

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 501**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/113** (2006.01)

**C07K 1/34** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

**C07K 14/78** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2014 PCT/US2014/015658**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014 WO14126871**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2014 E 14706235 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 2956468**

54 Título: **Métodos de replegado de proteínas basados en filtración de flujo tangencial**

30 Prioridad:

**12.02.2013 US 201361763670 P**

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

**24.03.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BLUM, BENJAMIN C. y  
HOLLANDER, CRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 813 501 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

Métodos de replegado de proteínas basados en filtración de flujo tangencial

5 **Referencia cruzada con las solicitudes relacionadas**

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional 61/763.670, presentada el 12 de febrero de 2013.

10 **Antecedentes**

El esqueleto de un anticuerpo, conocido como la región Fc, es responsable de las propiedades farmacocinéticas que pueden ser deseables en el caso de muchos productos biológicos terapéuticos (Jeffries, B. *Biotechnol Prog.* 2005; 21: 11-16). El tamaño de la región Fc la hace resistente a la filtración renal y a la unión al Receptor Neonatal Fc (FcRn), lo que le permite escapar de la degradación endosómica mediante un mecanismo de reciclado. Además de la región Fc, que está presente en los productos terapéuticos de anticuerpos monoclonales, existen productos de fusión Fc que están siendo investigados y desarrollados (Hakim et al. *Mabs.* 2009; 1: 281-287). Las fusiones de Fc son la fusión de una región Fc con otra proteína, péptido o principio activo (API). La fusión Fc tiene, por lo tanto, tanto las propiedades de la región Fc como las propiedades terapéuticas del API.

Existen muchas líneas celulares que son susceptibles de ser usadas para la elaboración de productos biológicos terapéuticos (Jung et al. *Curr Opin Biotechnol.* 2011; 22:1-10). Las líneas celulares de mamífero de ovario de hámster chino (CHO), de insecto Sf9, de levadura *S. cerevisiae* y bacteriana *E. coli* son algunas de las más habituales que son analizadas para la producción de proteínas recombinantes. Hasta ahora se han usado las de levadura, las de CHO y las de *E. coli* para la elaboración de productos biológicos terapéuticos que contienen una Fc, incluyendo un gran número de anticuerpos monoclonales. La expresión en *E. coli* ofrece tres potenciales y significativas ventajas con respecto a la expresión en otras líneas celulares: el tiempo de desarrollo de la línea celular es mucho más corto; las series del biorreactor son hasta 7 veces más cortas, lo que da como resultado una menor inversión de capital; y no hay necesidad de controlar la glicosilación aberrante que puede producirse en los cultivos con células de levadura y de mamífero.

La expresión de proteínas más grandes, como las fusiones de Fc, en *E. coli*, pueden suponer un reto excepcional. *E. coli* carece de las proteínas chaperonas y de otra maquinaria de replegado que se encuentra en un sistema de expresión eucariota. El citoplasma de *E. coli* es también un entorno reductor, que no es favorable para la formación de puentes de disulfuro. La región Fc de los anticuerpos IgG1 humanos contiene seis puentes de disulfuro. Dos puentes de disulfuro en la región de bisagra unen dos cadenas peptídicas para formar la molécula homodímera, y hay dos puentes de disulfuro más en cada una de las cadenas peptídicas. *E. coli* también puede tener un mecanismo para impedir que las proteínas no plegadas interfieran en los procesos normales de la célula. La proteína no plegada es desviada y aislada en agregados insolubles, denominados cuerpos de inclusión (CI), que pueden ser aislados a continuación en la fracción insoluble después de la lisis celular. Alternativamente, cuando se ralentiza la tasa de producción de la proteína recombinante para permitir que la proteína se pliegue, puede añadirse una secuencia líder para dirigir la proteína soluble que es expresada al espacio periplásmico. El periplasma es un entorno oxidante favorable para la formación de puentes de disulfuro. Sin embargo, los niveles de expresión notificados de proteína recombinante en el periplasma siguen siendo bajos (Liu et al. *Protein Expression Purif.* 2008; 62: 15-20).

Por el contrario, se ha notificado que los niveles de expresión en *E. coli* en los CI es elevado. La expresión de la proteína en los CI también tiene las ventajas de una resistencia de la proteína frente a la degradación y una facilidad de aislamiento a partir de las células (Grune et al. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36: 2519-2530). Dado que un CI es un agregado insoluble, la restauración de la proteína de interés a su conformación biológicamente activa puede suponer un reto (Jungbauer et al. *J Biotechnol.* 2006; 587-596). Normalmente, es necesario un proceso para romper y solubilizar los CI. Después, la proteína debe ser renaturalizada, o replegada, en su conformación biológicamente activa minimizando las pérdidas debidas a la agregación y la precipitación. El documento WO2012/142515 desvela el replegado de proteínas de unión de estructura de soporte a base de fibronectina mediante diafiltración a pH 4,5. Los actuales procesos de replegado pueden ser específicos para una proteína dada, lo que requiere una cuidadosa optimización para cada caso. Muchos procesos de replegado requieren unas concentraciones de proteína muy baja, y consecuentemente unos volúmenes mayores para la operación. Esto es difícil debido a que se requiere una mayor cantidad de reactivos potencialmente caros. También existe un reto en el entorno de elaboración, donde existe un límite físico en el tamaño del recipiente que puede usarse para el replegado de las proteínas. Finalmente, en el caso de las fusiones de Fc, los procesos de replegado deben formar correctamente los seis puentes de disulfuro que existen en la forma nativa de la proteína.

**Sumario**

La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que cae fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos. En el presente documento se proporcionan métodos

para el plegado de una proteína desnaturalizada, que comprenden, por ejemplo,

(i) combinar una proteína desnaturalizada (por ejemplo, cuerpos de inclusión (CI)) con un tampón de solubilización que comprende un agente desnaturalizante, para obtener una primera composición de proteína que comprende proteína desnaturalizada solubilizada, en donde la proteína desnaturalizada comprende una región Fc y un dominio de soporte a base de fibronectina;

(ii) diafiltrar la primera composición de proteína que comprende proteína desnaturalizada solubilizada con 2-4 diavolumenes de un tampón de plegado, que tiene un pH en el intervalo de 9 a 11 para obtener una segunda composición de proteína que comprende proteína parcialmente plegada; y (iii) incubar la segunda composición de proteína que comprende proteína parcialmente plegada con un tampón de plegado/oxidación que tiene un pH en el intervalo de 9 a 11 para obtener una tercera composición de proteína que comprende la proteína en un estado plegado. También se proporcionan en el presente documento métodos de plegado de una proteína desnaturalizada, por ejemplo, que está presente en cuerpos de inclusión (CI), que comprenden, por ejemplo, (i) suspender proteína desnaturalizada (por ejemplo, CI) en una solución en suspensión para obtener una composición que comprende proteína desnaturalizada suspendida, en donde la proteína desnaturalizada comprende una región Fc y un dominio de soporte a base de fibronectina;

(ii) combinar la composición que comprende los CI suspendidos con un tampón de solubilización que comprende un agente desnaturalizante para obtener una primera composición de proteína que comprende la proteína desnaturalizada solubilizada; (iii) diafiltrar la primera composición de proteína que comprende proteína desnaturalizada solubilizada con 2-4 diavolumenes de un tampón de plegado que tiene un pH en el intervalo de 9 a 11 para obtener una segunda composición de proteína que comprende proteína parcialmente plegada; y (iv) incubar la segunda composición de proteína que comprende proteína parcialmente plegada con un tampón de plegado/oxidación que tiene un pH en el intervalo de 9 a 11 para obtener una tercera composición de proteína que comprende la proteína en un estado plegado. La incubación de la segunda composición de proteína que comprende proteína parcialmente plegada con un agente de plegado/oxidación puede comprender diafiltrar la segunda composición de proteína con, por ejemplo, 2-6 volúmenes de un tampón de plegado/oxidación. La diafiltración de la primera composición de proteína se puede llevar a cabo al menos en parte con un dispositivo de filtración de flujo tangencial (FFT). La diafiltración de la segunda composición de proteína se puede llevar a cabo, al menos en parte, con un dispositivo de filtración de flujo tangencial (FFT). La diafiltración de la primera composición de proteína se puede llevar a cabo, al menos en parte, con un dispositivo de FFT, y la diafiltración de la segunda composición de proteína se puede llevar a cabo, al menos en parte, con un dispositivo de FFT. La FFT puede funcionar con una presión transmembrana (TMP) entre 10 y 30 PSI. La filtración se puede realizar con una membrana de umbral de peso molecular (UPM) de al menos 5 kDa. La diafiltración se puede realizar con una membrana de UPM de entre 5 kDa y 50 kDa. La diafiltración con tampón de plegado puede durar entre 0,5 a 3 horas. La diafiltración con tampón de plegado/oxidación puede durar entre 0,5 y 3 horas. El tampón de plegado y el tampón de plegado/oxidación tiene un valor de pH de entre pH 9 y 11.

En los métodos descritos en el presente documento, el agente desnaturalizante puede comprender guanidina, el tampón de plegado/oxidación puede comprender un agente oxidante; el agente oxidante puede comprender glutatión; el tampón de plegado puede comprender arginina y/o el tampón de plegado/oxidación puede comprender arginina.

En los métodos descritos en el presente documento, la proteína desnaturalizada puede estar suspendida en la solución en suspensión en una proporción en peso (gramos) de proteína desnaturalizada:volumen (ml) de la solución en suspensión de 1:1-10, por ejemplo, 1:1-5. La solución de suspensión puede consistir esencialmente en agua. El tampón de solubilización puede comprender Tris y guanidina. El tampón de solubilización puede comprender un agente reductor. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización no comprende una cantidad significativa de agente reductor. El tampón de plegado puede comprender Tris.

En los métodos descritos en el presente documento, la composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada se puede diluir 1-10 veces con un tampón de dilución antes de la diafiltración. En ciertas realizaciones, la composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada no se diluye antes de la diafiltración. La composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada se puede filtrar antes de la diafiltración. En ciertas realizaciones, la composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada no se filtra antes de la diafiltración.

Un método descrito en el presente documento puede comprender: (i) combinar proteína desnaturalizada como se describe en las reivindicaciones con un tampón de solubilización que comprende un agente desnaturalizante, para obtener una primera composición de proteína que comprende proteína desnaturalizada solubilizada; (ii) diafiltrar la primera composición de proteína que comprende proteína desnaturalizada solubilizada con 2-4 diavolumenes de un tampón de plegado para obtener una segunda composición de proteína que comprende proteína parcialmente plegada, en donde el tampón de plegado comprende Arginina y tiene un pH entre pH 9-11; y (iii) diafiltrar la segunda composición de proteína que comprende proteína parcialmente plegada con 2-6 diavolumenes de un tampón de plegado / oxidación para obtener una tercera composición de proteína que comprende la proteína en

un estado replegado, en donde el tampón de replegado / oxidación comprende Arginina, un agente oxidante y tiene un pH entre pH 9-11. Un método para replegar una proteína desnaturalizada tal como se define en las reivindicaciones puede comprender (i) suspender la proteína desnaturalizada en una solución en suspensión para obtener una composición que comprende proteína desnaturalizada suspendida; (ii) combinar la composición que comprende proteína desnaturalizada suspendida con un tampón de solubilización que comprende un agente desnaturalizante, para obtener una primera composición de proteína que comprende proteína desnaturalizada solubilizada; (iii) diafiltrar la primera composición de proteína que comprende proteína desnaturalizada solubilizada con 2-4 diavólúmenes de un tampón de replegado para obtener una segunda composición de proteína que comprende proteína parcialmente replegada, en donde el tampón de replegado comprende Arginina y tiene un pH entre pH 9-11; (iv) diafiltrar la segunda composición de proteína que comprende proteína parcialmente replegada con 2-6 diavólúmenes de un tampón de replegado/oxidación para obtener una tercera composición de proteína que comprende la proteína en un estado replegado en el que el tampón de replegado/oxidación comprende Arginina, un agente oxidante y tiene un pH entre pH 9-11. Un método para replegar la proteína desnaturalizada tal como se define en las reivindicaciones en los CI, puede comprender: (i) solubilizar los CI en un tampón de solubilización que comprende un agente desnaturalizante, para obtener una primera composición de proteína que comprende CI solubilizados; (ii) diafiltrar los CI solubilizados con 2-4 diavólúmenes de un tampón de replegado para obtener una segunda composición de proteína que comprende proteína parcialmente replegada, en donde el tampón de replegado comprende arginina y tiene un pH entre pH 9-11; y (iii) diafiltrar la segunda composición de proteína que comprende proteína parcialmente replegada con 2-6 diavólúmenes de un tampón de replegado/oxidación para obtener una tercera composición de proteína que comprende la proteína en un estado replegado en el que el tampón de replegado /oxidación comprende arginina, un agente oxidante y tiene un pH entre pH 9-11. En ciertas realizaciones, el tampón solubilizante y/o el tampón de replegado no comprende un agente reductor.

En ciertas realizaciones, la tercera composición de proteína comprende 1-10 mg/ml de proteína. En ciertas realizaciones, la eficacia de la recuperación es al menos de aproximadamente el 70 %. La proteína que es renaturalizada puede comprender al menos un enlace disulfuro, por ejemplo, un enlace disulfuro intercatenario o un enlace disulfuro intracatenario. La proteína puede comprender una región Fc, que puede comprender una bisagra. La proteína puede comprender un dominio de unión que se une específicamente a una proteína diana, por ejemplo, un dominio de unión de soporte alternativo, por ejemplo, un dominio de soporte alternativo a base de fibronectina, tal como un dominio <sup>10</sup>FN3. Una proteína <sup>10</sup>FN3 se puede fusionar a una región Fc que comprende una bisagra, un dominio CH2 y un CH3.

### Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A y B muestran diagramas de flujo de procesos a modo de ejemplo para replegar proteínas desnaturalizadas, por ejemplo, producidas como cuerpos de inclusión (CI) aislados de *E. coli*. La Figura 1A muestra un proceso en el que la proteína desnaturalizada (por ejemplo, CI, un gránulo de proteína desnaturalizada o proteína que no está en una conformación biológicamente activa) se solubiliza en un tampón desnaturalizante, se diafiltra con un tampón de replegado y tiene un tampón de replegado/oxidación introducido. Cada etapa forma una composición proteica diferente. La Figura 1B muestra un proceso similar en el que la proteína desnaturalizada se suspende primero en solución antes de introducir el tampón desnaturalizante y continuar con el resto del proceso.

La Figura 2 muestra un diagrama de un ejemplo de configuración y trayectoria de flujo de un sistema de filtración de flujo tangencial (FFT) utilizado para la diafiltración. Las flechas indican la dirección del flujo. En el medio, un depósito contiene una solución de proteína que se bombea a través de una membrana TFF. Los componentes de la solución que son más pequeños que el umbral de peso molecular teórico (UPMT) de la membrana pueden atravesar y recolectarse como permeado. Los componentes de la solución más grandes que el UPMT se retienen, junto con una parte de los componentes más pequeños, de nuevo en el depósito de proteínas. El UPMT de membrana está dimensionado para que toda la proteína sea retenida mientras que en cada pasada, una parte de los componentes del tampón pasa al permeado. Para mantener una concentración de proteína constante o casi constante en el reservorio de proteínas, se bombea un nuevo tampón con diferentes componentes en el reservorio de proteínas aproximadamente a la misma velocidad que se excluye el permeado. Cada vez que el tampón de permeado se recoge con un volumen igual a la solución de proteína, se dice que es igual a un diavolumen. A medida que la FFT se ejecuta para más diavólúmenes, los componentes del tampón de la solución de proteína se vuelven más similares al nuevo tampón que al tampón de inicio.

