
⑫

892	1954	950	1305
1074	1976	1113.5	1262
880	1880.5	1185.5	1367
893	2094	1145.5	1424
1037	2254	1181	1446
956	1927	1164	1374.5
1149	1996	1176	1384
1019	1933	1090	1308
928	2078.5	1220	1351
915	1973	1035	1434
1006	2076	1357	1427.5
915	2059	996	1366
1006	2055	1163	1330
974	2005	1010	1399
955	2079	1176	1555
895.5	1967	1168.5	1456
952	2059	1184	1507.5
1024	2132	1165	1435
964.5	2022	1227	1446
907	2097	1200	1402
979	2008.5	1026.5	1310
926.5	2102	1105.5	1424
950	1908	1028	1234
1003	2009	1105	1342
1012	2087	1110.5	1238
902	1962	1213.5	1447
963	1900.5	1057	1217
959	1924.5	1073	1457.5
891.5	1989	1152	1356.5
1008	1777	963.5	1349
901	1979	1039	1388
930	1998	1219	1391
974	1821.5	1060	1204
963	2016	1209	1334
934	2148	1217.5	1446.5

← ⑬

↑  
⑮

FIG. 12 (Continuación)



↑  
13

00451_644700	1600	1249	1239
00451_644606	1617	1162	1107
00451_644728	1777	1198	1065
00451_644635	1702	1109	1022
00451_644688	1752.5	1263	1167
00451_644616	1774	1182.5	1043.5
00451_644725	1837.5	1122	1200
00451_644663	1677	1108	1081.5
00451_644650	1795	1148	1052
00451_644640	1612	1206	1144.5
00451_644720	1785	1167	1073
00451_644651	1634	1188.5	1182
00451_644672	1617	1210.5	963
00451_644721	1648	1130.5	950
00451_644715	1625	1081	1101

FIG. 12 (Continuación)

Ⓜ→

↑  
⑭

1227	788	1235	1466	979
1252	913	1235	1214	1025
1154	923	1381	1391	1011
1070.5	863	927	1402.5	1017
1164.5	769.5	1184	1235	1020
1222	855	1117	1223.5	1047.5
1283.5	912	1086	1520	1122.5
1364	933	1233	1370	1097
1128	1021	990.5	1505.5	892.5
1232.5	818	1243	1356.5	952
1280	789	1238	1380	1157
1256	938.5	1165	1499	807
1136	833.5	1030.5	1340	988
1098	782	1183	1308.5	1033
1258.5	778.5	1203.5	1434	937

← M

FIG. 12 (Continuación)

N →

↑  
⑮

833.5	1479	1122	1504	1106
830	1407.5	1198	1376.5	1218
830	1386	1284	1510	1216
824	1375	1080	1486.5	1183.5
823	1434	1022	1351	1216
816	1397.5	1095	1432	1127.5
811	1361	1171	1477	1170
810	1460	1124	1410	1047.5
792	1318	1215	1397	1083
781	1347.5	1200	1466.5	1030
778.5	1349	1039	1422	1197.5
757	1204	981	1377	1087
753	1417	1124	1402	1135
740.5	1429	1106	1429	1033.5
669	1390	995	1457.5	1205



FIG. 12 (Continuación)



16

934	2148	1217.5	1446.5
785	1955	1103	1373
910	1936.5	1056	1380
962	1995	962	1310
963	1928	1210	1475
875.5	2065.5	1168	1393.5
1000	2071	1144.5	1442
920	2009.5	1138	1175.5
833	1939	998	1372.5
829.5	1966	1169	1536
893	1955	1106	1421
930	1965	1031.5	1288
837.5	1925	1008	1221
1043	2017	1089.5	1278.5
855	1906	1116	1371.5

17

FIG. 12 (Continuación)

ID de trabajo de Affimer	EGFR (FL1-A de QSH01)	mIgG2b (FL1-A de QSH03)	Fc de hIgG1 (FL1-A de QSH05)
00453_644900	1857.5	1053.5	1830.5
00453_644808	1639.5	1022	1091.5
00453_645051	1630	1108	1086.5
00453_644819	1652	1198.5	1213
00453_644802	1671	1029	1179.5
00453_644873	1556	1036.5	1052
00453_644769	1736	1245	1065.5
00453_644869	1620	1086	1011.5
00453_644810	1796	1164	1482
00453_644809	1541.5	1119	1032.5
00453_644888	1704	1099.5	1448
00453_645069	1623	1230	1319.5
00453_644803	1743.5	1135	1416
00453_644823	1715.5	1044	1130
00453_644864	1675.5	1078	1295
00453_644924	1734	1272	1689
00453_645089	1809	1071	1466
00453_644861	1691	1106	1146
00453_644824	1548	1099	1064.5
00453_644919	1683	982.5	1205.5
00453_645036	1712	1136.5	1136
00453_644833	1672	1159.5	1151
00453_644851	1737.5	993	1454.5
00453_644926	1936	1216	1698.5
00453_645085	1679.5	1122	1213
00453_645010	1842	1123.5	1710
00453_644825	1796	1206.5	1248
00453_644912	1648.5	1793	1091
00453_644844	1878	1147	1240
00453_645033	1739	1033	1335
00453_644772	1690	1098	1239
00453_644751	1842.5	1093	1284
00453_644832	1752	1071	1221



FIG. 13



hPD-L2 (FL1-A de QSH06)	Her2 (R&D) (FL1-A de QSH08)	hPD-L1 (FL1-A de QSH10)	Trastuzumab (FL1-A de QSH11)	hIgG (FL1-A de QSH13)
1736.5	882	1163	180145	1255.5
1211.5	769	1144	175577	1054
1119	783	1178	167951	1021
1210.5	852.5	1230	163608.5	1100
1208	884.5	1035	161481	1078
1186	863	1035	150133.5	985.5
1151.5	883	1357	133402.5	971
1134	863	1148	123517.5	868
1423	828.5	1217.5	113116	1004
1109	802	1206.5	108140	925
1383	723	1138.5	106234	1073
1433	872	1214	98995	1089
1411	862.5	1362	98358	1140
1202	905.5	928	97128	1146
1219	812	1111	84553.5	967
1508	801.5	1250.5	83304	1035
1470	760	1105	78338	1022
1178	721.5	1177	77833	1068
1178	823	1078.5	77752	1020
1160	802	1143	75438	960
1163	768.5	1217.5	74310.5	995
1259	687	1153	70321	1004
1337	778.5	1163.5	68725	1011
1536	1022	1424	68205	1206
1227	919	1328.5	64471	968
1337	763	1264	63598	1071
1161	935.5	1335.5	63035.5	1063
1171.5	804	1003	61262	1000
1227	695	1027	59343	988
1456	750	1152	50967	1227
1278	787.5	1372	48521.5	982.5
1216	811	1232	44657	1140
1299	1001	1062	43627	992

← (A)

(2)  
↓

FIG. 13 (Continuación)

(E) →

Her2 (Sino) (FL1-A de QSH15)	Her3 (FL1-A de QSH16)	mPD-L1 (FL1-A de QSH18)	Control sin diana (FL1-A de QSH22)	Avastin (FL1-A de QSH23)
728	1502.5	1364	1387	1574.5
861	1324	1079	1425	1132
748	1485.5	1092	1444	1162
861	1427	1136.5	1580	1212.5
893	1418	1006	1437	1202
785	1253.5	1145	1531	1101
846.5	2106	1170	1512	1121
849	1334	1080.5	1349	1012
927	1423.5	1268	1362	1415
885	1354	1025.5	1400	1025
842	1351.5	1046.5	1216	1421
887	1346.5	1151.5	1405	1442
834	1452	1161.5	1373	1418
868	1271.5	1033.5	1307	1140
718	1265	1060	1326	1345
884.5	1547	1308	1483	1515
922	1365	1214.5	1435.5	1402
793	1293	1144	1402.5	1090.5
842	1265	1077.5	1415	1141
969	1330	1138	1329.5	1211
920	1459	1148	1392	1136
802	1387	1135	1461	1171.5
839.5	1329	1315.5	1287	1340
876	1591	1524	1469	1795.5
752	1349	1256	1391.5	1346
857	1521	1443	1507	1646
927	1433	1157	1546	1175
723	1380	1095	1237	1067
861.5	1453	1077.5	1421	1118.5
817	1363.5	1233	1351	1360
729	1431	1205	1503	1265.5
903	1378	1221	1492	1267
820	1321	1140	1395	1241

←B

③  
↓

FIG. 13 (Continuación)

C→

Humira (FL1-A de QSH25)	Rituximab (FL1-A de QSH26)	mPD-L2 (FL1-A de QSH27)	Her4 (FL1-A de QSH28)
1639	2222	1586	1332
1009	1949	1189.5	1394
1017	1970	1227	1357
1041	2014	1233.5	1304.5
1016	1839	1192	1408
1019	1912.5	1075.5	1255.5
1132	1970.5	1642	1492.5
853	2048	1197	1330
1278	2057	1310	1357
1052.5	1925	1052	1303
1353.5	1987	1152.5	1245
1168	1978.5	1138	1343
1291	2129	1289	1396
901	1912	1236	1295
1227	1954	1141	1461
1454	2035	1251.5	1493
1488	2075.5	1194	1256.5
901	1857	1070	1384
884.5	2027	1006	1305
1113	1943.5	1060	1303
995	1995	1171	1334.5
1052	1925	1290.5	1370
1130	2143.5	1304	1443.5
1722.5	2115.5	1526	1379.5
1208	2033	1290.5	1418
1574	2050	1411	1292
1071	1987	1237.5	1375
952	1808	963	1184
1121	1998.5	1229.5	1432
1315	2110	1127	1355
1181	2024	1216	1304
1238	1993	1225	1264.5
1095	2136.5	1272	1351

←C

④  
↓

FIG. 13 (Continuación)



↑  
①

00453_644874	1760	1141	1243.5
00453_644887	1642	996	1122
00453_644921	1809	1241	1553.5
00453_645038	1717	1078	1561
00453_645035	1802.5	1148	1596
00453_645041	1746.5	1204	1480.5
00453_645030	1713	1057	1112
00453_644904	1737	995	1506.5
00453_644798	1793	1120	1259
00453_644753	1720	1221	986
00453_644891	1866	1159.5	1877.5
00453_644886	1770	1117	1539
00453_644853	1803	1066	1030
00453_644977	1599	1058	1393.5
00453_644777	1708	1091	1081
00453_644797	1629.5	1205	1020.5
00453_645111	1629	999	1108
00453_644754	1737.5	1224	1417
00453_644760	1580	1127	1563
00453_645094	1860	1117	1736
00453_644838	1856	1084	1508
00453_644781	1618	1059	1078
00453_644759	1652.5	1114	1084
00453_644868	1469	1012	1257
00453_644792	1645.5	1073.5	1518
00453_644991	1692	1047	1419.5
00453_644880	1801	1074	1752.5
00453_644764	1772	1191	1590
00453_644848	1844	1103	1529
00453_645043	1614	1030	1088.5
00453_644987	1788.5	1016	1689.5
00453_644997	1677.5	1165	1261
00453_644950	1739	1111	1367

⑤  
↓

FIG. 13 (Continuación)

④ →

②

1453	877	1302	41091.5	1019.5
1206.5	810	1102.5	35642	1012
1369	929	1148	34638	1167.5
1507	855	1386	32862.5	1124
1365.5	788.5	1119	28013	1119.5
1327	887	1091	24984.5	1009
1205	837.5	1093	23350	1012
1489	806	1431	22227	1128
1290	710	1070.5	19871	1089
1323.5	862.5	1073	19301	1001.5
1747	826.5	1273.5	18955.5	1152.5
1519.5	786.5	1218	18790	1074.5
1291	910.5	1210	18587.5	1036
1202.5	657	1213.5	17713	964.5
1227	906.5	1318	17648	1006
1221.5	922	1189	17306	953
1096.5	763	1090	16978	1011
1335.5	780	1248.5	16454	1147
1429	890	1213	16277	1071
1690	798.5	1207	16163	1236
1552.5	886	1231	15900	1148
1210	806	904	15468	1020.5
1152.5	849.5	1213.5	15110	1028
1214.5	777	1181.5	14888	1051.5
1399	863	1229	14886	1044
1359	777	1082.5	14746	931
1600	841	1222	14666.5	1011
1593	868	1440	14637	1177
1364	739	1288	14554	1132
1152	829.5	1073	14458.5	1003
1696	775	1249.5	14342	1093
1086	732.5	1287.5	14283	1132
1434	867	1244	14058.5	1168

← ①

⑥ ↓

FIG. 13 (Continuación)

⑤ →

③

761	1333	1251	1440	1310.5
853	1445.5	1210	1524	1246
984.5	1609	1288	1574.5	1499
847	1399	1316.5	1472	1571
702	1420	1266	1570.5	1588
785	1413	1303.5	1407	1316
780	1363	1113.5	1356.5	1284
824	1419.5	1233.5	1415	1536
755	1302.5	1063	1399.5	1264
720	1286	1096.5	1450	1097
880	1429	1253.5	1388	1806
979	1410	1324	1440	1605.5
857	1354	1069.5	1467	1057.5
960.5	1363	1040	1360.5	1294
973	1402	1001	1432	1189.5
841.5	1362	1167	1397	1045.5
850	1342.5	1138	1438	1011.5
888	1405	1318	1372.5	1311
888	1421	1212	1516	1374
874	1523	1542	1491	1782
778.5	1408	1302.5	1395.5	1497
783.5	1356	1189	1420.5	1235
909	1210	1019.5	1472	1139
904.5	1218	1045.5	1295	1169
831	1295.5	1295	1410	1448
774.5	1248.5	1131.5	1353.5	1343
661	1452	1322	1244	1484
833	1370	1383	1430.5	1666
833	1424	1327	1440	1475
742	1290	1122	1408	1086
883.5	1311	1435	1450	1564
726	1371	1025	1349	1180
851	1308.5	1335	1316	1451.5

←(E)

⑦

FIG. 13 (Continuación)

(F)→

④

1373	2079.5	1401.5	1428
1078	2017	1208	1348
1512	2198	1780	1534
1436	2021	1310	1533.5
1513	2104.5	1365.5	1431
1248.5	2086.5	1343	1437.5
980	1933	1020	1346
1446	2230	1410	1494
1183	1965	1160.5	1278
990	2034.5	1016	1295
1793	2176	1300	1515.5
1528	2000.5	1342	1388
967	2052.5	1223.5	1348
1178.5	1938	1096.5	1240.5
904	2038	1157	1360
989	2043	1189	1367
878.5	1828	1195	1359
1321	2119.5	1290	1446
1531.5	2078	1309	1245
1664	2081	1539.5	1564
1529	2081	1505	1503
965.5	2042.5	974	1337
1049	1896	1097	1337
1046	1947.5	1197.5	1343.5
1502	2053	1216	1259
1385	1944	1256.5	1362
1431	2034	1308	1327
1755	2083	1474	1357
1522.5	2117.5	1391.5	1408
907	1847	1065	1212
1661	2205	1435	1305
1078.5	2068	1081	1303
1291	1956	1273	1310.5

← (F)

⑧

FIG. 13 (Continuación)

⑤

00453_645057	1723	1147.5	1010.5
00453_645048	1645	1221	938
00453_644892	1647.5	1113	1057
00453_645037	1661	1113.5	962
00453_644938	1916	1125	1745
00453_644925	1708	1157	1145
00453_644915	1672	1107	1195

FIG. 13 (Continuación)

Ⓔ

⑥

1140.5	769.5	1114	13990	809
1196	968	1218	13418	1121
1125	725	1052	13267	1002
1229	859	1232.5	12368.5	1012
1594	834	1299	12235	1195.5
1173.5	782	1216	11288.5	1060
1406	835	1089	3170.5	1040.5

←G

FIG. 13 (Continuación)

H→

7

920	1337.5	1114	1301	1124
664	1308.5	1154.5	1390	1235
892	1219.5	1133	1406	1074
892	1377	1079.5	1411	1101.5
847	1439.5	1291	1432	1543
807	1305	1139.5	1494	1219
807	1413	1292	1297	1268

H

FIG. 13 (Continuación)

I

↑  
⑧

946	2060	1023.5	1337
1070	2108	1095	1297
873.5	2087	1353	1335
975	1963	1014	1359
1694.5	2101	1287	1432
1004	2140	1241	1402
1208	2031.5	1252	1283.5

←  
①

FIG. 13 (Continuación)



ID de trabajo de Affimer	EGFR (FL1-A de QSH01)	mIgG2b (FL1-A de QSH03)	Fc de hIgG1 (FL1-A de QSH05)
PBS (BLANCO)	1630.5	1071	1111
PBS (BLANCO)	1710.5	1084	903
PBS (BLANCO)	1554.5	1078	1044
PBS (BLANCO)	1543	992	1043
PBS (BLANCO)	1621	1051	1093
PBS (BLANCO)	1697	1055	1000.5
NEGATIVE - - HA (NEGATIVO)	1656	1101	1089
NEGATIVE - - HA (NEGATIVO)	1628	996	971
NEGATIVE - - HA (NEGATIVO)	1643.5	1116	1118
NEGATIVE - - HA (NEGATIVO)	1640	1130	1144
NEGATIVE - - HA (NEGATIVO)	1598.5	1055	1007
NEGATIVE - - HA (NEGATIVO)	1664	1163	1049
ZIKA NS1 C12 ( ) - HA (POSITIVO)	1663	54687	1014
ZIKA NS1 C12 ( ) - HA (POSITIVO)	1588	55225	1158.5
ZIKA NS1 C12 ( ) - HA (POSITIVO)	1766	43772.5	1031
ZIKA NS1 C12 ( ) - HA (POSITIVO)	1736	45644	1063
ZIKA NS1 C12 ( ) - HA (POSITIVO)	1658	52196	1033.5
ZIKA NS1 C12 ( ) - HA (POSITIVO)	1734	41868	1143
00454_645193	1785	1090	1137
00454_645325	1648	1120.5	1001
00454_645324	1701	1190	1101
00454_645296	18689	1211	108570
00454_645277	1616	1097	1030
00454_645140	17415.5	1071	79251
00454_645250	14422	1168.5	73151
00454_645222	1621	1020	1109
00454_645156	1726	1059	1176
00454_645174	1528	1100	1163.5
00454_645178	1607	1219	1124.5
00454_645271	1737	1265	1160
00454_645234	1593	1092	1177
00454_645290	1725	1019	1202
00454_645304	1724.5	1089	1167