Las Figuras 3A-C muestran que la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de la etapa 1 de replegado está principalmente en forma de un monómero (panel A), mientras que la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de la etapa 2 de replegado está principalmente en forma de un dímero (panel B), lo que confirma que la proteína se replegó. Los paneles A y B muestran la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de las etapas de replegado 1 y 2, respectivamente, (picos etiquetados como "etapa de replegado 1" y "etapa de replegado 2") en comparación con la misma proteína replegada ("estándar"), tal como se visualiza en RP -HPLC. El panel C muestra la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de las etapas de replegado 1 y 2, respectivamente, tal como se visualiza en SDS PAGE. La flecha en el panel C indica la posición del dímero.

La Figura 4 muestra un cromatograma de la unión de la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc replegada a una resina de cromatografía de afinidad de proteína A. El instrumento de cromatografía tiene un detector de UV y un medidor de pH en línea y se representan la absorbancia a 280 nm (A280) y el pH frente al volumen. La proteína se carga

en la columna entre pH 7 y 9. La columna se expulsa y se lava para eliminar la proteína no unida. La columna se eluye con un tampón de pH bajo, que interrumpe la interacción entre la proteína A y el resto Fc. Cualquier proteína que se une a la proteína A se observa y se recoge en el pico A280 que se observa cuando el pH baja.

Las Figuras 5A-C muestran que la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de la etapa 1 de replegado está principalmente en forma de un monómero (panel A), mientras que la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de la etapa 2 de replegado está principalmente en forma de un dímero (panel B), lo que confirma que la proteína se replegó. Los paneles A y B muestran la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de las etapas de replegado 1 y 2, respectivamente, (picos etiquetados como "etapa de replegado 1" y "etapa de replegado 2") en comparación con la misma proteína replegada ("estándar"), tal como se visualiza en RP -HPLC. El panel C muestra la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de las etapas de replegado 1 y 2, respectivamente, tal como se visualiza en SDS PAGE. La flecha en el panel C indica la posición del dímero.

La Figura 6 muestra un cromatograma de la unión de la proteína <sup>10</sup>Fn3 / Fc replegada a una resina de cromatografía de afinidad de proteína A. El instrumento de cromatografía tiene un detector de UV y un medidor de pH en línea y la absorbancia a 280 nm (A280) y el pH se representan frente al volumen. La proteína se carga en la columna entre pH 7 y 9. La columna se expulsa y se lava para eliminar la proteína no unida. La columna se eluye con un tampón de pH bajo, que interrumpe la interacción entre la proteína A y el resto Fc. Cualquier proteína que se une a la proteína A se observa y se recoge en el pico A280 que se observa cuando el pH baja.

Las Figuras 7A-B muestran un sensograma de un experimento de resonancia de plasmón superficial (RPS) que demuestra la unión del resto <sup>10</sup>Fn3 a su diana. Se utiliza una microplaca de RPS con anticuerpos anti-Fc humanos inmovilizados y se permite que la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc replegada se una a los anticuerpos inmovilizados. Poco después del tiempo 0 s, la proteína diana se aplica a la microplaca y la unión de la proteína diana al resto <sup>10</sup>Fn3 genera una respuesta. La proteína diana ya no se aplica en el punto indicado por la flecha. La disociación entre el resto <sup>10</sup>Fn3 y la diana se observa a medida que disminuye la respuesta. Los paneles A y B muestran los resultados cuando hay una alta y baja densidad de anticuerpos anti-Fc humanos inmovilizados, respectivamente.

La Figura 8 muestra una curva de inhibición del crecimiento del tamaño del tumor en función del tiempo, después del tratamiento con la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc replegada; la misma proteína expresada en cultivo de células de mamífero; un control negativo y un anticuerpo de control positivo.

Las Figuras 9A-C muestran que la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de la etapa 1 de replegado está principalmente en forma de un monómero (panel A), mientras que la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de la etapa 2 de replegado está principalmente en forma de un dímero (panel B), lo que confirma que la proteína se replegó. Los paneles A y B muestran la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de las etapas de replegado 1 y 2, respectivamente, (picos etiquetados como "etapa de replegado 1" y "etapa de replegado 2") en comparación con la misma proteína replegada ("estándar"), tal como se visualiza en RP -HPLC. El panel C muestra la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de las etapas de replegado 1 y 2, respectivamente, tal como se visualiza en SDS PAGE. La flecha en el panel C indica la posición del dímero.

La Figura 10 muestra un cromatograma de la unión de la proteína <sup>10</sup>Fn3/ Fc replegada a una resina de cromatografía de afinidad de proteína A. El instrumento de cromatografía tiene un detector de UV y un medidor de pH en línea y la absorbancia a 280 nm (A280) y el pH se representan frente al volumen. La proteína se carga en la columna entre pH 7 y 9. La columna se expulsa y se lava para eliminar la proteína no unida. La columna se eluye con un tampón de pH bajo, que interrumpe la interacción entre la proteína A y el resto Fc. Cualquier proteína que se une a la proteína A se observa y se recoge en el pico A280 que se observa cuando el pH baja.

Las Figuras 11A-C muestran que la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de la etapa 1 de replegado está principalmente en forma de un monómero (panel A), mientras que la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de la etapa 2 de replegado está principalmente en forma de un dímero (panel B), lo que confirma que la proteína se replegó. Los paneles A y B muestran la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de las etapas de replegado 1 y 2, respectivamente, (picos etiquetados como "etapa de replegado 1" y "etapa de replegado 2") en comparación con la misma proteína replegada ("estándar"), tal como se visualiza en RP -HPLC. El panel C muestra la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de las etapas de replegado 1 y 2, respectivamente, tal como se visualiza en SDS PAGE. La flecha en el panel C indica la posición del dímero.

La Figura 12 muestra un cromatograma de la unión de la proteína <sup>10</sup>Fn3/ Fc replegada a una resina de cromatografía de afinidad de proteína A. El instrumento de cromatografía tiene un detector de UV y un medidor de pH en línea y la absorbancia a 280 nm (A280) y el pH se representan frente al volumen. La proteína se carga en la columna entre pH 7 y 9. La columna se expulsa y se lava para eliminar la proteína no unida. La columna se eluye con un tampón de pH bajo, que interrumpe la interacción entre la proteína A y el resto Fc. Cualquier proteína que se une a la proteína A se observa y se recoge en el pico A280 que se observa cuando el pH baja.

La Figura 13 muestra un sensograma de un experimento de resonancia de plasmón superficial (RPS) que demuestra la unión del resto <sup>10</sup>Fn3 a su diana. Se utiliza una microplaca de RPS con anticuerpos anti-Fc humanos inmovilizados y se permite que la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc replegada se una a los anticuerpos inmovilizados. Poco después del tiempo 0 s, la proteína diana se aplica a la microplaca y la unión de la proteína diana al resto <sup>10</sup>Fn3 genera una respuesta. La proteína diana ya no se aplica en el punto indicado por la flecha. La disociación entre el resto <sup>10</sup>Fn3 y la diana se observa a medida que disminuye la respuesta.

Las Figuras 14A y B muestran que la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de la etapa 1 de replegado está principalmente en forma de un monómero (panel A), mientras que la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de la etapa 2 de replegado está principalmente en forma de un dímero, lo que confirma que la proteína fue replegada. Los paneles A y B muestran la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc después de las etapas de replegado 1 y 2, respectivamente, (picos etiquetados como "etapa de replegado 1" y "etapa de replegado 2") en comparación con la misma proteína replegada

("estándar"), tal como se visualiza en RP -HPLC.

La Figura 15 muestra un cromatograma de la unión de la proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 /Fc replegada a una resina de cromatografía de afinidad de proteína A. El instrumento de cromatografía tiene un detector de UV y un medidor de pH en línea y la absorbancia a 280 nm (A280) y el pH se representan frente al volumen. La proteína se carga en la columna entre pH 7 y 9. La columna se expulsa y se lava para eliminar la proteína no unida. La columna se eluye con un tampón de pH bajo, que interrumpe la interacción entre la proteína A y el resto Fc. Cualquier proteína que se une a la proteína A se observa y se recoge en el pico A280 que se observa cuando el pH baja.

### Descripción detallada

En el presente documento se proporcionan métodos para el replegado de proteínas desnaturalizadas, tal como se define en las reivindicaciones, tales como las proteínas que están en forma de cuerpos de inclusión (CI). Los métodos son aplicables a, por ejemplo, proteínas que comprenden al menos un enlace disulfuro, tal como proteínas que comprenden una región o dominio Fc (o porciones de los mismos) de anticuerpos. Un método puede comprender solubilizar proteína desnaturalizada con un agente caotrópico, y renaturalizar la proteína usando filtración de flujo tangencial (FFT). Al contrario que los métodos usados habitualmente para el replegado de proteínas, por ejemplo, a partir de CI, los métodos descritos en el presente documento permiten el replegado de proteínas desnaturalizadas, sin el uso de grandes volúmenes de tampón, generalmente con mayor eficacia, y generalmente en unos periodos de tiempo más cortos que los de los métodos usados habitualmente.

### Definiciones

Por "polipéptido" se entiende cualquier secuencia de dos o más aminoácidos, independientemente de la longitud, la modificación post-traducciona l o la función. Los polipéptidos pueden incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales tales como los descritos en la Patente de EE.UU. n.º 6.559.126. Los polipéptidos también pueden ser modificados mediante cualquiera de diversas formas químicas habituales (por ejemplo, un aminoácido puede estar modificado con un grupo protector; el aminoácido carboxi-terminal puede ser formado en un grupo amida terminal; el residuo amino-terminal puede ser modificado con grupos, por ejemplo, para aumentar la lipofilia; o el polipéptido puede ser glicosilado químicamente o modificado de otro modo para aumentar la estabilidad o la semivida *in vivo*). Las modificaciones de los polipéptidos pueden incluir la unión de otra estructura, tal como un compuesto cíclico u otra molécula, al polipéptido, y también incluyen polipéptidos que contienen uno o más aminoácidos con una configuración alterada (es decir, R o S; o, L o D).

Una "región" de un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 (o fracción), según se usa en el presente documento, se refiere a un bucle (AB, BC, CD, DE, EF y FG), a una hebra β (A, B, C, D, E, F y G), al N-terminal (correspondiente a los residuos de aminoácidos 1-7 de la SEQ ID NO: 1) o al C-terminal (correspondiente a los residuos de aminoácidos 93-101 de la SEQ ID NO: 1) del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humano que tiene la SEQ ID NO: 1.

Un "bucle del polo norte" se refiere a uno cualquiera de los bucles BC, DE y FG de un dominio humano de un décimo de tipo fibronectina 3 (<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3).

Un "bucle del polo sur" se refiere a uno cualquiera de los bucles AB, CD y EF de un dominio humano de un décimo de tipo fibronectina 3 (<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3) dominio.

Una "región de soporte" se refiere a cualquier región que no es un bucle de un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humano. La región de soporte incluye las hebras β A, B, C, D, E, F y G, así como la región N-terminal (los aminoácidos correspondientes a los residuos 1-7 de la SEQ ID NO: 1) y la región C-terminal (los aminoácidos correspondientes a los residuos 93-101 de la SEQ ID NO: 1).

El "porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos" en el presente documento se define como el porcentaje de los residuos de aminoácidos de una secuencia candidato que son idénticos a los residuos de aminoácidos de una secuencia seleccionada, después de la alineación de las secuencias y de la introducción de huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y no considerando ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de la secuencia. La alineación para el propósito de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas formas que están en la pericia de la materia, por ejemplo, usando un programa informático para ordenador disponible públicamente, tal como el programa BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para la medición de la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir una alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Para el propósito del presente documento, sin embargo, los valores del % de identidad en la secuencia de aminoácidos se obtienen como se describe a continuación usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue autorizado por Genentech, Inc., ha sido presentado con documentación de usuario en la Copyright Office de Estados Unidos, Washington D. C., 20559, en la que se ha registrado con el n.º de registro de la Copyright de Estados Unidos TXU510087, y está disponible públicamente a través de Genentech, Inc., South San Francisco, Calif. El programa ALIGN-2 debería ser compilado para su uso con un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital.

Todos los parámetros de comparación de las secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

Para el propósito del presente documento, el % de identidad en las secuencias de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto a una secuencia de aminoácidos B dada (que puede formularse, como alternativa, como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue: 100 veces la fracción X/Y, en la que X es el número de residuos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación de ese programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos de aminoácidos de B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B con respecto a A.

Según se usa en el presente documento, se considera que un residuo de aminoácido en un polipéptido "contribuye a la unión" a un objetivo si (1) se encuentra que cualquiera de los átomos que no son hidrógeno de la cadena lateral o de la cadena principal del residuo está a cinco angstroms de cualquier átomo del objetivo de unión basado en una estructura tridimensional determinada experimentalmente del complejo, y/o (2) una mutación del residuo con respecto a su equivalente en la <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), a alanina, o a un residuo que tiene una cadena lateral con un tamaño similar o menor que el residuo en cuestión, da lugar a un aumento medido en la constante de disociación en equilibrio con respecto al objetivo (por ejemplo, un aumento en la  $k_{on}$ ).

Una "fracción" se refiere a una porción de una proteína. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender varias fracciones. En la presente solicitud, una proteína de fusión comprende una fracción de soporte a base de fibronectina y una fracción de Fc. Una fracción de Fc puede comprender uno o más de un dominio CH2 y un dominio CH3 y una bisagra.

Una "proteína desnaturalizada" se refiere a una proteína que no está plegada adecuadamente (es decir, no tiene la conformación espacial o la estructura tridimensional adecuada). "Desnaturalización" se refiere a un proceso en el que se modifica la conformación activa de la proteína, pero la estructura primaria (cadena de aminoácidos, enlaces peptídicos) de la proteína permanece sin modificar. Para que sea capaz de llevar a cabo su función biológica, una proteína se pliega en una conformación espacial específica, por la acción de interacciones no covalentes tales como interacciones iónicas, fuerzas de Van Der Waals, puentes de hidrógeno y un empaquetamiento hidrófobo. Una proteína que está desnaturalizada (es decir, que no está adecuadamente plegada) puede ser una proteína que no tiene una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria adecuada. La estructura secundaria de una proteína o de un polipéptido se refiere a subestructuras locales muy irregulares, tales como la hélice alfa y la hebra beta o las láminas beta de una proteína. La estructura terciaria de una proteína o de un polipéptido se refiere a la estructura tridimensional de la molécula de proteína individual, en la que el plegado de las hélices alfa y de las láminas beta en un glóbulo compacto está guiado por interacciones hidrófobas no específicas (el enterramiento de residuos hidrófobos con respecto al agua), puentes salinos, puentes de hidrógeno y el estrecho empaquetamiento de las cadenas laterales y los puentes de disulfuro. La estructura cuaternaria de una proteína es la estructura tridimensional de las subunidades de una proteína multi-subunidad. Las subunidades de una proteína se mantienen unidas entre sí por los mismos enlaces que los que mantienen una estructura terciaria de una proteína. Los puentes de disulfuro contribuyen a la estructura terciaria y cuaternaria de una proteína, de un polipéptido o de un polipéptido complejo. Una proteína desnaturalizada puede ser una proteína que contiene cisteínas, pero en la que no hay presentes puentes de disulfuro o se han formado incorrectamente. Las proteínas desnaturalizadas generalmente son insolubles y precipitan desde una solución. La presencia de uno o más puentes de disulfuro en una proteína generalmente hace que su renaturalización desde un estado desnaturalizado sea más difícil. La estructura de la proteína puede ser visualizada o determinada mediante diversas herramientas, por ejemplo, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN), dicroísmo circular y microscopía crioelectrónica.

#### 50 **Métodos para el replegado de proteínas desnaturalizadas**

Cuando las proteínas son expresadas en ciertos sistemas de expresión, son producidas en una forma desnaturalizada y deben ser renaturalizadas, es decir, debe formarse de nuevo su estructura secundaria, terciaria y/o cuaternaria. Por ejemplo, las proteínas expresadas en grandes cantidades en *E. coli* son derivadas a cuerpos de inclusión (CI). Los CI están formados esencialmente por proteínas desnaturalizadas. Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para renaturalizar proteínas no plegadas o plegadas inadecuadamente presentes en los CI. En ciertas realizaciones, los métodos se usan, al menos en parte, para reformar enlaces disulfuro, por ejemplo, enlaces disulfuro intercatenarios o intracatenarios.

Un método puede comprender una etapa durante la cual la proteína desnaturalizada se solubiliza; una etapa durante la cual la proteína desnaturalizada se renaturaliza parcialmente, por ejemplo, forma al menos un monómero parcialmente plegado; y una etapa durante la cual se introduce un sistema de reducción-oxidación para favorecer la formación de enlaces disulfuro, por ejemplo, para formar dímeros unidos por disulfuro. La segunda etapa o ambas, la segunda y la tercera etapa, se pueden realizar con un sistema de intercambio de tampón, por ejemplo, filtración de flujo tangencial (FFT).

Un método para el replegado de una proteína desnaturalizada puede comprender: (i) combinar una proteína desnaturalizada (por ejemplo, los CI) con un tampón de solubilización que comprende un agente desnaturalizante para obtener una primera composición de proteína que comprende la proteína desnaturalizada solubilizada; (ii) diafiltrar la primera composición de proteína que comprende la proteína desnaturalizada solubilizada con tampón de replegado para obtener una segunda composición de proteína que comprende proteína parcialmente plegada; y (iii) combinar la segunda composición de proteína, por ejemplo, mediante diafiltración de la segunda composición de proteína con tampón de replegado/oxidación para obtener una tercera composición que comprende la proteína en un estado replegado tal como se define en las reivindicaciones.

Las etapas de los métodos a modo de ejemplo se establecen en la Figura 1. El Panel A de la Figura 1 muestra un método que comprende: (i) combinar un sedimento de proteína desnaturalizada con tampón de solubilización que comprende un agente desnaturalizante para obtener una primera composición de proteína que comprende proteína desnaturalizada solubilizada; (ii) diafiltrar la primera composición de proteína con tampón de replegado para obtener una segunda composición de proteína; y (iii) combinar, por ejemplo, mediante diafiltración, la segunda composición de proteína con tampón de replegado/oxidación para obtener una tercera composición de proteína que comprende proteína replegada. El Panel B de la Figura 1 muestra un método que comprende: (i) combinar un sedimento de proteína desnaturalizada con una solución en suspensión para obtener la proteína desnaturalizada suspendida; (ii) combinar la proteína desnaturalizada suspendida con un tampón de solubilización que comprende un agente desnaturalizante para obtener una primera composición de proteína que comprende proteína desnaturalizada solubilizada; (iii) combinar, por ejemplo, mediante diafiltración, la primera composición de proteína con un tampón de replegado para obtener una segunda composición de proteína; y (iv) diafiltrar la segunda composición de proteína con tampón de replegado/oxidación para obtener una tercera composición de proteína que comprende la proteína replegada.

En ciertas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento no usan una cantidad significativa de un agente reductor. Un agente reductor es un agente que rompe los puentes de disulfuro reduciendo una o las dos cisteínas del puente de disulfuro que mantiene las cisteínas en un estado reducido (es decir, mantiene los grupos sulfhidrilo libres de forma que los puentes de disulfuro intra- o intermoleculares son escindidos químicamente). Una "cantidad significativa" de un agente reductor es una cantidad que es suficiente para reducir al menos algunos de los puentes de disulfuro de una solución de proteínas, o para mantener al menos algunas cisteínas de una solución de proteínas en un estado o reducido. Algunos ejemplos de agentes reductores incluyen los siguientes: beta-mercaptoetanol (BME), ditioneitol (DTT), ditioneitol (DTE), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), cisteína, cisteamina, tioglicolato, glutatión y borhidruro de sodio. En ciertas realizaciones, no se añade, ni hay presente, un agente reductor, a o en una o más de las siguientes soluciones usadas en los métodos descritos en el presente documento: la solución en suspensión, tal como una solución de CI en suspensión; el tampón de solubilización; y/o el tampón de replegado. En ciertas realizaciones, no se usa ni hay presente un agente reductor en cualquier etapa en los métodos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, la concentración de un agente reductor en cualquier etapa de los métodos descritos en el presente documento es menor de 10 mM, de 1 mM, de 0,1 mM, de  $10^{-2}$  mM, de  $10^{-3}$  mM, de  $10^{-4}$  mM, de  $10^{-5}$  mM o de  $10^{-6}$  mM.

Un método para el replegado de una proteína que está presente en los CI, puede incluir el lavado de los CI, antes de suspenderlos en una solución en suspensión. El lavado de los CI, puede llevarse a cabo, por ejemplo, con un tampón de Tris/HCL, un tampón de fosfato, un tampón de acetato, un tampón de citrato o agua, o una combinación de dos o más de estos, con o sin un detergente, por ejemplo, Triton-X 100.

### **Suspensión de la proteína desnaturalizada**

Los métodos proporcionados en el presente documento pueden comprender combinar proteína desnaturalizada con un tampón de solubilización. En ciertas realizaciones, una proteína desnaturalizada, tal como en forma de un granulado, se combina con tampón de solubilización (que comprende un agente desnaturalizante). En ciertas realizaciones, la proteína desnaturalizada, tal como en forma de gránulo, se suspende en una solución de suspensión antes de combinarse con un tampón de solubilización. Resuspender la proteína desnaturalizada en una solución en suspensión antes de agregar un tampón de solubilización puede mejorar el proceso de renaturalización al resuspender más adecuadamente la proteína desnaturalizada antes de agregar el agente desnaturalizante.

Una proteína desnaturalizada, por ejemplo, una proteína en CI, proteína desnaturalizada que puede estar, por ejemplo, en forma de un sedimento (tal como un sedimento congelado), puede estar suspendida en una solución en suspensión (o tampón). La proteína desnaturalizada puede ser incubada con la solución en suspensión en unas condiciones suficientes para suspender sustancialmente la proteína desnaturalizada. La incubación puede tener lugar en unas condiciones de concentración, tiempo de incubación y temperatura de incubación que permitan la suspensión de la cantidad deseada o de la mayor parte o de sustancialmente toda la proteína desnaturalizada (por ejemplo, de al menos el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %).

En ciertas realizaciones, la solución en suspensión es agua. El agua puede ser, por ejemplo, agua corriente, destilada, bidestilada, agua desionizada, agua con ósmosis inversa o agua con ósmosis inversa/desionizada (RODI).

En ciertas realizaciones, una solución en suspensión comprende unas concentraciones bajas de un tampón, por ejemplo, de TRIS/HCL, por ejemplo, de menos de aproximadamente 10 mM, 1 mM, 0,1 mM o menos de TRIS. Una solución en suspensión puede tener un pH de 6-10, de 6-9, de 6-8, de entre 6,5 y 7,5.

5 En ciertas realizaciones, se pone en contacto un sedimento de la proteína desnaturalizada con una solución en suspensión en una proporción en peso (gramos) de la proteína desnaturalizada (por ejemplo, de los CI):volumen (ml) de la solución en suspensión (por ejemplo, la solución en suspensión de los CI) de 1:1-10; de 1:1-9; de 1:1-8; de 1:1-7; de 1:1-6; de 1:1-5; de 1:1-4; de 1:1-3; de 1:1-2; de 1:1; de 1:2; de 1:3; de 1:4; de 1:5; de 1:6; de 1:7; de 1:8 de 1:9 o de 1:10. En ciertas realizaciones, se pone en contacto un sedimento de la proteína desnaturalizada con una  
10 solución en suspensión en una proporción en peso (gramos) de la proteína desnaturalizada (por ejemplo, de los CI):volumen de la solución en suspensión (por ejemplo, la solución en suspensión de los CI) de 1:1-3. Una proporción entre peso y volumen de "1:3" en este contexto se refiere a una proporción de 1 gramo de proteína desnaturalizada por 3 ml de solución en suspensión. Una proporción entre peso y volumen de "1:1-3" en este contexto se refiere a una proporción de 1 gramo de proteína desnaturalizada por 1-3 ml (por ejemplo, 1 ml, 2 ml o 3  
15 ml y cualquier valor intermedio) de la solución en suspensión. Una proporción entre peso y volumen también puede definirse en kgs:litros. La combinación de las proteínas desnaturalizadas y la solución en suspensión se denomina "reacción de suspensión".

20 La reacción de suspensión puede llevarse a cabo a una temperatura que varía, por ejemplo, entre 2 °C y 40 °C; entre 4 °C y 37 °C; entre 25 °C y 37 °C; a la temperatura ambiente; o entre 4 °C y 25 °C. En un ejemplo de realización, un sedimento de la proteína desnaturalizada, por ejemplo, un sedimento de CI, se suspende en agua a la temperatura ambiente (por ejemplo, a 25 °C) a una proporción de peso (gramos) de sedimento de proteína desnaturalizada: volumen (ml) de solución en suspensión de 1:1-3, tal como de 1:1, de 1:2 o de 1:3.

25 Una reacción de suspensión puede ser incubada, y opcionalmente agitada hasta que la mayor parte o esencialmente toda la proteína desnaturalizada haya sido resuspendida, y opcionalmente se obtiene una suspensión fina. La proporción de la proteínas desnaturalizadas que se suspenden en la solución en suspensión puede determinarse ópticamente. En ciertas realizaciones, la proteína desnaturalizada se incubaba, y opcionalmente se agita,  
30 por ejemplo, durante menos de 1 minuto, en la suspensión tampón. En ciertas realizaciones, la proteína desnaturalizada se incubaba, y opcionalmente se agita, por ejemplo, durante 1-10 minutos; 1-5 minutos o 1-3 minutos en la solución en suspensión. También pueden usarse unos tiempos de incubación más largos, especialmente a unas temperaturas menores.

35 En ciertas realizaciones, un sedimento de la proteína desnaturalizada se suspende en agua a una proporción de peso (gramos) del sedimento de la proteína desnaturalizada : volumen (ml) de solución en suspensión de 1:1-3, por ejemplo, de 1:2, a la temperatura ambiente, y se incubaba a la temperatura ambiente durante 1-3 minutos, para obtener así una composición que comprende una suspensión de proteínas desnaturalizadas. En un ejemplo de realización, un sedimento de los CI se suspende en agua a una proporción entre peso (gramos) de sedimento de proteína desnaturalizada: volumen (ml) de solución en suspensión de 1:1-3, por ejemplo, de 1:2, a la temperatura  
40 ambiente, y se incubaba a la temperatura ambiente durante 1-3 minutos, para obtener así una composición que comprende una suspensión de los CI.

45 En ciertas realizaciones, la solución en suspensión o la reacción de suspensión no comprende una cantidad significativa de agente reductor, como se describe adicionalmente en el presente documento.

### **Solubilización de la proteína desnaturalizada**

50 La proteína desnaturalizada se solubiliza combinándola con un tampón de solubilización que comprende un agente desnaturalizante. Tal como se establece anteriormente, la proteína desnaturalizada puede estar en forma de un sedimento o en la forma de una suspensión cuando se combina con un tampón de solubilización.

55 La proteína desnaturalizada, por ejemplo, los CI, se pueden combinar con un tampón de solubilización para obtener una composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada, por ejemplo, CI solubilizados. La proteína desnaturalizada puede incubarse con un tampón de solubilización en unas condiciones suficientes para solubilizar sustancialmente la proteína. La incubación puede tener lugar en unas condiciones de concentración, tiempo de incubación y temperatura de incubación que permita la solubilización de la cantidad deseada o de la mayor parte o de sustancialmente toda la proteína (por ejemplo, de al menos el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %).

60 En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización comprende uno o más agentes para solubilizar proteínas, tales como agentes desnaturalizantes (o caotrópicos). Los ejemplos de agentes desnaturalizantes incluyen: guanidina (o guanidío), clorhidrato de guanidío, cloruro de guanidío, tiocianato de guanidío, urea, tiourea, perclorato de litio, cloruro de magnesio, fenol, betaína, sarcosina, carbamoil sarcosina, taurina, dimetilsulfóxido (DMSO); alcoholes tales como propanol, butanol y etanol; detergentes, tales como dodecil sulfato de sodio (SDS), N-lauroil sarcosina,  
65 Zwittergentes, sulfobetainas no detergentes (NDSB), TRITON™ X-100, NONIDET™ P-40, la serie TWEEN™ y la serie BRIJ™; hidróxidos tales como hidróxido de sodio y potasio, y combinaciones de los mismos. El agente

desnaturalizante puede estar presente a una concentración a la cual, después de la combinación con la proteína desnaturalizada, se obtiene una composición de proteína y tampón de solubilización y una concentración desnaturalizante del agente desnaturalizante. Ciertas concentraciones de agentes desnaturalizantes no desnaturalizan las proteínas, y estas concentraciones se denominan "concentraciones no desnaturalizantes". Por ejemplo, el guanidinio 6 M es una concentración desnaturalizante de guanidinio, mientras que el guanidinio 1 M no es una concentración desnaturalizante de guanidinio. Del mismo modo, las concentraciones de urea de 1-2 M no se consideran concentraciones desnaturalizantes de urea.

En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización comprende guanidina (o una sal o derivado de la misma) a 2 M a 8 M, 2 M a 7 M o 6 M. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización comprende urea o una sal o derivado de la misma a 1 a 5 M, 1 a 3 M o 2 a 3 M.

En ciertas realizaciones, un tampón de solubilización comprende un agente tamponante adecuado para mantener el pH del tampón de solubilización o el de la composición que comprende el tampón de solubilización y la proteína desnaturalizada ("reacción de solubilización") en un intervalo de pH de entre 7 y 11; 7 y 10; 7 y 9; 8 y 11; 8 y 10. En ciertas realizaciones, el pH es 8 y en otras realizaciones, es 10. Los tampones adecuados incluyen TRIS (Tris[hidroximetil]aminometano), HEPPS (ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[3-propanosulfónico]), CAPSO (ácido 3-[Ciclohexilamino]-2-hidroxi-1-propanosulfónico), AMP (2-amino-2-metil-1-propanol), CAPS (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propansulfónico), CHES (ácido 2-[N-ciclohexilamino] etansulfónico), arginina, lisina y borato de sodio. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización comprende un tampón, por ejemplo, TRIS, a una concentración de entre 1 mM y 1 M; de entre 1 mM y 100 mM; de entre 10 mM y 100 nM; de entre 10 mM y 50 mM; de entre 50 mM y 100 mM; de entre 30 mM y 70 mM; o de entre 40 mM y 60 mM. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización comprende un tampón, por ejemplo, TRIS, a una concentración de aproximadamente 50 mM. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización comprende TRIS, por ejemplo, a 40-60 mM, y tiene un pH en el intervalo de pH de entre 7 y 11.

Un tampón de solubilización también puede comprender un agente que previene la agregación de proteínas, por ejemplo, Arginina (u otro aminoácido cargado positivamente), por ejemplo, L-arginina / HCl (que está incluido en el término "Arginina"). La arginina puede estar presente en concentraciones en el intervalo de 50 mM a 500 mM; 100 mM a 500 mM; 200 mM a 500 mM; 300 mM a 500 mM; 350 mM a 450 mM. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización incluye arginina a una concentración de 300 mM a 400 mM.

El tampón de solubilización puede comprender TRIS y arginina y tiene un pH en el intervalo de entre 7 y 11. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización comprende TRIS a una concentración en el intervalo de entre 10 mM y 100 mM; arginina; y tiene un pH en el intervalo de entre pH 7 y 11. El tampón de solubilización puede comprender TRIS y arginina, en el que la arginina está a una concentración en el intervalo de entre 300 mM y 500 mM; y tiene un pH en el intervalo de entre 7 y 11. El tampón de solubilización puede comprender TRIS a una concentración en el intervalo de entre 10 mM y 100 mM; arginina a una concentración en el intervalo de entre 300 mM y 500 mM; y tiene un pH en el intervalo de entre 7 y 11. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización comprende TRIS a una concentración en el intervalo de entre 30 mM y 70 mM; arginina a una concentración en el intervalo de entre 300 mM y 500 mM; y tiene un pH en el intervalo de pH de entre 7 y 11. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización comprende TRIS a una concentración de aproximadamente 50 mM, arginina a una concentración de aproximadamente 400 mM, y tiene un pH de aproximadamente 8 o 10.