①

FIG. 14

A →

hPD-L2 (FL1-A de QSH06)	Her2 (R&D) (FL1-A de QSH08)	hPD-L1 (FL1-A de QSH10)	Trastuzumab (FL1-A de QSH11)	hIgG (FL1-A de QSH13)
1089	820	1343	1206	996
1094.5	830	1047	1359	928
1132	783	1062	1391	884.5
1122	811	1087	1367	1006
1079	810	1117	1361	920
1088.5	863	1148	1298.5	951
1085	957.5	990	1402	1015
1062	861	1014	1379.5	973
1181	745	1048	1246	963.5
1147	909	1135	1254	976
1215	833.5	1152	1310.5	1026
1132.5	850	1207.5	1431	1041
1062	825	1034.5	1381	1009
1192.5	814	1028	1500.5	960.5
1152	766	1052	1471	1038
1187	781.5	1063	1356.5	1041
1133	887	1082	1262	987
1127	969	1235	1426	1082
1349	1004.5	29696	1539	1128
1264	974	23210	1411	1079
1287	1046.5	22917.5	1504	1237
54516.5	1536.5	16156	139013	20297
1166	855	15552	1272	1004
43622	1201.5	14844	114642	16430
36800	1464	14150	105700	13898
1222	815	13524	1254	1045.5
1119	1056	13461	1284.5	1241
1240	937.5	13186	1493	1187.5
1211.5	834	13119	1450	1047.5
1299	887	12822	1370.5	1127
1280.5	1011	12603	1424	1068
1202	990.5	12387	1347	1088.5
1219	899	12054	1327	1025

← (A)

②  
↓

FIG. 14 (Continuación)

(B) →

Her2 (Sino) (FL1-A de QSH15)	Her3 (FL1-A de QSH16)	mPD-L1 (FL1-A de QSH18)	Control sin diana (FL1-A de QSH22)	Avastin (FL1-A de QSH23)
882	1276	1035	1397	1075.5
957	1354	1093	1315	1151
831	1267	1069	1407	1012.5
863	1317	996.5	1349	1130
845	1308	1114	1330	1101
721	1349	1044	1357.5	1063
807	1216	974	1297	1121.5
746	1353	1022	1316	1001
785	1289	1001	1378	1041
833.5	1257	1047	1449.5	1027
715	1310	1060.5	1371.5	1093.5
869.5	1276.5	1192	1316	1058.5
904	1295	929	1513	1025
791	1244	1196	1414.5	1140
969	1310	1167	1465.5	1065
920.5	1368.5	1124	1345	1073
758	1313	1175	1301	1118
930	1376	1079	1451	1153.5
791.5	1416	1139.5	1570.5	1213
755	1373	1171.5	1491	1050.5
1000	1446.5	1203.5	1619	1087
1558	9050	34447	1722	80937.5
977	1355	998	1542	1043
1086	7678	31591	1498	67202.5
1450.5	8058	26664.5	1723	59332.5
966	1370	1046	1411	1019.5
853	1402	1176	1577.5	1049.5
827	1402	1076	1559	1103
912	1359.5	1179	1401	1225.5
835	1397	1117	1483	1116
752	1492	1087	1489.5	1187
758.5	1403.5	954	1521	1125.5
775	1356	1140	1307	1133

← B

③  
↓

FIG. 14 (Continuación)

C →

Humira (FL1-A de QSH25)	Rituximab (FL1-A de QSH26)	mPD-L2 (FL1-A de QSH27)	Her4 (FL1-A de QSH28)
848.5	1987	1148	1390.5
915	1962	987	1355.5
898	1952	1111	1354
953.5	1862.5	1133	1316
981	2065	1132.5	1375
861	1943	1125	1302
905	1807	1073.5	1346
937	1874	1026	1381
949.5	1986	1082	1291.5
933.5	1936	1138	1356.5
827	1970	1044	1334.5
931.5	2066.5	1190	1407
874	1903	1113	1278
961.5	1944	1095	1261
953.5	2009	1093	1247
901	2010	1085	1211
936	1989.5	1098	1413
996.5	1990	1104	1445
954	2070	1114	1488
1045.5	2066.5	954.5	1495.5
1111	2078.5	1242	1518
131315	22615	40253	4399
946	2029.5	1087	1437
86596	19134.5	37128	3722
84929	15932	30973.5	3826
986	1978	1042	1423
949	2012.5	1084	1502
1079	2023	1171	1610
890	1882	1085	1353
1040	2003	1138.5	1367
973	1957	1054	1476
1069	1952	1101	1571
977.5	2025.5	1163	1357.5

← C

④  
↓

FIG. 14 (Continuación)

①

00454_645287	14587.5	1176	67151
00454_645143	1798	1170	1084
00454_645169	13680	1101.5	82856
00454_645167	1600	1175	1022
00454_645175	1589	1144	960
00454_645160	1590	1088	1088
00454_645297	1664	1081	1015.5
00454_645152	1722	1119	1013.5
00454_645155	1690	1191.5	1076
00454_645202	13487	1059.5	83252
00454_645291	1673	1165	1018
00454_645144	1631	1143	978
00454_645326	1605.5	1170	1171
00454_645136	1634	1109	1094
00454_645281	1595.5	1121.5	1047
00454_645244	9506	1111.5	45050
00454_645289	1520	1117	1114
00454_645205	1609.5	1173	1110.5
00454_645120	1661	1173	1082
00454_645298	8834	946	35873
00454_645195	1539	1028	1019.5
00454_645268	1708.5	1093	1146
00454_645131	1781	1118.5	1047.5
00454_645116	8608	1222	32338
00454_645262	1666.5	1133	1200
00454_645121	1661	1240	1256.5
00454_645173	5170.5	1081	45807
00454_645284	5839	1165	23132.5
00454_645280	1623	1098	1060
00454_645132	1591	1200	1179
00454_645212	1566	1050.5	917
00454_645260	4442	1084	32130.5
00454_645166	2528.5	1087	13169
00454_645164	1691.5	1155	1128
00454_645118	1696	1138.5	1143.5

⑤

FIG. 14 (Continuación)

⑥

②

36288.5	1518	11400.5	99037	18352
1289	828.5	10467	1437	1041
34870	1904	10415	115321	14048
1267	868	10265	1162	1008
1216	933.5	10170	1174	955
1264	1006	9941	1390	1135.5
1159.5	902	9151	1292	1022
1227	960	8958	1295.5	978.5
1278	914	8909	1477.5	1103
33579	1190	8875.5	117271	13220
1249	839	8869	1356	1100
1133	865	8848.5	1372	999.5
1259	987	8820.5	1415.5	1050
1183	893	8457	1349.5	960
1152.5	806	8154.5	1211	1179
22405	1086	7967	63728.5	8146
1292	756	7554	1364	1127
1202	791	7548.5	1352	1079.5
1222.5	781	7520	1570	1093
19074	1135.5	7405	54490	11801.5
1194	990	7236	1362	985
1136	855	7152.5	1199.5	973
1208	864	6750	1349	958.5
18935	1348.5	6229	57351.5	11405
1151.5	807	6201	1366.5	1034.5
1214.5	820	5958	1390.5	1113.5
18042	893	5438	7352	1451
12215	1040	5434	34368.5	8373
1117	756.5	5256	1075	996.5
1229.5	888	5184	1384	1032.5
1216.5	895.5	5091	1370	920
14030.5	834	4804.5	5806.5	1375
5665	750	4746	2900	1123
1151	786	4739	1260	996
1317	919	4669.5	1658	1101

⑥

FIG. 14 (Continuación)

⑤

③

1488	7688	23226.5	1687	57068
877	1313	1125	1569.5	1126.5
1731	8274.5	24038.5	2117	57839.5
910.5	1273	1189	1375	1117
775.5	1341	1062.5	1514	1102.5
775.5	1437	1146	1540	1175.5
940.5	1311	1066	1543	1194.5
837	1328.5	1014	1539	1125.5
869	1370	1095	1481	1187
1281	8010	23969	1689	57015
801	1421	1100	1494.5	1218
840	1437	1049.5	1504	1108.5
861	1391	1000	1563	1108
723	1392.5	1201	1440	1052
979	1302.5	1026	1511.5	1157
1287.5	5309	15791	1586	35101
839	1359	1173	1510	1019
812	1270	1135	1435	1057
825	1405	1162.5	1485.5	1152.5
1009	4027	14606	1432	29550
885	1310	1192	1464	1178.5
680	1266.5	1234.5	1450	1030
802.5	1418.5	1028	1435	1103
1330.5	4966	13374.5	1621.5	32320
876	1359	1117	1365	1098
845	1354	1121	1366	1121.5
747	2402	12293	1329.5	2428.5
1166	3006	9588.5	1478	19147
858	1235	1065	1377	1062
737	1371	1105.5	1429	1099
774	1342	1110	1427.5	1065
815.5	2308	9346	1489	2161
671	1714.5	4103.5	1296	1417
771	1319	1152.5	1475	1191.5
830	1420.5	2127	1477.5	1565