En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización comprende un agente reductor, tal como TCEP. Por ejemplo, un tampón de solubilización puede comprender TCEP a una concentración de 1 mM a 10 mM, por ejemplo, 2 mM. En otras realizaciones, el tampón de solubilización no comprende un agente reductor, o al menos no contiene una cantidad significativa de agente reductor. Por ejemplo, un tampón de solubilización puede contener menos de 10 mM, 5 mM o 1 mM de agente reductor, por ejemplo, TCEP.

En ciertas realizaciones, la proteína desnaturalizada que se va a solubilizar está en la forma de un sedimento, por ejemplo, un sedimento de CI (por ejemplo, CI lavados). Un sedimento de proteína insoluble puede combinarse con un tampón de solubilización a una proporción de peso (gramos) de sedimento de proteína insoluble (por ejemplo, CI): volumen (ml) de tampón de solubilización de 1:5-50; de 1:10-50; de 1:10-30; de 1:15-25. Algunos ejemplos de proporciones incluyen 1:10, 1:20 y 1:30. Por ejemplo, para 1 gramo de proteína desnaturalizada (por ejemplo, que se ha suspendido en la solución en suspensión), pueden añadirse 5-50 ml; 10-50 ml; entre 10 y 30 ml o entre 15 y 25 ml de tampón de solubilización. En otras realizaciones, para 1 kg de proteína desnaturalizada, pueden añadirse 5-50 litros; 10-50 litros; entre 10 y 30 litros o entre 15 y 25 litros de tampón de solubilización.

En ciertas realizaciones, la proteína desnaturalizada que se va a solubilizar está en forma de una suspensión, por ejemplo, una suspensión de CI. Se puede combinar una suspensión de CI insolubles con tampón de solubilización en una proporción de peso (gramos) o volumen (ml) de proteína desnaturalizada (por ejemplo, CI suspendidos): volumen (ml) de tampón de solubilización de 1:5-50; 1:10-50; 1:10-30; 1:15-25. Las proporciones a modo de ejemplo incluyen 1:10, 1:20 y 1:30. Cuando la proteína desnaturalizada está en forma de suspensión, el tampón de solubilización puede comprender concentraciones más altas de ingredientes, por ejemplo, agente desnaturalizante, en relación con el utilizado cuando la proteína desnaturalizada está en forma de un sedimento, para obtener una

concentración final de ingredientes que están en el rango del del tampón de solubilización descrito en el presente documento. Así, por ejemplo, puede ser deseable combinar una suspensión de proteína desnaturalizada con un tampón de solubilización que comprende guanidina 8 M, en lugar de guanidina 6 M que se podría usar con proteína desnaturalizada en forma de un sedimento.

5 La reacción de solubilización (es decir, la composición combinada de proteína desnaturalizada y tampón de solubilización) puede llevarse a cabo a una temperatura que varía, por ejemplo, entre 2 °C y 40 °C; entre 4 °C y 37 °C; entre 25 °C y 37 °C; a la temperatura ambiente; o entre 4 °C y 25 °C. En ciertas realizaciones, la reacción de solubilización se lleva a cabo a la temperatura ambiente (por ejemplo, a 25 °C) a una proporción de peso (gramos) de proteína desnaturalizada (por ejemplo, CI suspendidos): volumen (ml) de de tampón de solubilización de 1:5-50; 1:10-50; 1:10-30; 1:15-25.

15 La composición que comprende la proteína desnaturalizada y el tampón de solubilización (la "reacción de solubilización") se puede incubar, y opcionalmente, se agita, durante un tiempo suficiente para solubilizar esencialmente toda (por ejemplo, al menos el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %) la proteína, por ejemplo, antes de la siguiente etapa. La reacción de solubilización puede incubarse durante menos de 1 minuto; durante entre 1 y 60 minutos; durante entre 1 y 30 minutos; durante entre 1 y 20 minutos; durante entre 1 y 10 minutos; durante entre 1 y 5 minutos; durante entre 1 y 3 minutos; durante entre 1 y 2 minutos; durante entre 2 y 5 minutos o durante entre 2 y 3 minutos, por ejemplo, antes de la adición del tampón de replegado. La reacción de solubilización se lleva a cabo preferentemente durante un periodo de tiempo suficiente para que se solubilice la mayor parte de las proteínas. Esa mayor parte o esencialmente todas las proteínas que han sido solubilizadas en el tampón de solubilización pueden ser determinadas ópticamente. La solución puede ser de color blanquecino, amarillento o amarronado y puede parecer principalmente transparente.

25 En ciertas realizaciones se combinan proteínas desnaturalizadas, por ejemplo, de los CI, y opcionalmente se mezcla, con un tampón de solubilización que comprende TRIS a una concentración en el intervalo de 30 mM a 70 mM; arginina a una concentración en el intervalo de entre 300 mM y 500 mM; y que tiene un pH en el intervalo de entre 7 y 11 en una proporción en peso (gramos) de la proteína desnaturalizada (por ejemplo, CI suspendidos):volumen (ml) de tampón de solubilización de 1:5-50; 1:10-50; 1:10-30; 1:15-25, a la temperatura ambiente; y en la que la incubación se lleva a cabo durante entre 2 y 5 minutos, por ejemplo, diluir y/o filtrar la composición, para obtener así una composición que comprende las proteínas desnaturalizadas solubilizadas, por ejemplo, los CI solubilizados.

35 Después de la incubación de la proteína insoluble con tampón de solubilización, la composición de proteína obtenida (denominada en el presente documento "composición de proteína desnaturalizada solubilizada") puede diluirse 1-10 veces, 2-9 veces, 3 a 7 veces, 4 a 6 veces, por ejemplo, con un tampón. En ciertas realizaciones, la composición de proteína se diluye 4-5 veces con un tampón ("tampón de dilución"). El tampón de dilución puede comprender un agente desnaturalizante, tal como el mismo agente desnaturalizante que estaba presente en el tampón de solubilización. El tampón de dilución puede comprender una concentración de agente desnaturalizante que es inferior a la del tampón de solubilización, tal como para reducir la concentración del agente desnaturalizante por la dilución. Por ejemplo, la concentración del agente desnaturalizante puede reducirse en un 10-50 %, 20-50 %, 30-50 %, 40-50 %, 10-40 %, 10-30 %, 20-40 % o 20-30 % Por ejemplo, si el tampón de solubilización comprende guanidina 6 M, el tampón de dilución puede comprender la misma concentración o una concentración menor de guanidina, tal como 2-5 M, 2,5 a 4,5 M o 3 a 4 M de guanidina. En ciertas realizaciones, el tampón de dilución comprende guanidina 3,5 M. La concentración de guanidina en el tampón de dilución puede ser tal que la concentración final de guanidina en la composición de proteína diluida sea 3-5 M, por ejemplo, 4 M.

50 En ciertas realizaciones, la composición de proteína desnaturalizada solubilizada (tanto si se diluye como si no), se somete a una o más etapas de purificación antes de la siguiente etapa, por ejemplo, cargando en el reservorio de FFT. Por ejemplo, una composición de proteína desnaturalizada solubilizada se puede filtrar, por ejemplo, con un filtro de 0,1 a 10 µm, un filtro de 0,1 a 8 µm, un filtro de 0,1 a 6 µm, un filtro de 0,1 a 5 µm, un filtro de 0,1 a 0,3 µm. En ciertas realizaciones, el filtro es un filtro de 0,2 µm.

### 55 **Replegado de la proteína desnaturalizada usando FFT con tampón de replegado**

El replegado puede tener lugar en condiciones apropiadas para permitir el replegado de la cantidad deseada o de la mayor parte o sustancialmente toda la proteína (por ejemplo, al menos el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %).

60 Para replegar la proteína desnaturalizada solubilizada, un método puede comprender usar un sistema de intercambio de tampón, tal como filtración de flujo tangencial (FFT). Un método puede comprender dos etapas: una primera etapa (primera etapa de replegado) durante la cual se realiza TFF con tampón de replegado, que puede hacer la transición de proteínas resolubilizadas a un monómero reducido parcialmente plegado; y una segunda etapa (o segunda etapa de replegado) durante la cual la proteína de la primera etapa se combina con el tampón de replegado/oxidación, para permitir la formación de enlaces disulfuro, por ejemplo, en un homodímero unido por disulfuro. La segunda etapa puede realizarse usando FFT con tampón de replegado/oxidación tal como se define en

las reivindicaciones.

5 Un método puede comprender una primera etapa de replegado que comprende diafiltrar una composición que comprende proteína desnaturizada solubilizada (diluida o no; filtrada o no) con un tampón de replegado durante un tiempo y bajo condiciones apropiadas para obtener una primera composición de proteína que comprende proteína parcialmente replegada o renaturalizada y en donde la composición proteica está esencialmente desprovista de una concentración desnaturizante del agente desnaturizante, por ejemplo, el agente desnaturizante que estaba presente en el tampón solubilizante.

10 La diafiltración se puede realizar usando un dispositivo de filtración de flujo tangencial (FFT), tal como se muestra, por ejemplo, en la Figura 2. Brevemente, una solución de proteína, por ejemplo, que comprende proteína desnaturizada solubilizada, se carga en un depósito de TFF (etiquetada "proteína" en la Figura 2). La solución de proteína se pasa tangencialmente a través de una membrana, el tampón de permeado atraviesa la membrana, pero la proteína se retiene (es decir, no cruza la membrana) y se devuelve al depósito. Se bombea nuevo tampón al depósito. Cada volumen de tampón que se agrega al depósito se denomina "diavolumen". Las velocidades de flujo del tampón y la solución de proteína se conocen como la velocidad de flujo de alimentación (velocidad a la que se agrega el tampón), la velocidad de flujo del retenido (velocidad a la que la concentración de proteína se mueve a lo largo de la membrana) y la velocidad de flujo del filtrado (velocidad de filtrado que pasa a través de la membrana). La composición en el depósito se puede configurar para permitir una mezcla suave, de modo que haya poca o ninguna separación visible de los tampones (por ejemplo, guanidina que contiene el tampón de resolubilización y el tampón sin guanidina). En ciertas realizaciones, el volumen del reservorio de proteínas se mantiene esencialmente constante. En ciertas realizaciones, el volumen en el reservorio de proteínas varía con el tiempo. Por ejemplo, el volumen puede reducirse con el tiempo para concentrar simultáneamente la solución de proteína.

25 Generalmente, el dispositivo de FFT funciona con una membrana de umbral de peso molecular (UPM) que es menor que el peso molecular de la proteína desnaturizada, por ejemplo, un UPM que es de 1 kDa a 5 kDa, 1 kDa a 10 kDa, 1 kDa a 15 kDa, 1 kDa a 20 kDa, 1 kDa a 30 kDa, 5 kDa a 10 kDa, 5 kDa a 10 kDa, 5 kDa a 15 kDa, 5 kDa a 20 kDa, 5 kDa a 30 kDa, 10 kDa a 15 kDa, 10 kDa a 20 kDa, 10 kDa a 30 kDa, 15 kDa a 20 kDa, 15 kDa a 30 kDa, o 20 kDa a 30 kDa menor que el peso molecular de la proteína desnaturizada. En ciertas realizaciones, el dispositivo de FFT comprende una membrana que tiene un UPM de 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa o 30 kDa o un UPM de 1 kDa a 5 kDa, 1 kDa a 10 kDa, 1 kDa a 15 kDa, 1 kDa a 20 kDa, 1 kDa a 30 kDa, 5 kDa a 10 kDa, 5 kDa a 15 kDa, 5 kDa a 20 kDa, 5 kDa a 30 kDa, 10 kDa a 15 kDa, 10 kDa a 20 kDa, 10 kDa a 30 kDa, 15 kDa a 20 kDa, 15 kDa a 30 kDa o 20 kDa a 30 kDa. En ciertas realizaciones, el dispositivo de FFT comprende una membrana que tiene un UPM de 5 kDa. Se puede usar una membrana que tiene un UPM de 5 kDa, por ejemplo, para proteínas que comprenden un Fc, tales como proteínas de fusión que comprenden un dominio <sup>10</sup>Fn3 unido a un Fc (por ejemplo, un Fc que comprende una bisagra, dominios CH2 y CH3).

La membrana puede ser una membrana seleccionada de uno de varios formatos, como placa plana, espiral enrollada o fibra hueca. En una realización, la membrana es una placa plana.

40 En ciertas realizaciones, un dispositivo de FFT opera con una presión transmembrana (PTM) que da como resultado una velocidad de flujo que es suficiente para replegar parcialmente la proteína y para hacerlo dentro de un marco de tiempo razonable. La PTM utilizada puede depender de la membrana utilizada y, en particular, del UPM de la membrana. En cierta realización, la PTM está entre 5 y 50 PSI, 5 y 40 PSI, 5 y 30 PSI, 10 y 50 PSI, 10 y 40 PSI, 10 y 30 PSI, 15 y 50 PSI, 15 y 40 PSI, 15 y 30, 15 y 20 PSI, 20 y 50 PSI, 20 y 40 PSI, 20 y 30 PSI, o entre 25 y 50 PSI.

La diafiltración con tampón de replegado se puede realizar a una temperatura, por ejemplo, que varía de 2 °C a 40 °C; 4 °C a 37 °C; 25 °C a 37 °C; temperatura ambiente; o de 4 °C a 25 °C.

50 La diafiltración con el tampón de replegado se puede realizar con varios diavolumenes (equivalentes en volumen) de tampón de replegado y durante un tiempo suficiente para reducir la concentración del agente caotrópico (por ejemplo, el agente caotrópico que estaba presente en el tampón solubilizante) a un nivel que esencialmente ya no es desnaturizante. Las concentraciones desnaturizantes varían con los agentes desnaturizantes dados. Por ejemplo, en situaciones en las que el tampón solubilizante contenía guanidina como agente desnaturizante, el número de diavolumenes debería ser suficiente para reducir la concentración de guanidina a menos de 2 M, 1 M, 0.5 M, 100 mM, 50 mM, 10 mM, 5 mM o 1 mM. En ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden proteína desnaturizada solubilizada se pueden diafiltrar con 1-10 diavolumenes de tampón de replegado. En ciertas realizaciones, una composición de proteína se diafiltra con 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 o 1-2, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6 o 4-5 diavolumenes de tampón de replegado. En ciertas realizaciones, una composición de proteína se diafiltra con 2-5, 2-4 o 3 diavolumenes de tampón de replegado.

La diafiltración con el tampón de replegado se puede realizar durante un tiempo suficiente para eliminar la mayor parte del agente desnaturizante que estaba presente en el tampón solubilizante o al menos reducir a concentraciones no desnaturizantes. En ciertas realizaciones, el diafiltrado con tampón de replegado puede tomar de 0,3 horas a 5 horas, 0,3 horas a 4 horas, 0,3 horas a 3 horas, 0,5 horas a 5 horas, 0,5 horas a 4 horas o 0,5

horas a 3 horas.

5 En ciertas realizaciones, un tampón de replegado comprende un agente tamponante adecuado para mantener el pH del tampón de replegado y/o el de la composición que comprende el tampón de replegado y la proteína desnaturalizada (la "reacción de replegado") en un intervalo de pH de entre 9 y 11. El pH del tampón de replegado y/o de la reacción de replegado también puede estar en los siguientes intervalos de pH: 9,5 a 11; 9 a 10,5; 9,5 a 10,5; 9,8 a 10,2, y aproximadamente 10.

10 Un tampón de replegado puede comprender arginina (u otro aminoácido, tal como cisteína), por ejemplo, L-arginina/HCl (que está englobado por el término "arginina"). Un tampón de replegado puede comprender arginina a una concentración que es suficiente para tamponar el tampón de replegado al pH deseado, por ejemplo, a un pH en el intervalo de entre pH 9 y 11; pH de entre 9,5 y qq; 9 y q0,5; 9,5 y 10,5; 9,8 y 10,2 y alrededor de 10. La arginina puede estar presente a unas concentraciones en el intervalo de entre 50 mM y 500 mM; de entre 100 mM y 500 mM; de entre 200 mM y 500 mM; de entre 300 mM y 500 mM; de entre 350 mM y 450 mM. En ciertas realizaciones, el  
15 tampón de replegado incluye arginina a una concentración de entre 300 mM y 400 mM. En ciertas realizaciones, un tampón de replegado comprende arginina a entre 50 mM y 500 mM y tiene un pH en el intervalo de entre 9 y 11. En ciertas realizaciones, un tampón de replegado comprende arginina a entre 200 mM y 500 mM y tiene un pH en el intervalo de entre 9,5 y 10,5.

20 Como la arginina tampona el pH de una solución alrededor de pH de 10, no es necesario incluir otro tampón en el tampón de replegado. Sin embargo, en ciertas realizaciones, se puede incluir uno o más de los siguientes tampones: TRIS (tris[hidroximetil] aminometano), HEPES (ácido N-[2-hidroxiethyl]piperazin-N'-[3-propansulfónico]), CAPSO (ácido 3-[ciclohexilamino]-2-hidroxi-1-propansulfónico), AMP (2-amino-2-metil-1-propanol), CAPS (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propansulfónico), CHES (ácido 2-[N-ciclohexilamino] etansulfónico), arginina, lisina y borato de sodio. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado comprende un tampón, por ejemplo, TRIS, a una  
25 concentración de entre 1 mM y 1 M; de entre 1 mM y 100 mM; de entre 10 mM y 100 nM; de entre 10 mM y 50 mM; de entre 50 mM y 100 mM; de entre 30 mM y 70 mM; o de entre 40 mM y 60 mM. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado comprende un tampón, por ejemplo, TRIS, a una concentración de aproximadamente 50 mM. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado comprende TRIS, por ejemplo, a entre 40-60 mM, y tiene un pH en el  
30 intervalo de pH de entre 9 y 11.

El tampón de replegado puede comprender TRIS y arginina y tiene un pH en el intervalo de pH de entre 9 y 11. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado comprende TRIS a una concentración en el intervalo de entre 10 mM y 100 mM; arginina; y tiene un pH en el intervalo de pH de entre 9 y 11. El tampón de replegado puede comprender  
35 TRIS y arginina, en el que la arginina está a una concentración en el intervalo de entre 300 mM y 500 mM; y tiene un pH en el intervalo de pH de entre 9 y 11. El tampón de replegado puede comprender TRIS a una concentración en el intervalo de entre 10 mM y 100 mM; arginina a una concentración en el intervalo de entre 300 mM y 500 mM; y tiene un pH en el intervalo de pH de entre 9 y 11. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado comprende TRIS a una concentración en el intervalo de entre 30 mM y 70 mM; arginina a una concentración en el intervalo de entre 300 mM  
40 y 500 mM; y tiene un pH en el intervalo de pH de entre 9 y 11. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado comprende TRIS a una concentración de aproximadamente 50 mM, arginina a una concentración de aproximadamente 400 mM, y tiene un pH de aproximadamente 10.

45 Los agentes adicionales que se pueden incluir en el tampón de replegado incluyen: oreos aminoácidos (por ejemplo, glicina) que suprimenn la agregación; azúcares (por ejemplo, sacarosa) que suprimen la agregación; o compuestos orgánicos (por ejemplo, propilenglicol) que suprimen la agregación.

En ciertas realizaciones, el tampón de replegado comprende un agente reductor, por ejemplo, TCEP 10 mM. En  
50 otras realizaciones, el tampón de replegado no comprende un agente reductor, o no comprende una cantidad significativa de agente reductor. Se cree que la exclusión de un agente reductor en esta etapa permite que ciertos enlaces disulfuro permanezcan intactos, facilitando así el replegado de la proteína. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el tampón de replegado no comprende una concentración de agente reductor que sea suficiente para reducir los enlaces disulfuro.

55 En realizaciones a modo de ejemplo, una composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada se diafiltra con 2-4 volúmenes de tampón de replegado durante 0,5 a 3 horas a temperatura ambiente. En ciertas realizaciones, una composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada se diafiltra con 2-4 volúmenes de tampón de replegamiento durante 0,5 a 3 horas a temperatura ambiente, en donde el tampón de replegado tiene un pH de 9 a 11. En ciertas realizaciones, una composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada se diafiltra con 2-4 (por ejemplo, 3) volúmenes de tampón de replegado durante 0,5 a 3 horas a temperatura ambiente, en donde el tampón de replegado tiene un pH de 9 a 11 y comprende arginina. En ciertas realizaciones, una  
60 composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada se diafiltra con 2-4 (por ejemplo, 3) volúmenes de tampón de replegado durante 0,5 a 3 horas a temperatura ambiente, en donde el tampón de replegado tiene un pH de 9 a 11, y en donde el tampón de replegado no comprende un agente reductor.

65 La composición de proteína que se obtiene después de la diafiltración con tampón de replegado, que esencialmente

carece de concentraciones desnaturizantes de agente desnaturizante, se denomina en el presente documento la segunda composición de proteína.

### Replegado de proteína desnaturizada usando FFT con tampón de replegado/oxidación

Después de diafiltrar con tampón de replegado (primera etapa de replegado) para obtener una segunda composición de proteína, la segunda composición de proteína se somete a la segunda etapa de replegado, en la que la segunda composición de proteína se combina, por ejemplo, por diafiltrado, durante un tiempo y bajo condiciones apropiadas para obtener una tercera composición de proteína que comprende proteína replegada o renaturalizada.

Para estimular el replegado de la proteína, la composición que comprende proteína parcialmente replegada (es decir, la segunda composición de proteína) está sujeta a la segunda etapa de replegado, por ejemplo, se diafiltra con un tampón que se oxida, y se denomina en el presente documento "tampón de replegado/oxidación". Un tampón de replegado/oxidación puede comprender un sistema redox que proporciona un entorno oxidante para favorecer la formación de enlaces disulfuro. Para replegar proteínas que no comprenden al menos un enlace disulfuro, no es necesario incluir un sistema redox.

La segunda etapa de replegado con un tampón de replegado/oxidación puede realizarse mediante cualquier técnica para replegar proteínas, por ejemplo, incubando la proteína en condiciones oxidantes para formar enlaces disulfuro. En ciertas realizaciones, una proteína se incubaba con un tampón de replegado/oxidación. En ciertas realizaciones, una proteína se diafiltra con un tampón de replegado/oxidación.

La diafiltración con el tampón de replegado/oxidación se puede realizar con varios diavolumenes de tampón de replegado/oxidación y durante un tiempo suficiente para replegar esencialmente toda la proteína, o al menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o el 99 % de la proteína. "Replegar una proteína" en una composición se refiere a restaurar la estructura tridimensional de la proteína, y puede incluir reformar todos, o esencialmente todos, los enlaces disulfuro intracatenarios e intercatenarios de las proteínas en la composición. Una proteína replegada es generalmente biológicamente activa. Por ejemplo, una proteína <sup>10</sup>Fn3Fc/Fc replegada es una proteína que tiene una cadena Fc funcional y una porción <sup>10</sup>Fn3 funcional. Como se discute adicionalmente en el presente documento, se pueden usar varios métodos para determinar el nivel de replegado (o la estructura) de una proteína.

En ciertas realizaciones, una segunda composición de proteína se puede diafiltrar con 1-10 diavolumenes de tampón de replegado/oxidación. En ciertas realizaciones, una composición de proteína se diafiltra con 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 o 1-2, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6 o 4-5 diavolumenes de tampón de replegado/oxidación. En ciertas realizaciones, una composición de proteína se diafiltra con 2-5, 2-6 o 4 diavolumenes de tampón de replegado/oxidación.

La diafiltración con el tampón de replegado/oxidación se puede realizar durante un tiempo suficiente para replegar la proteína. En ciertas realizaciones, la diafiltración con tampón de replegado/oxidación puede durar de 0,3 horas a 5 horas, 0,3 horas a 4 horas, 0,3 horas a 3 horas, 0,5 horas a 5 horas, 0,5 horas a 4 horas o 0,5 horas a 3 horas.

En ciertas realizaciones, un tampón de replegado/oxidación comprende un agente tamponante adecuado para mantener el pH del tampón de replegado/oxidación o el de la composición que comprende el tampón de replegado/oxidación y la proteína solubilizada (la "reacción de replegado") en un intervalo de pH de 9 a 11. El pH del tampón de replegado/oxidación o la reacción de replegado también puede estar dentro de los siguientes intervalos de pH: pH 9,3 a 10,8; pH 9,5 a 10,5; pH 9,8 a 10,2, por ejemplo, pH 10.

Un tampón de replegado/oxidación puede comprender arginina (u otro aminoácido, tal como cisteína), por ejemplo, L-arginina/HCl (que está abarcado por el término "arginina"). Un tampón de replegado/oxidación puede comprender Arginina a una concentración que sea suficiente para tamponar el tampón de replegado/oxidación al pH deseado, tal como pH 9,3 a 10,8; pH 9,5 a 10,5; pH 9,8 a 10,2, por ejemplo, pH 10. La arginina puede estar presente en concentraciones en el intervalo de 50 mM a 500 mM; 100 mM a 500 mM; 200 mM a 500 mM; 300 mM a 500 mM; 350 mM a 450 mM. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado/oxidación incluye arginina a una concentración de 300 mM a 400 mM. En ciertas realizaciones, un tampón de replegado/oxidación comprende arginina de 50 mM a 500 mM y tiene un pH en el intervalo de 9 a 11. En ciertas realizaciones, un tampón de replegado/oxidación comprende arginina de 200 mM a 500 mM y tiene un pH en el intervalo de 9,5 a 10,5.

Como tampones de arginina, el pH de una solución alrededor de pH 10, no es necesario incluir otro tampón en el tampón de replegado/oxidación. Sin embargo, en ciertas realizaciones, se pueden incluir uno o más de los siguientes tampones: TRIS (Tris [hidroximetil] aminometano), HEPPS (ácido N- [2-hidroxietil] piperazina-N '- [ácido 3-propanosulfónico]), CAPSO (ácido 3- [ciclohexilamino] -2-hidroxi-l-propanosulfónico) , AMP (2-Amino-2-metil-l-propanol), CAPS (ácido 3- [ciclohexilamino] -l-propanosulfónico), CHES (ácido 2- [N-ciclohexilamino] etanosulfónico), arginina, lisina y borato de sodio . En ciertas realizaciones, el tampón de replegado/oxidación incluye un tampón, por ejemplo, TRIS, a una concentración de 1 mM a 1 M; 1 mM a 100 mM; 10 mM a 100 nM; 10 mM a 50 mM; 50 mM a 100 mM; 30 mM a 70 mM; o 40 mM a 60 mM. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado/oxidación

comprende un tampón, por ejemplo, TRIS, a una concentración de aproximadamente 50 mM. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado/oxidación comprende TRIS, por ejemplo, a 40-60 mM, y tiene un pH en el intervalo de pH de 9 a 11.

5 El tampón de replegado/oxidación puede comprender TRIS y Arginina y tener un pH en el intervalo de pH de 9 a 11. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado/oxidación comprende TRIS a una concentración en el intervalo de 10 mM a 100 mM; Arginina; y tiene un pH en el intervalo de pH 9 a 11. El tampón de replegado/oxidación puede comprender TRIS y Arginina, en donde la Arginina está en una concentración en el intervalo de 300 mM a 500 mM; y  
10 tiene un pH en el intervalo de pH 9 a 11. El tampón de replegado/oxidación puede comprender TRIS a una concentración en el intervalo de 10 mM a 100 mM; Arginina a una concentración en el intervalo de 300 mM a 500 mM; y tiene un pH en el intervalo de pH 9 a 11. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado/oxidación comprende TRIS a una concentración en el intervalo de 30 mM a 70 mM; Arginina a una concentración en el intervalo de 300 mM a 500 mM; y tiene un pH en el intervalo de pH 9 a 11. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado/oxidación comprende TRIS a una concentración de aproximadamente 50 mM, arginina a una  
15 concentración de aproximadamente 400 mM, y tiene un pH de aproximadamente 10.

Los agentes adicionales que pueden incluirse en el tampón de replegado/oxidación incluyen: otros aminoácidos (por ejemplo, glicina) que suprimen la agregación; azúcares (por ejemplo, sacarosa) que suprimen la agregación; o compuestos orgánicos (por ejemplo, propilenglicol) que suprimen la agregación.

20 El tampón de replegado/oxidación también puede comprender un agente oxidante para facilitar la formación de los puentes de disulfuro. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado/oxidación comprende glutatión, por ejemplo, en una proporción entre glutatión oxidado:glutatión reducido de aproximadamente 5:1 o una proporción similar suficiente para facilitar la formación de los puentes de disulfuro. En ciertas realizaciones, un tampón de replegado/oxidación comprende entre 0,1 mM y 10 mM de glutatión oxidado y entre 0,02 mM y 2 mM de glutatión  
25 reducido. En ciertas realizaciones, un tampón de replegado/oxidación comprende entre 0,5 mM y 2 mM de glutatión oxidado y entre 0,1 y 0,4 mM de glutatión reducido. En ciertas realizaciones, un tampón de replegado/oxidación comprende aproximadamente 1 mM de glutatión oxidado y aproximadamente 0,2 mM de glutatión reducido. Otros agentes oxidantes que se pueden usar incluyen: cisteína y cistina; o cistina o glutatión oxidado con otro agente reductor (por ejemplo, DTT, TCEP).  
30

La diafiltración con tampón de replegado/oxidación puede llevarse a cabo a una temperatura que varía, por ejemplo, entre 2 °C y 40 °C; entre 4 °C y 37 °C; entre 25 °C y 37 °C; a la temperatura ambiente; o entre 4 °C y 25 °C.

35 En ciertas realizaciones, una composición que comprende proteína parcialmente replegada (segunda composición de proteína) se diafiltra con 2-6 volúmenes de tampón de replegado/oxidación durante 0,5 a 3 horas a temperatura ambiente. En ciertas realizaciones, una composición que comprende proteína parcialmente replegada (segunda composición de proteína) se diafiltra con 4-6 volúmenes de tampón de replegado durante 0,5 a 3 horas a temperatura ambiente, en donde el tampón de replegado/oxidación tiene un pH de 9 a 11. En ciertas realizaciones,  
40 una composición que comprende proteína parcialmente replegada (segunda composición de proteína) se diafiltra con 2-6 volúmenes de tampón de replegado/oxidación durante 0,5 a 3 horas a temperatura ambiente, en donde el tampón de replegado/oxidación tiene un pH de 8 a 11 y comprende arginina. En ciertas realizaciones, una composición que comprende proteína parcialmente replegada (segunda composición de proteína) se diafiltra con 2-6 volúmenes de tampón de replegado/oxidación durante 0,5 a 3 horas a temperatura ambiente, en donde el tampón de replegado/oxidación tiene un pH de 9 a 11, y en donde el tampón de replegado comprende glutatión.  
45

Después del ajuste a un pH menor, la mezcla de reacción puede incubarse durante entre 30 minutos y 3 horas; durante entre 30 minutos y 2 horas, antes de una siguiente etapa, por ejemplo, una etapa de purificación. La proteína replegada puede ser procesada adicionalmente, por ejemplo, purificada, según los métodos conocidos en la materia, por ejemplo, usando una cromatografía de la proteína A y otros tipos de cromatografía o de métodos de purificación.  
50

La concentración de proteína antes, durante y después de la diafiltración puede ser de desde 1 mg/ml o menos hasta al menos 10 mg/ml. Por ejemplo, la concentración de proteína puede ser de aproximadamente 5 mg/ml, de 6 mg/ml, de 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml o 10 mg/ml durante la solubilización, diafiltrando con tampón de replegado y diafiltrando con tampón de replegado/oxidación.  
55

El replegado se puede analizar con SE-HPLC, RP-HPLC/MS y SDS-SAGE. En ciertas realizaciones, la recuperación total de proteína replegada según se describe en el presente documento puede ser al menos el 70 %, 80 %, 85 %, o 90 % medida mediante una cromatografía en fase inversa. En ciertas realizaciones, la pureza final, tal como se determina mediante SEC fue al menos el 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 %.  
60

Durante la expresión y la purificación estándar de la proteína recombinante que comprende un Fc, el puente de disulfuro de la región CH3 (bucle CH3) es uniforme en aproximadamente un 1-3 % de la composición de la proteína. Usando ciertos métodos descritos en el presente documento, también se ha demostrado que el bucle CH3 abierto está en el intervalo del 1-3 % en las proteínas replegadas. Consecuentemente, algunas composiciones de proteínas  
65

que contienen un Fc, en las que las proteínas han sido replegadas según se describe en el presente documento, tienen menos del 5 %, del 4 %, del 3 %, del 2 %, del 1 % de bucles CH3 abiertos.