⑦

FIG. 14 (Continuación)

↑  
④

83437.5	16320	27748	3903
1009	2053	1081	1467
99995	15617	28510	4712.5
996.5	2036	1094	1415
932	1951	981	1381
937	2059.5	1089	1338
938	2005.5	1125	1415
950	1977.5	1073	1383.5
952.5	2024	1172.5	1464
103142	13979.5	27687	3747.5
992	1996.5	1163	1422.5
890	1958	1101.5	1333
868	2019	1121	1467
1012.5	1968.5	1225	1340.5
931	1957.5	1168	1356
53953.5	10209	19496	2849
922.5	2116	1112	1423
931	2016	1007	1332
942	2086.5	1146	1396
48642	10507	16577.5	2474.5
962	1995	1023.5	1402.5
869.5	1972	1047	1399.5
892	1995.5	1117	1365
47237.5	8831	15231	2805.5
845.5	1972	1159.5	1439
927	1958.5	1213	1497
7381.5	2478	14660	1834
31953.5	7122.5	10349.5	2032.5
936	2003.5	1071.5	1376.5
890.5	1995	1004	1299
1028	2062	1114	1357
5606	2375	10820	1713
2968	2148	4891	1384
984.5	2021	1049	1456
1115.5	1931	1100	1411

↑  
⑧

← F

FIG. 14 (Continuación)



↑  
⑤

00454_645171	1620.5	1111		995
00454_645142	5730	1082	<input type="checkbox"/>	39717.5
00454_645276	4595	1058	<input type="checkbox"/>	38717
00454_645130	1683.5	1020.5		1006
00454_645162	1567	998.5		1103.5
00454_645299	1655.5	1094		1141
00454_645138	1674	1119		1072
00454_645285	1759	1173		1061
00454_645282	1558	1060		1123.5
00454_645165	1685	1046		1173
00454_645185	1720	1102.5		1092
00454_645134	1699	1114		1224
00454_645141	1628.5	1128		1210
00454_645209	1525.5	1154		1219
00454_645267	1661	1198		1055.5
00454_645214	1817	1151.5		1174.5
00454_645179	1545	1070		879
00454_645117	4995.5	1075.5	<input type="checkbox"/>	36788
00454_645157	1710	1054.5		1162
00454_645213	1687.5	1097		1106
00454_645180	1585.5	1012.5		1048
00454_645286	1647	1059		1070
00454_645259	4787	1100	<input type="checkbox"/>	23727
00454_645129	3095.5	1135.5	<input type="checkbox"/>	14084
00454_645242	1660	1124		968
00454_645145	1683	1101.5		1107
00454_645170	4318	1144	<input type="checkbox"/>	25645
00454_645181	4500	1049	<input type="checkbox"/>	25746
00454_645216	1701	1221		1210
00454_645201	1610	1185.5		1063
00454_645261	4576	1103	<input type="checkbox"/>	24225
00454_645308	1759	1218		1155
00454_645275	1671	1049		1086
00454_645264	1782	1130.5		1052
00454_645249	1760	1054		996

⑨  
↓

FIG. 14 (Continuación)

Ⓒ→

⑥

1248.5	825	4619	1385	996
18126	993	4612	70677	7438
15884	832	4555.5	6325	1396
1200	922	4533	1293	1019
1211	992	4477	1354	982
1245.5	780	4372	1286	920
1243	936	4363	1540	1135
1136.5	839	4338.5	1233.5	1019.5
1213	817.5	4301.5	1253	1020
1225	849	4251	1305	957.5
1157	785	4239	1265.5	1011
1159	917	4046	1352.5	1053
1175	816.5	3967	1311	1028
1159	917	3951	1402	1046
1125	766.5	3902	1335	1043
1192.5	798.5	3898	1293.5	1019.5
1135	802	3702.5	1330	1001
14948	1101.5	3633.5	67452	6348
1245	787	3489	1326	1044
1221	929.5	3483	1423.5	995
1150	936	3479	1372.5	1029
1175	895	3410	1423.5	1004
11702.5	855.5	3336	38104	4227.5
7087	872	3294	22782	2437
1133	847	3258	1380.5	1070
1186	740	3226	1298	954
8722	933.5	3199	42398	4702.5
8798.5	907	3131	43687	4509
1186	863	3072	1365	981
1116.5	854	3048.5	1458	940.5
11179	985	3022	35506	3754.5
1221	849.5	3005.5	1639	1142.5
1087	752.5	2982.5	1332	1081
1135	775	2969	1325.5	986
1221	885	2954.5	1388.5	1028

← G

⑩

FIG. 14 (Continuación)

H →

175

8

965	1968	1138	1292
55979.5	6651.5	14541.5	2119
5959	2380	12777	1672
989	1957	1041	1461
893	2088	1070	1314.5
928	1876.5	1111.5	1446
976	2075	1030.5	1409
936	1961	1099	1313
941.5	1922	1017	1389
1019.5	1919	1089.5	1310.5
931.5	1966.5	1096	1348
876	2088	1123	1324
1014.5	2121.5	1219	1338.5
950.5	2033	1127	1452
885	1990	1016	1284
902	1955	1153	1442.5
924	2014	1049	1348.5
43950	5454	12677	2041
956.5	2000.5	1082.5	1464
1004	1951	1082	1424
888.5	1895	1151	1351.5
965	1942	1108	1405
29854	4895	9021.5	2046.5
16444	3619	5733	1718
944	1995	1074	1332
965	2028	1091.5	1405
37006	5461	7201	2014
38324.5	5263.5	7271	2179
1036	2011.5	1118.5	1321
968	2015	1138	1419
29575	4530	8562	1782
1254	2008	1308	1544.5
949	1874	1109	1409
937	1893.5	1185	1312.5
860	2092	1211.5	1372.5

12

1

FIG. 14 (Continuación)

9

00454_645306	1632.5	1148	1089
00454_645196	4067	1122	30337
00454_645263	1671	1114	1049
00454_645188	4239	1045.5	32917
00454_645194	4131	1108	35041
00454_645190	1742	1142	1010
00454_645204	1540	1036.5	1023.5
00454_645191	1540.5	1114	1066.5
00454_645310	1696	1133.5	1198.5
00454_645227	1677	1054	1047
00454_645208	3960	1100	30807
00454_645311	1701	1238	1163.5
00454_645309	3898.5	1217.5	14158.5
00454_645224	1674	1149	1165
00454_645251	1768.5	1116	1020
00454_645319	1634	1151	1033
00454_645318	1659.5	1177	994.5
00454_645302	1696	1019	1025
00454_645307	1727	1126.5	1093
00454_645115	2696	1147.5	8206
00454_645328	1733	1104	1233
00454_645210	1663	1139.5	1024
00454_645113	1728	1157	937.5
00454_645288	1666	1004.5	1041
00454_645303	1590.5	1113.5	1076
00454_645317	1769	1084	1112
00454_645158	1640.5	971	1435
00454_645161	1644	1135.5	1113.5
00454_645147	1647	1159.5	1023.5
00454_645322	1644	1205	928
00454_645177	1738.5	1098	1114
00454_645203	1601	1154	988.5
00454_645320	1725.5	1144	1081.5
00454_645270	1650	1100	1214.5
00454_645327	1672	1057	1115.5

13

FIG. 14 (Continuación)

J

1237	1019.5	2918.5	1422.5	1106
10337	1011	2879	46737	3621.5
1057.5	897	2879	1437	927
11244	855	2871.5	48826	3399
11321.5	891	2855	50439	3528.5
1109	777	2849.5	1339.5	977.5
1271.5	748	2774	1341.5	998
1149	896	2741	1357	954
1195	1003	2668	1411	1078
1168	782	2647	1410	971
10297.5	943	2645.5	43612.5	3164
1217.5	903	2625	1448	1003.5
7384	922	2553	23002	3768.5
1173.5	773.5	2496	1142	1033
1273	818.5	2420	1241	1046
1214.5	820	2369	1247	1093.5
1138	822	2299	1295	892
1205	814	2214	1346	886
1278	875.5	2177	1361.5	1132
4630	917	2151	15656	1913.5
1157	937.5	2028	1322	982
1124	796	2006	1356.5	990
1127	799	1856.5	1284	869
1208	768	1798	1252	1027.5
1158.5	857.5	1720	1298.5	973
1124.5	812	1601	1191	896
1914	780.5	1475	1320.5	1065.5
1136	863	1473.5	1429.5	1001.5
1133.5	728	1354	1315	963
1113.5	775	1326	1537	1116
1051	734	1315	1384	968
1130	715	1310.5	1371	989.5
1159.5	917	1302	1255	982
1225	856	1286	1186	1011
1134.5	866	1279	1392.5	1086