5 En ciertas realizaciones, el replegado de la proteína desnaturalizada, por ejemplo, a partir de un CI, se lleva a cabo en menos de 4 horas, de 3 horas o de 2 horas.

### Ejemplos de métodos

10 Un método para replegar proteína desnaturalizada, por ejemplo, en forma de un CI, puede comprender: (i) combinar (y opcionalmente mezclar) proteína desnaturalizada con un tampón de solubilización que comprende 4 a 8 M de guanidina, TRIS a una concentración en el intervalo de 30 mM a 70 mM; y que tiene un pH en el intervalo de pH 7 a 10; en una proporción de peso (gramos) de proteína desnaturalizada: volumen (ml) de tampón de solubilización de 1: 5-50, en el que la incubación se realiza a temperatura ambiente durante 1 a 120 minutos, para obtener de ese modo una composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada; (ii) diafiltrar la composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada con 2-4 diavolumenes de tampón de replegado que comprende Arginina a una concentración en el intervalo de 300 mM a 500 mM; opcionalmente TRIS a una concentración en el intervalo de 30 mM a 70 mM; y que tiene un pH en el intervalo de pH 9 a 11; y (iii) combinar la composición que comprende proteína parcialmente replegada con tampón de replegado/oxidación; y en donde el método no comprende el uso de una cantidad significativa de un agente reductor (que no sea glutatión reducido).

20 Un método para replegar proteína desnaturalizada, por ejemplo, en forma de un CI, puede comprender: (i) combinar (y opcionalmente mezclar) proteína desnaturalizada con un tampón de solubilización que comprende 4 a 8 M de guanidina, TRIS a una concentración en el intervalo de 30 mM a 70 mM; y que tiene un pH en el intervalo de pH 7 a 10; en una proporción de peso (gramos) de proteína desnaturalizada: volumen (ml) de tampón de solubilización de 1: 5-50, en el que la incubación se realiza a temperatura ambiente durante 1 a 120 minutos, para obtener de ese modo una composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada; (ii) diafiltrar la composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada con 2-4 diavolumenes de tampón de replegado que comprende Arginina a una concentración en el intervalo de 300 mM a 500 mM; opcionalmente TRIS a una concentración en el intervalo de 30 mM a 70 mM; y que tiene un pH en el intervalo de pH 9 a 11; y (iii) diafiltrar la composición que comprende proteína parcialmente replegada con 2-6 diavolumenes de tampón de replegado/oxidación que comprende Arginina a una concentración en el intervalo de 300 mM a 500 mM; opcionalmente TRIS a una concentración en el intervalo de 30 mM a 70 mM; glutatión oxidado a una concentración en el intervalo de 0,5 mM a 2 mM; glutatión reducido a una concentración en el intervalo de 0,1 mM a 0,4 mM; y que tiene un pH en el intervalo de pH 9 a 11; y en donde el método no comprende el uso de una cantidad significativa de un agente reductor (que no sea glutatión reducido).

40 Un método para el replegado de una proteína desnaturalizada, por ejemplo, a partir de un CI, puede comprender: (i) suspender un sedimento de una proteína desnaturalizada, por ejemplo, un sedimento de CI, en una solución en suspensión (por ejemplo, agua) a una proporción en peso o volumen de sedimento de proteína desnaturalizada:volumen de solución en suspensión de 1:1-5 a la temperatura ambiente durante 1-60 minutos, para obtener así una composición que comprende una suspensión de proteína desnaturalizada; (ii) combinar (y opcionalmente mezclar) la composición que comprende una suspensión de proteína desnaturalizada con un tampón de solubilización que comprende guanidina 4 a 6 M, TRIS a una concentración en el intervalo de 30 mM a 70 mM; y que tiene un pH en el intervalo de pH 7 a 10; a una proporción de peso (gramos) de proteína desnaturalizada: volumen (ml) de tampón de solubilización de 1:5-50; en el que la incubación se lleva a cabo a la temperatura ambiente durante 1 a 60 minutos para obtener así una composición que comprende la proteína solubilizada desnaturalizada; (iii) diafiltrar la composición que comprende la proteína solubilizada desnaturalizada con 2-4 diavolumenes de tampón de replegado que comprende arginina a una concentración en el intervalo de 300 mM y 500 mM; opcionalmente TRIS a una concentración en el intervalo de entre 30 mM y 70 mM; y que tiene un pH en el intervalo de pH 9 a 11; a una proporción de peso (gramos) de proteína desnaturalizada: volumen de tampón de replegado (ml) de 1:5-50; y (iv) combinar la composición que comprende proteína parcialmente replegada con tampón de replegado/oxidación; y en el que el método no comprende el uso de una cantidad significativa de un agente reductor (distinto al glutatión reducido).

55 Un método para el replegado de una proteína desnaturalizada, por ejemplo, a partir de un CI, puede comprender: (i) suspender un sedimento de proteína desnaturalizada, por ejemplo, un sedimento de CI, en solución de suspensión (por ejemplo, agua) a una proporción de peso o volumen de sedimento de proteína desnaturalizada:volumen de solución de suspensión de 1:1-5 a la temperatura ambiente durante 1-60 minutos, para obtener así una composición que comprende una suspensión de proteína desnaturalizada; (ii) combinar (y opcionalmente mezclar) la composición que comprende una suspensión de proteína desnaturalizada con un tampón de solubilización que comprende guanidina 4 a 6 M, TRIS a una concentración en el intervalo de entre 30 mM y 70 mM; y que tiene un pH en el intervalo de pH de entre 7 y 10; en una proporción de peso (gramos) de proteína desnaturalizada: volumen (ml) de tampón de solubilización de 1: 5-50; en donde la incubación se realiza a temperatura ambiente durante 1 a 60 minutos, para obtener de ese modo una composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada; (iii) diafiltrar la composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada con 2-4 diavolumenes de tampón de replegado que comprende Arginina a una concentración en el intervalo de 300 mM a 500 mM; opcionalmente TRIS a

una concentración en el rango de 30 mM a 70 mM; y que tiene un pH en el intervalo de pH 9 a 11; en una proporción de peso (gramos) de proteína desnaturalizada: volumen de tampón de replegado (ml) de 1: 5-50; y (iv) diafiltrar la composición que comprende proteína parcialmente replegada con 2-6 diavolumenes de tampón de replegado/oxidación que comprende Arginina a una concentración en el intervalo de 300 mM a 500 mM; opcionalmente TRIS a una concentración en el intervalo de 30 mM a 70 mM; glutatión oxidado a una concentración en el intervalo de 0,5 mM a 2 mM; glutatión reducido a una concentración en el intervalo de 0,1 mM a 0,4 mM; y que tiene un pH en el intervalo de pH 9 a 11; y en donde el método no comprende el uso de una cantidad significativa de un agente reductor (que no sea glutatión reducido).

Un método para replegar proteína desnaturalizada, por ejemplo, en forma de un CI, puede comprender: (i) combinar (y opcionalmente mezclar) proteína desnaturalizada con un tampón de solubilización que comprende guanidina 6 M, TRIS 50 mM, pH 8; en una proporción de peso (gramos) de proteína desnaturalizada: volumen (ml) de tampón de solubilización de 1: 10-30, en el que la incubación se realiza a temperatura ambiente durante 60 minutos, para obtener de ese modo una composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada; (ii) diafiltrar la composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada con 3 diavolumenes de tampón de replegado que comprende Arginina 400 mM; opcionalmente TRIS 50 mM a pH 10; y que tiene un pH de aproximadamente 10; y (iii) combinar la composición que comprende proteína parcialmente replegada con tampón de replegado/oxidación; y en el que el método no comprende usar una cantidad significativa de un agente reductor (que no sea glutatión reducido).

Un método para replegar proteína desnaturalizada, por ejemplo, en la forma de un CI, puede comprender: (i) combinar (y opcionalmente mezclar) proteína desnaturalizada con un tampón de solubilización que comprende guanidina 6M, TRIS 50 M a pH 8; en una proporción en peso (gramos) de la proteína desnaturalizada:volumen (ml) de tampón de solubilización de 1:10-30, en el que la incubación se lleva a cabo a la temperatura ambiente durante 60 minutos, para obtener así una composición que comprende la proteína solubilizada desnaturalizada; (iii) diafiltrar la composición que comprende la proteína solubilizada desnaturalizada con e-3 diavolumenes de tampón de replegado que comprende arginina 400 mM;opcionalmente TRIS 50M a pH 10; y que tiene un pH de aproximadamente 10; y (iii) diafiltrar la composición que comprende proteína parcialmente replegada con 4 diavolumenes de tampón de replegado/oxidación que comprende arginina 400 mM; opcionalmente TRIS 50 mM a pH 10; glutatión oxidado (GSSG) 1 mM; glutatión reducido (GSH) 0,2 mM; y que tiene un pH de aproximadamente 10; y en el que el método no comprende el uso de una cantidad significativa de un agente reductor (diferente al glutatión reducido).

Un método para replegar una proteína desnaturalizada, por ejemplo, a partir de un CI, puede comprender: (i) suspender un sedimento de proteína desnaturalizada, por ejemplo, un sedimento de CI, en solución de suspensión (por ejemplo, agua) en una proporción de peso (gramos) o volumen (ml) de sedimento de proteína desnaturalizada: volumen (ml) de solución de suspensión de 1: 1-5 a temperatura ambiente durante 1-60 minutos para obtener de ese modo una composición que comprende una suspensión de proteína desnaturalizada; (ii) combinar (y opcionalmente mezclar) proteína desnaturalizada con un tampón de solubilización que comprende guanidina 6 M, TRIS 50 mM, pH 8; en una proporción de peso de proteína desnaturalizada: volumen de tampón de solubilización de 1:10-50, en el que la incubación se realiza a temperatura ambiente durante 60 minutos, para obtener de ese modo una composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada; (iii) diafiltrar la composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada con 3 diavolumenes de tampón de replegado que comprende Arginina 400 mM; opcionalmente TRIS 50 mM a pH 10; y (iv) combinar la composición que comprende el tampón de replegado de proteínas/oxidación parcialmente replegado; y en el que el método no comprende usar una cantidad significativa de un agente reductor (distinto del glutatión reducido).

Un método para replegar una proteína desnaturalizada, por ejemplo, a partir de un CI, puede comprender: (i) suspender un sedimento de proteína desnaturalizada, por ejemplo, un sedimento de CI, en solución de suspensión (por ejemplo, agua) en una proporción de peso (gramos) o volumen (ml) de gránulo de proteína desnaturalizada: volumen (ml) de solución de suspensión de 1: 1-5 a temperatura ambiente durante 1-60 minutos para obtener de ese modo una composición que comprende una suspensión de proteína desnaturalizada; (ii) combinar (y opcionalmente mezclar) proteína desnaturalizada con un tampón de solubilización que comprende guanidina 6 M, TRIS 50 mM, pH 8; en una proporción de peso de proteína desnaturalizada: volumen de tampón de solubilización de 1: 10-50, en el que la incubación se realiza a temperatura ambiente durante 60 minutos, para obtener de ese modo una composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada; (iii) diafiltrar la composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada con 3 diavolumenes de tampón de replegado que comprende Arginina 400 mM; opcionalmente TRIS 50 mM a pH 10; y (iv) diafiltrar la composición que comprende proteína parcialmente replegada con 4 diavolumenes de tampón de replegado/oxidación que comprende Arginina 400 mM; opcionalmente TRIS 50 mM a pH 10; Glutatión oxidado 1 mM (GSSG); Glutatión reducido 0,2 mM (GSH); y en donde el método no comprende usar una cantidad significativa de un agente reductor (diferente al glutatión reducido).

### Ejemplos de proteínas

Las proteínas que pueden ser replegadas a partir de un estado desnaturalizado, por ejemplo, a partir de un CI, usando los métodos descritos en el presente documento, incluyen cualquier proteína que esté en una forma

desnaturalizada, por ejemplo, las proteínas que comprenden al menos un puente de disulfuro en su estado nativo. Las proteínas sin puentes de disulfuro también pueden ser replegadas según se describe en el presente documento. Las proteínas pueden comprender un dominio de unión que se une específicamente a una proteína objetivo. Una proteína puede ser una proteína natural o una modificada genéticamente, o una proteína de fusión. Un ejemplo de proteína que puede ser replegada según se describe en el presente documento es una proteína que contiene una proteína Fc, tal como una Fc fusionada con un dominio heterólogo (por ejemplo, un dominio no Fc o no anticuerpo). Una proteína heteróloga puede ser cualquier proteína, incluyendo una porción de unión al antígeno de un anticuerpo, y los derivados de la misma, por ejemplo, Fab, scFv, scFv biespecíficos, anticuerpos de dominio único ("sdAb") (por ejemplo, V<sub>H</sub>H o anticuerpos de camélido y V<sub>NAR</sub>), diacuerpos (dAb), diacuerpos de cadena única (scDb), Darpin, anticalinas y soportes a base de fibronectina, tales como <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3, Fibcon y Tencon. Un anticuerpo completo también puede ser replegado según se describe en el presente documento. Las proteínas heterólogas unidas a un Fc también pueden no estar relacionadas con anticuerpos, y pueden ser, por ejemplo, TsNFR.

### Soportes a base de fibronectina

Según se usa en el presente documento, una proteína o una fracción de "soporte a base de fibronectina" o "FBS" se refiere a proteínas o a fracciones que están basadas en una repetición de tipo fibronectina III ("Fn3"). La Fn3 es un pequeño dominio (de aproximadamente 10 kDa) que tiene la estructura de un pliegue de inmunoglobulina (Ig) (es decir, una estructura en sándwich β de tipo Ig, que consiste en siete hebras β y seis bucles). La fibronectina tiene 18 repeticiones Fn3, y aunque la homología en la secuencia entre las repeticiones es baja, todas ellas comparten una elevada similitud en la estructura terciaria. Los dominios Fn3 también están presentes en muchas proteínas distintas a la fibronectina, tales como moléculas de adhesión, moléculas de la superficie celular, por ejemplo, receptores de citocinas y dominios de unión a carbohidratos. Para revisiones, véase Bork & Doolittle, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 89 (19): 8990-4 (1992); Bork et al., J Mol Biol. 242 (4): 309-20 (1994); Campbell & Spitzfaden, Structure 2 (5): 333-7 (1994); Harpez & Chotia, J Mol Biol. 238 (4): 528-39 (1994)). El término proteína o fracción de "soporte a base de fibronectina" pretende incluir los soportes basados en dominios Fn3 a partir de estas otras proteínas (es decir, de moléculas que no son fibronectina).

Un ejemplo de proteínas de soporte a base de fibronectina son las Adnectinas (Adnexus, un subsidiario de propiedad completa de Bristol-Myers Squibb). Se ha demostrado que las regiones de bucle de tipo CDR de los soportes a base de fibronectina pueden ser modificados para evolucionar en una proteína capaz de unirse a cualquier compuesto de interés. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. n.º 7.115.396 describe proteínas del dominio Fn3 en las que las alteraciones en los bucles BC, DE y FG dan como resultado aglutinantes con una elevada afinidad por el TNFα. La Patente de EE.UU. n.º 7.858.739 describe proteínas del dominio Fn3 en las que las alteraciones en los bucles BC, DE y FG dan como resultado aglutinantes con una elevada afinidad por el VEGFR2.