	865	1451	1072	1448	1154
	836	2352	6982.5	1501	16918
	911.5	1246	1116	1472	1174.5
	919.5	2354	7643	1302.5	17814.5
	814.5	2414	7294	1415	18413
	851.5	1303	1128.5	1505	1117
	881	1268	1035	1407.5	1076.5
	809.5	1329	942	1389	1112.5
	880	1337	1089	1476.5	1194
	793.5	1332	1190	1526	1105
	858	2289	6576	1521	16966
	828	1372	1152.5	1329.5	1101
	1104.5	2413	5281.5	1525	11538.5
	831	1369	1157.5	1361	1139.5
	757.5	1297	1069	1474	1085.5
	904	1288	1065	1519.5	1192
	884	1319	1124.5	1341.5	1087
	780	1389	1173	1353.5	1087
	819.5	1408.5	1070	1478	1119
	852	1798	3035	1516	6865.5
	875.5	1274.5	1063	1340	1048
	879.5	1405	1114	1219	1066
	1032.5	1334	1088	1580	1177.5
	978.5	1238	1018	1389	1124
	864.5	1369.5	1022	1411	1053.5
	834	1262	1008	1404.5	1128
	822	1387	1330	1355	1068
	865	1322	1052	1432	1166.5
	815	1329	1050.5	1395.5	1154
	785	1248	1167	1426	1039
	884	1309	1155.5	1523	1195
	795	1363	1042	1270	1083.5
	962	1280	1108	1392	1184
	783	1335.5	1147.5	1382	1004
	788.5	1364	1178	1409	1081

FIG. 14 (Continuación)

⑫

1036	2072	1242	1526
36622	4743	8061	1950.5
919	1866	1039	1346
38499	4532	8273	1743.5
39260	4670	8346	1698.5
955	1958	1200	1329
927	2001	976.5	1314.5
939	1955	1118	1396
971	1998	1105	1452
860	2045	981	1423
35667	4230	7843	1656
988.5	1995	1093	1417.5
19026	4216	5972	1831.5
966	1997	1117	1380
892	1906	1144	1403.5
952	2002.5	988	1359
885	1946	1119	1315
934	1955	1086	1289.5
1081	2030	1142.5	1536
10547	2997.5	3834.5	1582.5
893	1938	1142.5	1378
817	1951.5	1047	1380
944	2048	1086	1450
934	2121	979.5	1362
858	1931.5	1221	1230.5
770.5	1965.5	1119	1340
860	1849	1462.5	1429.5
938	1969.5	1116.5	1368.5
984	1882.5	1049	1240.5
833.5	1978.5	1004	1372
887	2052	1025	1342.5
831.5	1946	1167.5	1388.5
936	2086	1126.5	1345
863	1922	1063	1329
854	1985.5	1064	1364

⑬

FIG. 14 (Continuación)



↑  
⑬

00454_645128	1670.5	1112	1082
00454_645151	1674	1108.5	930.5
00454_645226	1696	1208	1083.5
00454_645215	1759	1165	1170.5
00454_645329	1820.5	1134	983.5
00454_645235	1650	1008.5	1061.5
00454_645269	1668	1056	1103
00454_645217	1665	1106	1054
00454_645237	1663.5	1229	984.5
00454_645278	1706	1046	1069
00454_645127	1736	1157	1160
00454_645253	1678.5	1127	999
00454_645272	1561	1081	989
00454_645189	1619	1188.5	1117.5
00454_645200	1550	1426	1186
00454_645313	1640	1066	1035
00454_645148	1623	1135.5	1049
00454_645258	1648	1094.5	1054
00454_645206	1623	1086	1082
00454_645239	1682	1085.5	1056.5
00454_645187	1714	1109	1051.5
00454_645150	1691	1079	1027.5
00454_645323	1674	1097.5	1082
00454_645135	1634.5	1055.5	1011
00454_645241	1685	1152	1135
00454_645186	1711.5	1106	1011
00454_645153	1673.5	1208	971.5
00454_645125	1724.5	1176	1149
00454_645248	1593	1070	1044
00454_645154	1658	1099	1114.5
00454_645172	1650	1108	992
00454_645139	1832.5	1107.5	1022
00454_645252	1737.5	1226	960
00454_645321	1705.5	1118.5	1082
00454_645133	1601	1151.5	1044

⑰ ↓

FIG. 14 (Continuación)



↑  
⑭

1136	779	1277.5	1295	909
1158	822.5	1270	1350	1003.5
1170	943.5	1265	1388	1042
1181	886.5	1265	1189	982.5
1206	815	1262	1330	998
1221.5	753	1262	1360.5	853
1176	796	1256	1381.5	979
1136	782.5	1255.5	1243	1014
1251	836	1254	1367	1060
1123	825.5	1254	1292	992
1288.5	868	1252	1411	1074
1229	857.5	1250.5	1237	989
1230	863	1250	1222	998.5
1074	694.5	1246	1344	910
1153.5	701	1246	1419	968.5
1159	813	1241	1164	1063
1224	812	1232.5	1187.5	979
1044	827.5	1226.5	1318	1014
1152.5	799	1222	1307	947
1311	761	1220.5	1319	1068.5
1110	766	1216.5	1346	1031
1173.5	865.5	1208	1278.5	1027.5
1136	735	1197	1430.5	934
1297	685	1197	1319	1036
1197.5	783	1194	1540	1012
1070.5	852	1189	1321	922
1160	787.5	1182.5	1384	979
1127.5	868	1174.5	1365.5	986
1024	780	1168	1284	1024.5
1100.5	869	1167.5	1341.5	936
1114	828.5	1166.5	1175.5	966
1138	814	1165	1451	957
1089	869.5	1161.5	1425.5	1054.5
1203	829	1161.5	1400	987
1173	748.5	1148	1356	974.5

← ⑮      ⑰      ⑱ →

← ⑭      ⑮      ⑯ →

FIG. 14 (Continuación)

↑  
⑮

643.5	1292	1162.5	1399	1200
790	1349	1148	1445	1154
863	1348	1136	1521	1119
903.5	1301	1197	1435	1098
892.5	1233	979	1521	1145
954	1247	1185	1307	1098.5
890	1334	1222	1439	1213
797.5	1297	1060	1414.5	1068
934	1315	1083.5	1423	1115.5
814	1274	1076	1407	1096.5
874	1313	1127	1533	1050.5
783	1374	1044	1478.5	1093
726	1321.5	1051	1419	998
962	1381	1041	1413	1067
860	1272.5	1074	1322	1026.5
899	1364	1101	1364	1045
812	1307	987.5	1340	1024
790	1289	1049	1367	1154
906	1269.5	1070	1287	1115
896	1350.5	1022	1415	1117.5
854.5	1287.5	1007.5	1294	1106
879.5	1332	995	1412.5	1119.5
809	1327.5	1091.5	1317	1109.5
984.5	1318	1060	1386.5	1086
853	1390	1108	1388	1097
755	1268	1077.5	1415	1004
925	1189	1025.5	1431.5	1068
814	1310	1143	1391	1080
901.5	1228	1079	1494	1127.5
771.5	1291	1143	1478.5	1009
843.5	1286.5	1256	1364.5	982
819.5	1380.5	1031	1453	1212
703	1368.5	1127	1298.5	1160.5
817.5	1351	1081.5	1459	1181
837	1302.5	1097	1454	1101

⑰  
↓

← N      O →

FIG. 14(Continuación)

↑  
⑩

904	2126	1051.5	1411
891.5	1896	1117	1370
931	1979	1047	1429.5
896	1906	1176	1391
853	1939.5	1127	1335
972.5	1986	1033	1404
989.5	2052.5	1175.5	1408.5
893	1984	1185	1287
888	1966	1080	1264.5
951	1998	1184	1270.5
883.5	2017	1110.5	1397
920	2059.5	1179	1362
886.5	1966	1056.5	1310
913	1964	1118	1404
938.5	1864	980.5	1295
876	1999	990	1241
965	1876	1114	1361
833	1769.5	1007	1370
1002	1920	1109	1326.5
965	2052.5	1111	1444.5
883	1931	1080	1356
984.5	1988.5	1155	1355.5
810	1990.5	997	1393
1036	1931	1089	1369
928	2020	1175	1353.5
934.5	1979	1095	1257
981.5	1909	1163	1335
966	1941	1073.5	1424
801	1813	1051.5	1263
948	2009.5	1163.5	1385.5
890	1931.5	1072	1257
914	1998	1133	1332
841	2044.5	1186	1313
922	2047.5	1018	1263.5
922	1864	1135	1357.5

⑪  
↓

②  
←

⑫  
↓

FIG. 14 (Continuación)

↑  
①7

00454_645182	1580	1157.5	1103
00454_645223	1600	967.5	1127
00454_645149	1651.5	1160	1143
00454_645168	1622	1175	1174.5
00454_645274	1646.5	1010.5	1150.5
00454_645231	1645	1082.5	1111
00454_645137	1672	1165.5	1047
00454_645192	1632.5	1199	1097
00454_645159	1599.5	1089.5	1100
00454_645183	1799	1106	1047
00454_645163	1631	1124	1073
00454_645305	1775	1076	1166
00454_645243	1663.5	1118	1055
00454_645301	1630	1133	1061.5
00454_645236	1768.5	1172.5	950
00454_645238	1745	1234	1109.5
00454_645312	1682	1086	983.5
00454_645119	1677	1243	1109
00454_645114	1792	1143.5	1047.5
00454_645273	1571.5	1042.5	1165
00454_645256	1655	1235	1064
00454_645300	1612.5	1044.5	1071
00454_645232	1602	1167	1008
00454_645221	1674.5	1197	1138
00454_645184	1620	1144	1097
00454_645254	1537	1133	1007.5
00454_645265	1648	1148	1070.5
00454_645246	1600	1128.5	1055
00454_645225	1624.5	1099.5	1071
00454_645211	1617	1065.5	1093
00454_645257	1648	1118	1106
00454_645229	1620	1155	1020
00454_645228	1596	1115	976.5
00454_645283	1699	1138.5	1118
00454_645292	1588.5	1097	1148