Un dominio Fn3 es pequeño, monomérico, soluble y estable. Carece de puentes de disulfuro, y por lo tanto es estable en condiciones reductoras. Los dominios Fn3 comprenden, con objeto de formar desde el N-terminal hacia el C-terminal, una hebra beta o de tipo beta, A; un bucle, AB; una hebra beta o de tipo beta, B; un bucle, BC; una hebra beta o de tipo beta, C; un bucle, CD; una hebra beta o de tipo beta, D; un bucle, DE; una hebra beta o de tipo beta, E; un bucle, EF; una hebra beta o de tipo beta, F; un bucle, FG; y una hebra beta o de tipo beta, G. Las siete hebras β antiparalelas están dispuestas en forma de dos láminas beta que forman un núcleo estable, creando "caras" formadas por los bucles que conectan las hebras beta o de tipo beta. Los bucles AB, CD y EF están ubicados en una cara ("el polo sur") y los bucles BC, DE y FG están ubicados en la cara opuesta ("el polo norte"). Cualquiera o todos los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG pueden participar en la unión al ligando.

En algunos ejemplos de realizaciones, las fracciones de soporte a base de fibronectina de unión al ligando descritas en el presente documento se basan en el décimo dominio de fibronectina de tipo III, es decir, el décimo módulo del Fn3 (<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3). La secuencia de aminoácidos del <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humano natural (con la cola N-terminal (en cursiva)) se establece en la SEQ ID NO: 1:

*VSDVPRDLEVVAAT***PTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKS**

**TATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDS****PASSK****PISIN****YRTEIDKPSQ** (SEQ ID NO: 1)

(los bucles AB, CD y EF están subrayados; los bucles BC, FG y DE están destacados en negrita; las hebras β están ubicadas entre cada una de las regiones de bucle; y las regiones N-terminal y C-terminal se muestran en cursiva). El <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural sin la cola establecido en cursiva en la SEQ ID NO: 1 se proporciona como la SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones, el bucle AB se corresponde con los residuos 14-17, el bucle BC se corresponde con los residuos 23-31, el bucle CD se corresponde con los residuos 37-47, el bucle DE se corresponde con los residuos 51-56, el bucle EF se corresponde con los residuos 63-67, y el bucle FG se corresponde con los residuos 75-87 de la SEQ ID NO: 1. Los bucles BC, DE y FG se alinean a lo largo de una cara de la molécula, es decir, el "polo norte", y los bucles AB, CD y EF se alinean a lo largo de la cara opuesta de la molécula, es decir, el "polo sur". En la SEQ ID NO: 1, la hebra β A se corresponde con los residuos 8-13, la hebra β B se corresponde con los residuos 18-22, la hebra β C se corresponde con los residuos 32-36, la hebra beta D se corresponde con los residuos 48-50, la hebra β E se corresponde con los residuos 57-62, la hebra β F se corresponde con los residuos 68-74, y la hebra β G se

corresponde con los residuos 88-92. Las hebras  $\beta$  están conectadas entre sí a través del correspondiente bucle, por ejemplo, las hebras A y B están conectadas a través de un bucle AB en la formación de la hebra  $\beta$  A, el bucle AB, la hebra  $\beta$  B, etc. Las regiones N-terminal y/o C-terminal de la SEQ ID NO: 1 (en cursiva más arriba), pueden estar eliminadas o alteradas para generar una molécula que conserva la actividad biológica y que comprende, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2-16. En ciertas realizaciones, los primeros 8 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y/o los últimos 7 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (es decir, los residuos de aminoácidos 1-8 y 95-101 de la SEQ ID NO: 1, respectivamente) puede estar eliminados o alterados para generar un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

Según se ha descrito más arriba, los residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos 14-17, 23-31, 37-47, 51-56, 63-67 y 75-87 de la SEQ ID NO: 1 definen los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG, respectivamente. Sin embargo, debería entenderse que no se necesita modificar todos los residuos de una región de bucle con objeto de conseguir un dominio de unión  $^{10}\text{Fn3}$  que tenga una fuerte afinidad por un objetivo deseado. Adicionalmente, también pueden realizarse inserciones y deleciones en las regiones de bucle produciendo todavía unos dominios de unión  $^{10}\text{Fn3}$  de elevada afinidad.

Consecuentemente, en algunas realizaciones, uno o más bucles seleccionados entre AB, BC, CD, DE, EF y FG pueden ser extendidos o acortados en su longitud con respecto al correspondiente bucle en el  $^{10}\text{Fn3}$  humano natural. En cualquier polipéptido dado, uno o más bucles pueden ser extendidos en su longitud, uno o más bucles pueden ser reducidos a su longitud, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la longitud de un bucle dado puede ser extendida en 2-25, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20 o 10-15 aminoácidos. En algunas realizaciones, la longitud de un bucle dado puede ser reducida en 1-15, 1-11, 1-10, 1-5, 1-3, 1-2, 2-10 o 2-5 aminoácidos. En particular, el bucle FG del  $^{10}\text{Fn3}$  tiene 13 residuos de longitud, mientras que el correspondiente bucle en las cadenas pesadas del anticuerpo varía entre 4-28 residuos. Para optimizar la unión al antígeno en los polipéptidos que se basan en el FG para la unión al objetivo, por lo tanto, puede alterarse la longitud del bucle FG del  $^{10}\text{Fn3}$ , así como su secuencia, para obtener la mayor flexibilidad y afinidad posibles en la unión al objetivo.

En algunas realizaciones, uno o más residuos del motivo de unión a la integrina "arginina-glicina-ácido aspártico" (RGD) (los aminoácidos 78-80 de la SEQ ID NO: 1) pueden ser sustituidos de forma que se altere la unión a la integrina. En algunas realizaciones, el bucle FG de los polipéptidos proporcionados en el presente documento no contiene un sitio de unión a la integrina RGD. En una realización, la secuencia RGD es sustituida por una secuencia de aminoácidos aminoácido polar-aminoácido neutro-aminoácido ácido (en la dirección desde N-terminal hacia C-terminal). En otra realización, la secuencia RGD es sustituida por SGE. En otra realización más, la secuencia RGD es sustituida por RGE (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 16).

Según se usa en el presente documento, un "dominio  $^{10}\text{Fn3}$ " o "fracción  $^{10}\text{Fn3}$ " se refiere al  $^{10}\text{Fn3}$  natural (por ejemplo, que comprende una de las SEQ ID NO: 1-8, 10, 12, 14 o 16) y las variantes biológicamente activas de las mismas, por ejemplo, las variantes biológicamente activas que se unen específicamente a un objetivo, tal como una proteína objetivo, y las variantes biológicamente activas que tienen la SEQ ID NO: 9, 11, 13 o 15. Un dominio  $^{10}\text{Fn3}$  natural puede comprender una de las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 1-8, 10, 12, 14 y 16. Algunas variantes biológicamente activas de un dominio  $^{10}\text{Fn3}$  incluyen los dominios  $^{10}\text{Fn3}$  que comprenden al menos, como mucho o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40 o 45 cambios de aminoácidos, es decir, sustituciones, adiciones o deleciones, con respecto a un dominio  $^{10}\text{Fn3}$  que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-16. Una variante biológicamente activa de un dominio  $^{10}\text{Fn3}$  también puede comprender, o comprender como mucho, 1-3, 1-5, 1-10, 1-15, 1-10 o 1-25 cambios de aminoácidos con respecto a un dominio  $^{10}\text{Fn3}$  que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-16. En ciertas realizaciones, una variante biológicamente activa de un dominio  $^{10}\text{Fn3}$  no comprende más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 1,2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40 o 45 cambios de aminoácidos, es decir, sustituciones, adiciones o deleciones, con respecto a un dominio  $^{10}\text{Fn3}$  que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-16. Los cambios en los aminoácidos pueden estar en una región de bucle y/o en una hebra. Algunos ejemplos de secuencias de aminoácidos de  $^{10}\text{Fn3}$  degeneradas se proporcionan en el presente documento como las SEQ ID NO: 17-29.

En algunas realizaciones, una fracción de soporte a base de fibronectina comprende un dominio  $^{10}\text{Fn3}$  que tiene al menos una identidad del 40 %, del 50 %, del 55 %, del 60 %, del 65 %, del 70 %, del 75 %, del 80 %, del 85 % o del 90 % con un dominio  $^{10}\text{Fn3}$  humano que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo de secuencias que comprende las SEQ ID NO: 1-16. En ciertas realizaciones, la fracción de soporte a base de fibronectina proporcionada en el presente documento tiene una identidad de al menos el 50 % con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo de secuencias de aminoácidos que comprende las SEQ ID NO: 1-16. En otras realizaciones, la fracción de soporte a base de fibronectina tiene una identidad de al menos el 65 % con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo de secuencias de aminoácidos que comprende las SEQ ID NO: 1-16. En ciertas realizaciones, uno o más de los bucles no se modificarán con respecto a la secuencia del correspondiente bucle de la secuencia natural, y/o una o más de las hebras  $\beta$  no se modificarán con respecto a la secuencia de la correspondiente hebra  $\beta$  de la secuencia natural. En ciertas realizaciones, cada una de las hebras

beta o de tipo beta de un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 de una fracción de soporte a base de fibronectina puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 100 % a la secuencia de la correspondiente hebra beta o de tipo beta de la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, las variaciones en las regiones de hebras β no alterarán la estabilidad del polipéptido en condiciones fisiológicas. En algunos ejemplos de realizaciones, el dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 se une a un objetivo deseado con una K<sub>d</sub> de menos de 500 nM, de 100 nM, de 50 nM, de 10 nM, de 5 nM, de 1 nM, de 500 pM, de 100 pM o menos. En algunas realizaciones, el dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 de un soporte de proteína a base de fibronectina se une a un objetivo deseado con una K<sub>d</sub> de entre 1 pM y 1 μM, de entre 100 pM y 500 nM, de entre 1 nM y 500 nM o de entre 1 nM y 100 nM. En algunos ejemplos de realizaciones, la fracción de soporte a base de fibronectina se une específicamente a un objetivo que no es unido por un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural, particularmente el dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural humano que tiene, por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-8, 10, 12, 14 o 16.

En algunas realizaciones, las proteínas de fusión comprenden una fracción de soporte a base de fibronectina que comprende un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3, en la que el dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 comprende un bucle, AB; un bucle, BC; un bucle, CD; un bucle, DE; un bucle, EF; y un bucle, FG; y tiene al menos un bucle seleccionado entre el bucle AB, BC, CD, DE, EF y FG con una secuencia de aminoácidos alterada con respecto a la secuencia del correspondiente bucle del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humano de la SEQ ID NO: 1-16. En algunas realizaciones, están alterados los bucles BC, DE y FG. En ciertas realizaciones, están alterados los bucles AB, CD y EF. En ciertas realizaciones, el bucle FG es el único bucle que está alterado. En otras realizaciones, están alterados ambos bucles CD y FG, y opcionalmente no hay ningún otro bucle alterado. En ciertas realizaciones, están alterados ambos bucles CD y EF, y opcionalmente no hay ningún otro bucle alterado. En algunas realizaciones, una o más alteraciones específicas del soporte se combinan con una o más alteraciones de bucles. Por "alterado" se entiende una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia de molde (es decir, el correspondiente dominio de fibronectina humano natural) e incluye adiciones, deleciones y sustituciones de aminoácidos.

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

En ciertas realizaciones, una fracción de soporte a base de fibronectina comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo de secuencias que consiste en la SEQ ID NO: 1-16, y la proteína de fusión se une específicamente a un objetivo, por ejemplo, con una K<sub>d</sub> de menos de 500 nM, de 100 nM, de 50 nM, de 10 de nM, de 5 nM, de 1 nM, de 500 pM, de 100 pM o menos. Las proteínas pueden comprender cambios (o alteraciones) de aminoácidos en uno o más bucles y en una o más hebras.

En ciertas realizaciones, la fracción de soporte a base de fibronectina comprende un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que está definido generalmente por la siguiente secuencia:

**VSDVPRDLEVVAA(X)<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITV**

**YA(X)<sub>z</sub>ISINYRT (SEQ ID NO: 17),**

o por la secuencia que tiene las SEQ ID NO: 18-29. En las SEQ ID NO: 17-29, el bucle AB está representado por (X)<sub>u</sub>, el bucle BC está representado por (X)<sub>v</sub>, el bucle CD está representado por (X)<sub>w</sub>, el bucle DE está representado por (X)<sub>x</sub>, el bucle EF está representado por (X)<sub>y</sub> y el bucle FG está representado por X<sub>z</sub>. X representa cualquier aminoácido, y el subíndice después de la X representa un número entero del número de aminoácidos. En particular, u, v, w, x, y y z pueden ser cada uno independientemente cualquiera de entre 2-20, 2-15, 2-10, 2-8, 5-20, 5-15, 5-10, 5-8, 6-20, 6-15, 6-10, 6-8, 2-7, 5-7 o 6-7 aminoácidos. Las secuencias de las hebras beta (subrayadas) pueden tener cualquiera de entre 0 y 10, de entre 0 y 8, de entre 0 y 6, de entre 0 y 5, de entre 0 y 4, de entre 0 y 3, de entre 0 y 2 o de entre 0 y 1 sustituciones, deleciones o adiciones a lo largo de todas las 7 regiones de soporte con respecto a los correspondientes aminoácidos mostrados en las SEQ ID NO: 17-29. En algunas realizaciones, las secuencias de las hebras beta pueden tener cualquiera de entre 0 y 10, de entre 0 y 8, de entre 0 y 6, de entre 0 y 5, de entre 0 y 4, de entre 0 y 3, de entre 0 y 2 o de entre 0 y 1 sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservativas, a lo largo de

5 todas las 7 regiones de soporte con respecto a los correspondientes aminoácidos mostrados en las SEQ ID NO: 17-29. En ciertas realizaciones, los residuos de aminoácidos del núcleo hidrófobo (los residuos en negrita de la anterior SEQ ID NO: 17) son fijos, y cualquier sustitución, sustitución conservativa, delección o adición se produce en los residuos distintos a los residuos de aminoácidos del núcleo hidrófobo. En algunas realizaciones, los residuos del núcleo hidrófobo de los polipéptidos proporcionados en el presente documento no han sido modificados con respecto al dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humano natural (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 o 5).

10 En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de las regiones N-terminal y/o C-terminal de una fracción de soporte a base de fibronectina pueden estar modificadas mediante una delección, una sustitución o una inserción con respecto a las secuencias de aminoácidos de las correspondientes regiones de los dominios <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que comprenden una de las SEQ ID NO: 1-16). En algunas realizaciones, los primero ocho (es decir, los residuos 1-8) y los últimos siete aminoácidos (es decir, los residuos 95-101) de la SEQ ID NO: 1 están delecionados, generando un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. También pueden añadirse secuencias adicionales en el N- o el C-terminal de un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-16. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la extensión N-terminal consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: M, MG y G.

20 En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 residuos de la SEQ ID NO: 1 puede estar modificada o delecionada en los polipéptidos proporcionados en el presente documento con respecto a la secuencia de los correspondientes aminoácidos del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humano natural que tiene la SEQ ID NO: 1. En algunos ejemplos de realizaciones, los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 1-8 de la SEQ ID NO: 1 están sustituidos por una región N-terminal alternativa que tiene 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos de longitud. Algunos ejemplos de regiones N-terminales alternativas incluyen (representadas por el código de aminoácidos de letra única) M, MG, G, MGVSDVPRDL (SEQ ID NO: 30) y GVSDVPRDL (SEQ ID NO: 31), o truncamientos N-terminales, y una cualquiera de las SEQ ID NO: 30 y 31. Otras regiones N-terminales alternativas adecuadas incluyen, por ejemplo, X<sub>n</sub>SDVPRDL (SEQ ID NO: 32), X<sub>n</sub>DVPRDL (SEQ ID NO: 33), X<sub>n</sub>VPRDL (SEQ ID NO: 34), X<sub>n</sub>PRDL (SEQ ID NO: 35), X<sub>n</sub>RDL (SEQ ID NO: 36), X<sub>n</sub>DL (SEQ ID NO: 37) o X<sub>n</sub>L, en las que n = 0, 1 o 2 aminoácidos, en las que cuando n = 1, X es Met o Gly, y cuando n = 2, X es Met-Gly. Cuando se añade una secuencia de Met-Gly al N-terminal de un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3, el M habitualmente será escindido, dejando un G en el N-terminal. En otras realizaciones, la región N-terminal alternativa comprende la secuencia de aminoácidos MASTSG (SEQ ID NO: 38).