②1  
↓

FIG. 14 (Continuación)

Ⓟ→

1195	825	1145	1396	1037.5
1155	723	1143	1154	1043.5
1111	831.5	1142	1292.5	965
1248	868	1138	1317	985
1155.5	804	1134	1273	1068
1162.5	862.5	1133.5	1356	899.5
1157	885	1132	1399	968
1115	795.5	1128.5	1371	1047
1162.5	812	1125	1294	878
1149.5	831.5	1124	1318	1028
1108	804.5	1122	1307	985.5
1168.5	874.5	1122	1335	1074
1159.5	807	1121.5	1361.5	987
1107.5	778	1120.5	1280	1044
1127	895.5	1120	1302	942
1269	808	1119	1321	847
1200	920	1119	1486	886.5
1124	836	1118.5	1426	989
1240	857	1109	1311	1041
1141.5	756	1108.5	1260	956
1200.5	887	1103	1235	952
1184	851.5	1102.5	1353	1019
1108	863	1101	1340.5	931
1159	871	1100	1254	995
1127	799	1091	1332	998.5
1073.5	853	1087	1254.5	998.5
1174	852	1086	1369	1029
1179.5	908	1086	1287	1028.5
1252	910.5	1085.5	1586	1065
1135.5	761	1084	1385	1006
1202	717	1076	1252	933
1197	794.5	1065	1218.5	1006
1130	857	1060	1108	1016
1190	815	1059	1225.5	942
1079	793	1055	1325	974.5

	885	1311	944	1441	1105
	828	1264	950	1481.5	1060
	864.5	1216	1213.5	1438.5	1068.5
	888.5	1246	1141	1364	1105
	933	1421	1200	1321	1236
	825	1248.5	1110	1275	1089
	772	1359	1166	1301	1100
	890	1349	1008.5	1435	1096
	814	1243	1078	1321	1084
	790	1328	1137	1505	1175
	753	1319.5	1068	1376.5	1148
	877	1375	1186	1475	1141
	815	1259	1161.5	1492	1033
	823.5	1424	1122	1440	1122
	833	1278.5	1014	1458	1073
	800.5	1314.5	1006.5	1326	1019
	837	1311	1196	1475	1133
	885	1362	1109	1512.5	1061
	901	1314	1099	1416	1159.5
	909	1327	1056	1402	1068
	745.5	1339.5	1037	1370	983
	915.5	1278	1124	1407	957
	830	1277	1070.5	1361	1045
	894	1378	1206.5	1421	1148
	841	1273.5	971	1351	1151
	820	1295.5	1079	1323	1186
	814	1344	1154	1367	1039
	739.5	1280.5	1075	1299.5	1125
	792	1284	1035	1423.5	1167
	948	1347	1141	1459	1047
	798	1373	1128	1432.5	1038
	917.5	1251	965	1370.5	1173
	892	1433	983.5	1202	1098.5
	801	1402	1182	1348.5	1043
	835	1324	947	1531.5	987

FIG. 14 (Continuación)

↑  
20

964	2008	1082	1321.5
899	1898	1152	1372.5
941.5	2006	1224	1307
949.5	1943	996	1259.5
952	1988	1170.5	1359
993	1882	1211	1321.5
917	1974	1127.5	1287
958	2018	1003	1337
887.5	1896	1105	1254
865	2049	1030	1356
879	1928.5	998	1278
837	1973.5	1197	1346
872	2031	1054	1332
968	1949	1033	1259
891.5	1938	1162	1297.5
927	2065.5	1125	1370
930	1860	1197	1447
949	2012.5	1326	1402
779	2053.5	1106	1297
850.5	1944	1115.5	1365
942	1939	1095	1315
868	1858	965	1359
880	1844	1012	1264
899	2015.5	1148	1485.5
852.5	1880	991.5	1325.5
836.5	1960	1101	1378
901	2005	1202	1386
919.5	1910	1099	1356
872.5	1908	1225	1366
962.5	2003.5	1179	1415
867	1887.5	1092	1388
841	1960	1101	1258
914	1948	1062.5	1243
895.5	1925.5	1030	1362
936	2010.5	1100.5	1248

← (R)      24 ↓

FIG. 14 (Continuación)



↑  
21

00454_645255	1710	1024	1092
00454_645245	1666.5	1119	1088.5
00454_645266	1679	1022	913
00454_645126	1683	1135	1139
00454_645146	1704.5	971	936.5
00454_645233	1704	1063	1117
00454_645230	1744	971	1208
00454_645279	1726.5	1108	1109
00454_645207	1762	1115	995
00454_645240	1756	1088	1098
00454_645247	1620.5	1094.5	936
00454_645176	1553	1138	941

FIG. 14 (Continuación)



↑  
22

1099.5	740	1051.5	1283	941
1165.5	779.5	1041	1400.5	1018
1121	834	1039	1275	1017
1130	841.5	1027	1271.5	960
1200	872.5	1000	1099	1049
1130	822	996	1398	1022
1215.5	858	981.5	1233	1065
1183	853.5	971	1303	1054
1236	782	962	1364	953
1017	789.5	960	1170	1027
1206.5	830	949	1397	998
1034	700	941	1327	887.5

← S

FIG. 14 (Continuación)

T →

↑  
23

838.5	1279	1112	1370	1105
909	1319	1068	1463.5	1041
981	1295	1025	1443	1218
875	1364	1095	1521.5	1130
818	1351.5	1167	1450.5	1126
884	1434.5	1122	1400	1124
884	1174	1135	1410	1202
877	1240	1011	1356	1182.5
802	1340	1062	1365	1051.5
802	1218	1105	1306	947.5
863	1290.5	995	1368	982
755	1279.5	1024	1426	955



FIG. 14 (Continuación)



↑  
24

876.5	1962	1198	1421
1019	1933	1141	1311
866	1847	1114	1318.5
874	2027	960	1412.5
896	2000	1071	1280
971	2075.5	1180.5	1404
902.5	1981	950	1360.5
851	1965	969	1304
946	1927	1159	1287
912	1868	1024	1273
896.5	1979	1166	1443
787.5	1904.5	1062.5	1261.5

← U

FIG. 14 (Continuación)

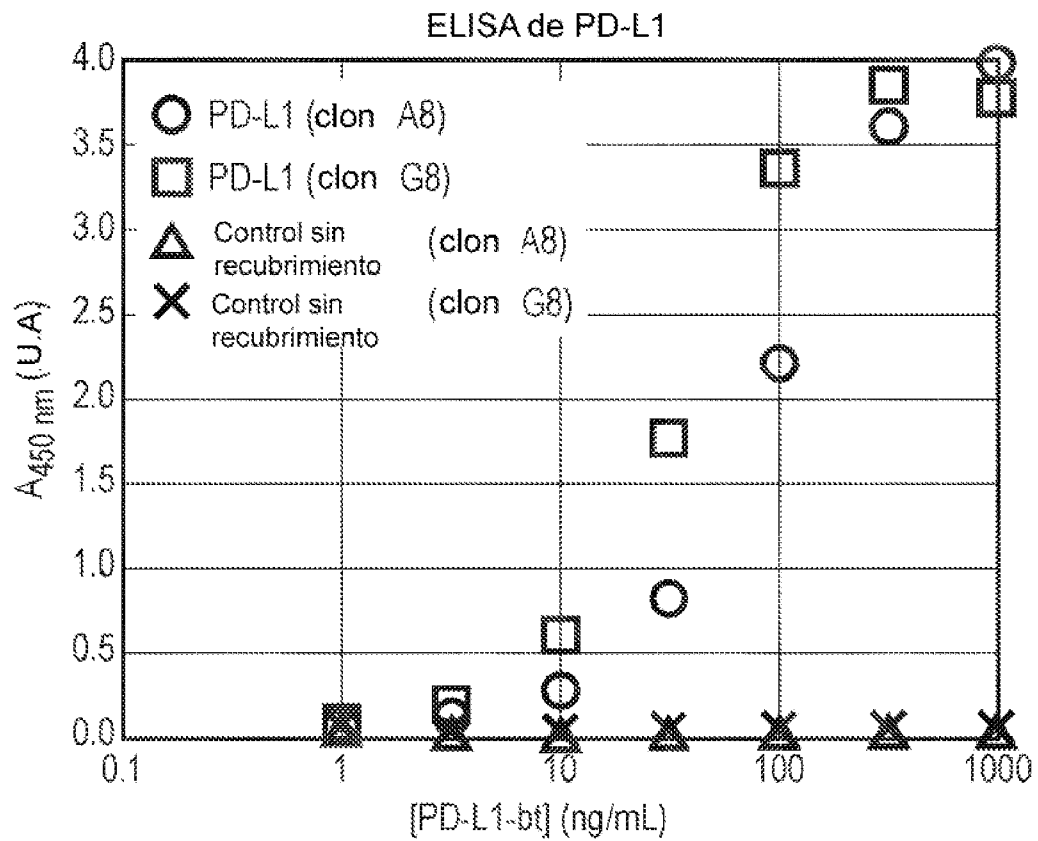


FIG. 15

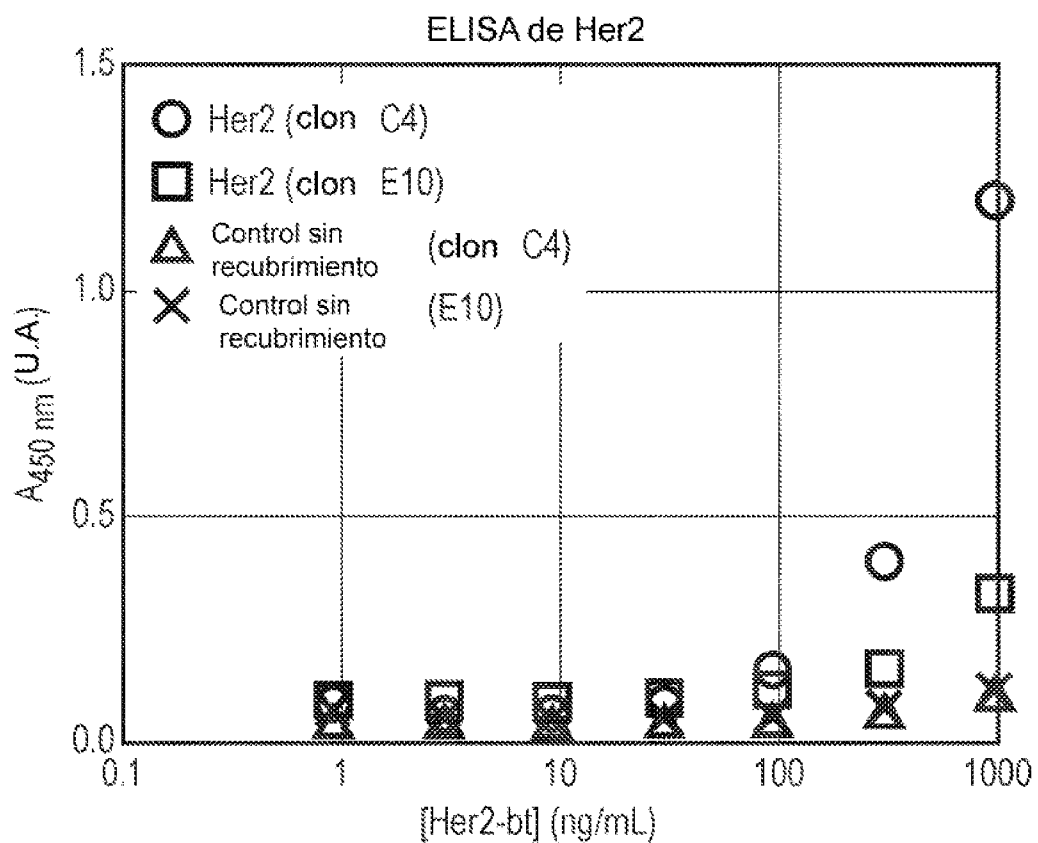


FIG. 16

ID de trabajo de Affimer	PDL_1 canino (FL1-A de QSH02)	VEGFR2 humano (FL1-A de QSH04)
00492_655534	487686	1046.5
00492_655606	300170	968
00492_655478	265975	973
00492_655610	198066	1053
00492_655494	192523.5	1148
00492_655614	185154.5	1134.5
00492_655480	174787	1126.5
00492_655573	157161	962.5
00492_655572	156490.5	1171
00492_655611	150997.5	1025
00492_655638	139829	1028.5
00492_655648	133745	963
00492_655481	116414.5	1016.5
00492_655608	114909	949
00492_655505	109482.5	1066.5
00492_655533	107343	1116
00492_655652	106006	1052
00492_655495	105968	882
00492_655472	100676	979
00492_655585	100161	1178
00492_655521	99513.5	896.5
00492_655468	99499	1070
00492_655552	99086.5	984
00492_655471	98638	961.5
00492_655519	92743	843



FIG. 17



Péptido SMA (4A6) + BA (FL1-A de QSH05)	FC humano (FL1-A de QSH10)	PD1 canino (FL1-A de QSH18)	Amina-Peg11 (FL1-A de QSH15)
1515	1362	1976	1057.5
1441	1235	1489	1087.5
1268	1569	1512	1031
1270	1458.5	1414	1163
1341.5	1284	1467.5	966.5
1489	1330	1602	1180
1248	1364	1371	1173
1132	1338	1404	1112
1558	1510	1332	1105.5
1343	1202.5	1261	914
1502.5	1299	1623	970.5
1310	1254	1448	976
1190	1149	1241	934
1334	1346.5	1406	1055
1278	1245	1357	1086
1275	1252	1278	920
1196	1205	1178	858
1254	1178.5	1427	1031.5
1297	1301.5	1319	928.5
1585.5	1233	1291.5	1140
1262	1197	1186	935
1308	1324	1259.5	999
1224	1232	1168	967.5
1389.5	1462.5	1245	1066.5
1245	1179	1346	1148

FIG. 17 (Continuación)

mIgG2b (Control) (FL1-A de QSH21)	Sin diana (Control) (FL1-A de QSH26)	Fumonisin B1 (FL1-A de QSH29)	Péptido SMA (2A9) + BA (FL1-A de QSH22)
2661	2272	1297	2172
2557.5	2138	1283	2493
2674	2396	1466	2397.5
2872.5	2102	1257	1679
2447	2272	1182.5	2143
2378	2214	1250.5	1848
2598	2221.5	1300.5	1982
2609	2267	2566	2648
2811	2219.5	1763	2302
2345	1946.5	1558.5	2286
2722.5	2202.5	1674	2299.5
2672	2157	1741.5	2216.5
2397.5	2214	1271	1734
2642	2091	1561	1972
2429	2129	1295	2071
2432	2019	1349	1992
2302	2075	1173.5	2039.5
2234	2034	1047	1874
2647	2243	1255.5	2030
2459.5	2375	2440	2723.5
2497	2138	1315.5	1929
2589.5	2040.5	1406	1850
2214.5	2029	1233	1693
2359	1979	1089	2259
2217	2110	1311.5	1739

←B

③  
↓

FIG. 17 (Continuación)



①

00492_655541	<input type="checkbox"/>	89444	1081.5
00492_655601	<input type="checkbox"/>	84042	1041.5
00492_655551	<input type="checkbox"/>	81090.5	1011
00492_655639	<input type="checkbox"/>	81068.5	941
00492_655465	<input type="checkbox"/>	80613.5	1054
00492_655477	<input type="checkbox"/>	77681.5	1065
00492_655520	<input type="checkbox"/>	75087	1121
00492_655591	<input type="checkbox"/>	75010	958
00492_655627	<input type="checkbox"/>	71011.5	1057
00492_655605	<input type="checkbox"/>	67170	1096
00492_655654	<input type="checkbox"/>	65882	971.5
00492_655563	<input type="checkbox"/>	60901	1081
00492_655574	<input type="checkbox"/>	56010.5	1122
00492_655562	<input type="checkbox"/>	54184.5	1021.5
00492_655625	<input type="checkbox"/>	53675	1036
00492_655612	<input type="checkbox"/>	52102	1092
00492_655488	<input type="checkbox"/>	51106.5	947
00492_655583	<input type="checkbox"/>	50260.5	965.5
00492_655530	<input type="checkbox"/>	50008.5	1019
00492_655514	<input type="checkbox"/>	49577	1040
00492_655650	<input type="checkbox"/>	48880	1038
00492_655482	<input type="checkbox"/>	48521	994
00492_655643	<input type="checkbox"/>	46995.5	1035
00492_655511	<input type="checkbox"/>	44026	951.5
00492_655518	<input type="checkbox"/>	43791	1001
00492_655576	<input type="checkbox"/>	42227	1021
00492_655641	<input type="checkbox"/>	38459	1173
00492_655628	<input type="checkbox"/>	37765	918.5
00492_655607	<input type="checkbox"/>	36757.5	985

④

FIG. 17 (Continuación)

©

	②		
1434	1286	1268	1021
1428	1302	1338	1147.5
1119	1204	1157	1095.5
1154.5	950	1211	856
1316	1280	1268	1130
1543.5	1354	1270	1132.5
1723	1338	1023	1151.5
1202	1206	1093	793
1141	1292	1142	893
1286.5	1150.5	1474	1071
1247	1291.5	1152	1062
1435.5	1086	1329	925
1550	1430.5	1243	938.5
1356	1234.5	1348	1041
1513.5	1307.5	1524	1116
1208	1216	1232	853
1723	1199	1340	1049
1111	1233.5	1211.5	1130
1410	1459.5	1193	1008
1315.5	1203	1252	989
1057	1139	938	987
1297	1198	1275	973
1208	1216.5	1109	999
1154	1165.5	1225	1022.5
1186.5	1211.5	1217	1068
1193	1272	1393	1160
1532	1380.5	1197.5	983
1119	1154	1220	767
1351	1333.5	1537	1130
←C	⑤		①→

FIG. 17 (Continuación)

	2462.5	2247	1293.5	1992.5
	2552	2248	1226	1736
	3043	2218	1353.5	1772.5
	2304	1895.5	917	1619.5
	2676	2252	1289	1798
	2385	2254	2714	2759.5
	2493	2052.5	1216	2159
	2653.5	2086	1303	2215.5
	2275.5	1914	1383.5	1774
	2437	2154	1806	2519.5
	2076.5	2154	1324	2008
	2887	2277	1685	2102
	2672	2234	2642	2933
	2631	2201	1846	2153
	2727	2260	2297.5	2626.5
	2380	2167.5	1356.5	2405
	2926.5	2227	2009	2996.5
	2570	2164	1303	1991
	2100.5	2078	1273	1655.5
	2536	2027.5	1308.5	1981.5
	2538.5	2073	1297	1935
	2655	2183.5	1276	2234
	2237	1869.5	1326	1768
	2639	2044.5	1272.5	1788
	2514.5	1901	1198.5	1779
	2509	2100.5	1539.5	2086
	2756	2237	2259	4318
	2252	1761.5	1712	1900
	2315	2038	1326	1757

FIG. 17 (Continuación)

4

00492_655529		32520.5	1035
00492_655567		31602	1066
00492_655528		29826	1039
00492_655557		27151	981.5
00492_655564		25662	877
00492_655582		25377	992
00492_655613		24028.5	1218
00492_655485		21284.5	928
00492_655501		20252	1077
00492_655634		20036	1079
00492_655543		19493	1022
00492_655587		19437	975
00492_655577		18999.5	1113
00492_655633		16266	1014
00492_655594		15210.5	1010
00492_655542		12009	1021
00492_655655		10450	1018
00492_655609		8522	1073.5
00492_655490		7667	1136
00492_655584		6709	1021.5
00492_655487		4646	960

FIG. 17 (Continuación)

Ⓔ

⑤

1151.5	1206	1454	1136.5
1015.5	1183	1250.5	1185.5
1285	1178	1510	1095
1321	1189	1170	923
1114	1130	1400	1000.5
1174.5	1153	1199	957
1566	1448	1323	1116
1380	1170	1175	1052
1206	1145.5	1204.5	1046
2175.5	1472	1252.5	1168
1702.5	1305.5	1319	1008
1089	1137	1065	834
1335	1273	1446	1065
1380.5	1260	1161	1141
1133	1304.5	1119	1029
1646.5	1493	1329	892.5
1211	1190	1192.5	1018
1319	1338.5	1289	1057
1218	1204	1253	938.5
1482	1484.5	1316	989
1571	1163	1158.5	912

← (E)

FIG. 17 (Continuación)

(F) →

↑  
⑥

2536	2199.5	1440.5	2305
2299	2203	1276	1742.5
2622.5	2121.5	1349	1942
2292	1892	1251	1724
2399	1935.5	1214	1623
2510	1922	1194	2507.5
2504	2278	1285	2286
2386	2078.5	1213	2206.5
2456	2211	1309.5	1639
2509	2216	3030.5	4665
2343	2054	2326	2610
2431	2052	1077.5	1520
2680.5	2226	2042	2366
2951	1986	2174	2346
2597	2017	1805.5	2535.5
2466	2195.5	1311.5	2585
2647	2038	1515	2277
2525	2159	1426.5	2049
2763	2213	1385.5	2079
2540	2195	2603.5	2525
2677.5	1989.5	1224	2006

←Ⓣ

FIG. 17 (Continuación)

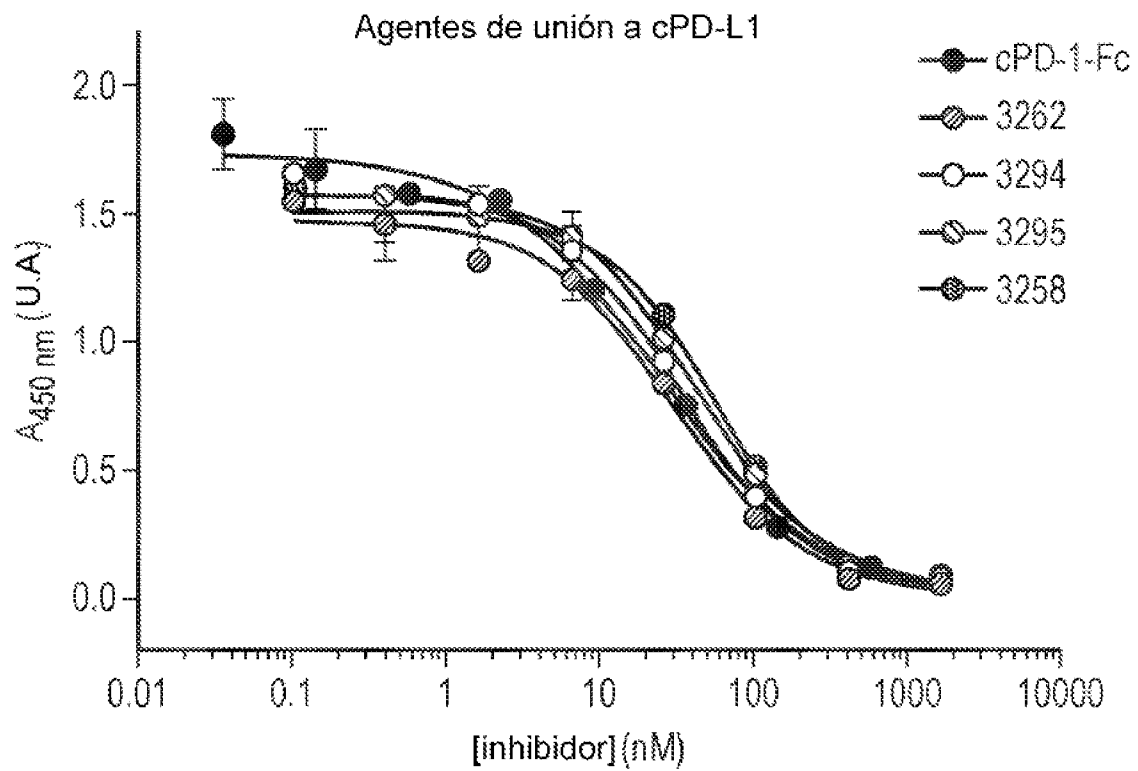


FIG. 18

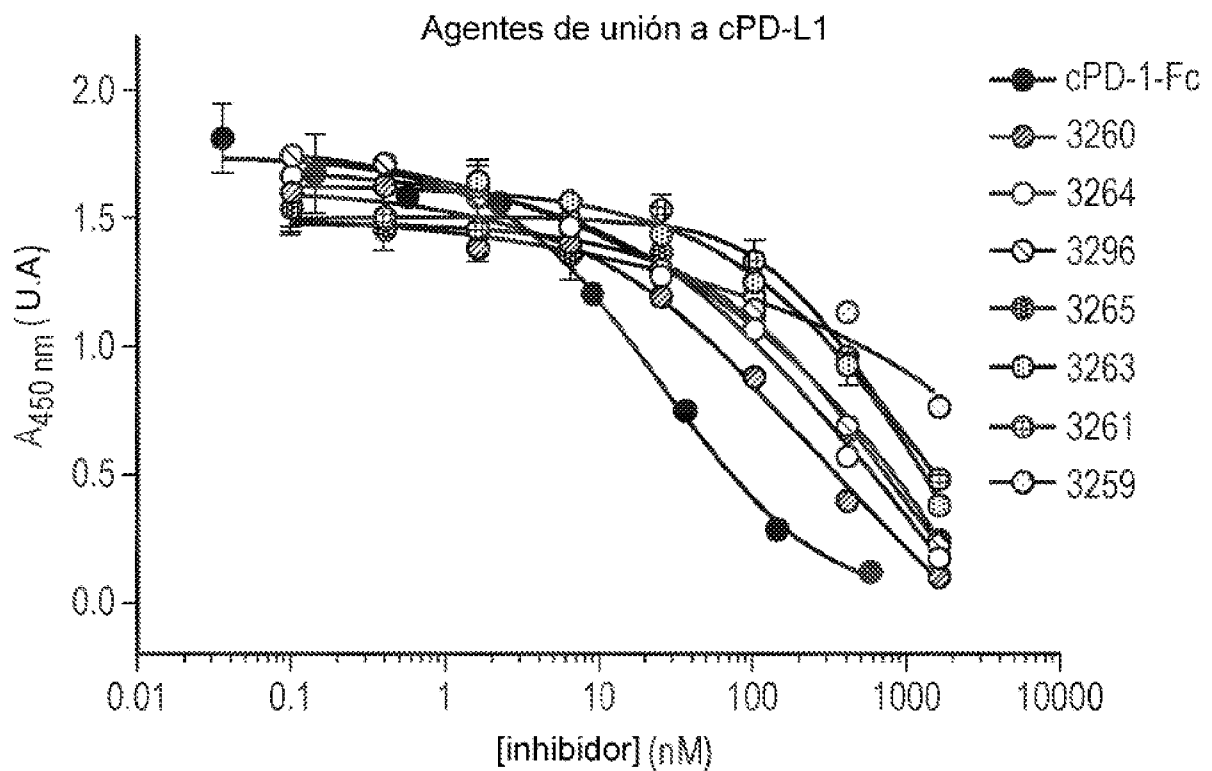


FIG. 19