35 En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 93-101, 94-101, 95-101, 96-101, 97-101, 98-101, 99-101, 100-101 o 101 de la SEQ ID NO: 1 está delecionada o modificada en los polipéptidos proporcionados en el presente documento con respecto a la secuencia de los correspondientes aminoácidos del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humano natural (SEQ ID NO: 1). En algunos ejemplos de realizaciones, los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 95-101 de la SEQ ID NO: 1 están sustituidos por una región C-terminal alternativa que tiene 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos de longitud. Algunos ejemplos específicos de secuencias de regiones C-terminales alternativas incluyen, por ejemplo, polipéptidos que comprenden, que consisten esencialmente en, o que consisten en, EIEK (SEQ ID NO: 39), EGSGC (SEQ ID NO: 40), EIEKPCQ (SEQ ID NO: 41), EIEKPSQ (SEQ ID NO: 42), EIEKP (SEQ ID NO: 43), EIEKPS (SEQ ID NO: 44), EIEKPC (SEQ ID NO: 45) o HHHHHH (SEQ ID NO: 46). En algunas realizaciones, la región C-terminal alternativa comprende EIDK (SEQ ID NO: 47), y en algunas realizaciones en particular, la región C-terminal alternativa es EIDKPCQ (SEQ ID NO: 48) o EIDKPSQ (SEQ ID NO: 49).

45 En ciertas realizaciones, una fracción de soporte a base de fibronectina comprende un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que tiene tanto una secuencia de una región N-terminal alternativa como una secuencia de una región C-terminal alternativa.

50 En ciertas realizaciones, una fracción de soporte a base de fibronectina se basa en una repetición Fn3 distinta a la 10<sup>a</sup> repetición del dominio de tipo III de la fibronectina, por ejemplo, de la fibronectina humana. Por ejemplo, una fracción de soporte a base de fibronectina puede ser similar a cualquiera de las otras repeticiones de la fibronectina de tipo III, por ejemplo, la 1<sup>a</sup>, la 2<sup>a</sup>, la 3<sup>a</sup>, la 4<sup>a</sup>, la 5<sup>a</sup>, la 6<sup>a</sup>, la 7<sup>a</sup>, la 8<sup>a</sup>, la 9<sup>a</sup>, la 11<sup>a</sup>, la 12<sup>a</sup>, la 13<sup>a</sup>, la 14<sup>a</sup>, la 15<sup>a</sup>, la 16<sup>a</sup>, la 17<sup>a</sup> y la 18<sup>a</sup> Fn3 repetición. En otras realizaciones más, una fracción de soporte a base de fibronectina puede proceder de una molécula distinta a la fibronectina. Algunos ejemplos de fracciones de soporte a base de fibronectina pueden derivar de la tenascina, una proteína que está formada por 15 dominios Fn3 con unas similitudes en las secuencias similares entre sí como las que se encuentran en la fibronectina. Estas repeticiones se describen, por ejemplo, en Jacobs et al. (2012) Protein Engineering, Design & Selection 25: 107. Tomando como base la homología en las repeticiones de la molécula de fibronectina y la de la molécula de tenascina, se han creado moléculas artificiales basadas en estas homologías. Las secuencias de aminoácidos consenso basadas en la homología de los dominios con la molécula de fibronectina se denominan Fibcon y FibconB (documento WO2010/093627 y Jacobs et al. (2012) *supra*), y las basadas en la homología de los dominios de la molécula de tenascina se denominan Tencon. Un ejemplo de secuencia de aminoácidos Fibcon comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: MPAPTDLRFTNETPSSLLISWTPPRVQITGYIIRYGPVSDGRVKEFTVPPSVSSATITGLKPGTEYITISVIALKDNQESE PLRGRVTTGG (FibconB; SEQ ID NO: 50), en la que el bucle AB consiste en los aminoácidos 13-16 (TPSS; SEQ ID NO: 51), el bucle BC consiste en los aminoácidos 22-28 (TPPRVQI; SEQ ID NO: 52), el bucle CD consiste en los

aminoácidos 38-43 (VGSDGR; SEQ ID NO: 53), el bucle DE consiste en los aminoácidos 51-54 (PSVS; SEQ ID NO: 54), el bucle EF consiste en los aminoácidos 60-64 (GLKPG; SEQ ID NO: 55) y el bucle FG consiste en los aminoácidos 75-81 (KDNQES; SEQ ID NO: 56). Otra secuencia de aminoácidos Fibcon comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

LDAPTDLQVTNVTDTSITVSWTPPSATITGYRITYTPSNGPGEPKELTVPPSSTSVTI  
 5 TGITPGVEYVVSVAALKDNQESPLVGTCTT (SEQ ID NO: 57; Jacobs et al., *supra*).

Las proteínas Fn3 derivadas de la tenascina incluyen Tencons (documento WO2010/051274, documento WO2010/051310 y documento WO2011/137319, que se incorporan de manera específica a modo de referencia en el presente documento). Un ejemplo de proteína Tencon tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:  
 10 LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGH  
 RSNPLSAEFTT (SEQ ID NO: 58; Jacobs et al., *supra*, y documento WO2011/137319), en la que el bucle AB consiste en los aminoácidos 13-16 (TEDS; SEQ ID NO: 59), el bucle BC consiste en los aminoácidos 22-28 (TAPDAAF; SEQ ID NO: 60), el bucle CD consiste en los aminoácidos 38-43 (SEKVG; SEQ ID NO: 61), el bucle DE consiste en los aminoácidos 51-54 (GSER; SEQ ID NO: 62), el bucle EF consiste en los aminoácidos 60-64 (GLKPG; SEQ ID NO: 63) y el bucle FG consiste en los aminoácidos 75-81 (KGGHRSN; SEQ ID NO: 64).

Una fracción Fibcon, FibconB o Tencon, o las variantes de unión al objetivo de las mismas, tanto por sí mismas como unidas a una fracción heteróloga, por ejemplo, a un Fc, pueden ser replegadas según se describe en el presente documento. Los dominios Fn3 de otras proteínas, por ejemplo, de receptores de hormonas y de citocinas de la superficie celular, de chaperonas y de dominios de unión a carbohidratos, también pueden ser replegados según se describe en el presente documento, por sí mismos o como por parte de una proteína de fusión con, por ejemplo, un Fc.

Las proteínas o fracciones de soporte a base de fibronectina se describen, por ejemplo, en el documento WO2010/093627, en el documento WO2011/130324, en el documento WO2009/083804, en el documento WO2009/133208, en el documento WO02/04523, en el documento WO2012/016245, en el documento WO2009/023184, en el documento WO2010/051310, en el documento WO2011/020033, en el documento WO2011/051333, en el documento WO2011/051466, en el documento WO2011/092233, en el documento WO2011/100700, en el documento WO2011/130324, en el documento WO2011/130328, en el documento  
 30 WO2011/137319, en el documento WO2010/051274, en el documento WO2009/086116, en el documento WO09/058379 y en el documento WO2013/067029 (todos los cuales se incorporan de manera específica a modo de referencia en el presente documento, en particular, los diversos tipos de moléculas se incorporan de manera específica a modo de referencia en el presente documento); cualquiera de las proteínas o de las fracciones de soporte a base de fibronectina descritas en estas publicaciones puede ser replegada según se describe en el  
 35 presente documento.

En ciertas realizaciones, una proteína que puede ser replegada según se describe en el presente documento es una proteína multivalente que comprende dos o más fracciones de soporte a base de fibronectina, por ejemplo, dominios <sup>10</sup>Fn3. Por ejemplo, una proteína de fusión multivalente puede comprender 2, 3 o más fracciones de soporte a base de fibronectina, por ejemplo, dominios <sup>10</sup>Fn3, que están asociados covalentemente. En algunos ejemplos de realizaciones, la proteína de fusión es una proteína biespecífica o dimerica que comprende dos dominios <sup>10</sup>Fn3.

#### Dominios Fc

45 Las proteínas que pueden ser replegadas según se describe en el presente documento incluyen proteínas de fusión que comprenden una porción Fc fusionada con una heteróloga. En algunos aspectos, la porción heteróloga es un soporte a base de fibronectina, por ejemplo, un dominio <sup>10</sup>Fn3, sin embargo, la porción heteróloga puede ser cualquier otra proteína.

Según se usa en el presente documento, una "porción Fc" engloba los dominios derivados de una región constante de una inmunoglobulina, preferentemente de una inmunoglobulina humana, incluyendo un fragmento, un análogo, una variante, un mutante o un derivado de la región constante. Algunas inmunoglobulinas adecuadas incluyen la IgG1, la IgG2, la IgG3, la IgG4, y otras clases tales como la IgA, la IgD, la IgE y la IgM. La región constante de una inmunoglobulina se define como un polipéptido natural o producido sintéticamente homólogo de la región C-terminal de la inmunoglobulina, y puede incluir un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 o un dominio  
 55 CH4, por separado o combinados. El término "fracción Fc" o "dominio Fc", según se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de las combinaciones de dominios CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4. Por lo tanto, un "dominio Fc" o una fracción puede comprender o no una bisagra.

60 A continuación se muestra la secuencia de una región constante de una inmunoglobulina IgG1 humana, y la posición relativa de cada dominio en la región constante está indicada basándose en el formato de numeración EU:

*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFP*  
*AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP*  
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA  
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 65). La secuencia bisagra del núcleo está subrayada, y la región CH1 está en cursiva; las regiones CH2 y CH3 están en texto normal. Debería entenderse que la lisina C-terminal es opcional. En ciertas realizaciones, la lisina C-terminal de una secuencia de una IgG puede estar eliminada o sustituida por un aminoácido que no es lisina, tal como alanina, para aumentar adicionalmente la semivida sérica de la proteína de fusión Fc.

En ciertas realizaciones, una proteína de fusión Fc comprende un dominio de bisagra, CH2 y CH3 humano, y puede tener la siguiente secuencia de aminoácidos:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP  
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
 EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ  
 ID NO: 66), en la que la secuencia bisagra del núcleo está subrayada, y las regiones CH2 y CH3 están en texto normal.

En ciertas realizaciones, una proteína de fusión Fc comprende una región CH2 y una CH3 de una IgG1 humana según se muestra a continuación:

VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD-  
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA-  
 VEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ  
 ID NO: 67). Debería entenderse que la glicina y la lisina en el extremo de un dominio CH3 son opcionales.

Las proteínas de fusión Fc también pueden comprender un dominio Fc que es idéntico en al menos el 50 %, el 60 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a las SEQ ID NO: 65-67. Una proteína de fusión Fc también puede comprender un dominio Fc que tiene al menos 50, 100 o 150 aminoácidos contiguos de las SEQ ID NO: 65-67. Las proteínas de fusión Fc también pueden comprender un dominio Fc que tiene 50-100, 50-150 o 100-150 aminoácidos contiguos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 65-67. Las proteínas de fusión Fc pueden comprender un dominio Fc que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 65-67 con 1-5, 1-10, 1-15, 1-20 o 1-25 sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservativas.

El dominio Fc puede ser una secuencia Fc natural, incluyendo variantes naturales alélicas o de ajuste. Alternativamente, un dominio Fc puede ser un dominio Fc no natural, por ejemplo, un dominio híbrido que comprende una porción de un dominio Fc procedente de dos o más isotipos de Ig diferentes, por ejemplo, un dominio Fc híbrido de IgG2/IgG4. En algunos ejemplos de realizaciones, el dominio Fc procede de una molécula de inmunoglobulina humana. Alternativamente, el dominio Fc puede ser una versión humanizada o desimmunizada de un dominio Fc de un animal no humano, que incluye, pero no se limita a, un ratón, una rata, un conejo, un camello, una llama, un dromedario y un mono.

En ciertas realizaciones, el dominio Fc es una variante de la secuencia de un Fc, por ejemplo, una secuencia Fc que ha sido modificada (por ejemplo, mediante una sustitución, una delección y/o una inserción de aminoácidos) con respecto a una secuencia de un Fc parental (por ejemplo, un polipéptido Fc no modificado que es modificado posteriormente para generar una variante), para proporcionar unas características estructurales y/o una actividad biológica deseables.

Por ejemplo, se pueden hacer modificaciones en la región Fc con objeto de generar una variante de una Fc que (a) tiene una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentada o disminuida, (b) una citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) aumentada o disminuida, (c) una afinidad aumentada o disminuida por C1q y/o (d) tiene una afinidad aumentada o disminuida por un receptor Fc con respecto al Fc parental. Dichas variantes de la región Fc comprenderán al menos una modificación en un aminoácido en la región Fc. Se cree que la combinación de modificaciones de aminoácidos es particularmente deseable. Por ejemplo, la región Fc variante puede incluir dos, tres, cuatro, cinco, etc. sustituciones en la misma, por ejemplo, de las posiciones específicas de la región Fc

identificadas en el presente documento. Las proteínas que comprenden la Fc, que están mutadas para modificar la actividad biológica de la Fc, pueden ser replegadas según se describe en el presente documento. Algunos ejemplos de Fc mutantes se describen, por ejemplo, en el documento WO97/34631; en el documento WO96/32478; en la Patente de EE.UU. n° 5.624.821; en la Patente de EE.UU. n° 5.648.260; en la Patente de EE.UU. n° 6.194.551; en el documento WO 94/29351; en el documento WO 00/42072; en la Patente de EE.UU. n° 5.624.821; en la Patente de EE.UU. n° 6.277.375; en la Patente de EE.UU. n° 6.737.056; en la Patente de EE.UU. n° 6.194.551; en la Patente de EE.UU. n° 7.317.091; en la Patente de EE.UU. n° 8.101.720; en las Publicaciones de Patente PCT WO 00/42072; WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217; WO 05/092925; WO 06/020114; y en Strohl, 2009, Current Opinion in Biotechnology 20: 685-691; en la Patente de EE.UU. n° 6.277.375; en Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279 (8): 6213-6216; en Hinton et al. 2006 Journal of Immunology 176: 346-356; en Dall'Acqua et al. Journal of Immunology, 2002, 169: 5171 -5180, en Dall'Acqua et al., 2006, Journal of Biological Chemistry 281: 23514-23524; en Yeung et al., 2010, J Immunol, 182: 7663-7671; en el documento WO88/07054; en el documento WO88/07089; en la Patente de EE.UU. n° 6.277.375; en el documento WO99/051642; en el documento WO01/058957; en el documento WO2003/074679; en el documento WO2004/029207; en la Patente de EE.UU. n° 7.317.091 y en el documento WO2004/099249.

Algunos ejemplos de variantes de la Fc se establecen en las SEQ ID NO: 68-86. En algunos aspectos, una proteína de fusión Fc descrita en el presente documento comprende un dominio Fc que tiene al menos 50, 100 o 150 aminoácidos contiguos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 68-86. En otras realizaciones, una proteína de fusión Fc descrita en el presente documento comprende un dominio Fc que tiene 50-100, 50-150 o 100-150 aminoácidos contiguos de las SEQ ID NO: 68-86. En otras realizaciones más, una proteína de fusión Fc descrita en el presente documento comprende un dominio Fc que comprende las SEQ ID NO: 68-86 con 1-5, 1-10, 1-15, 1-20 o 1-25 sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservativas.

Las proteínas de fusión Fc pueden contener una región de bisagra de una inmunoglobulina. La región de bisagra puede proceder de anticuerpos pertenecientes a cualquiera de las clases de inmunoglobulinas, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En ciertas realizaciones, la región de bisagra procede de cualquiera de las subclases de anticuerpos de la IgG, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En algunas realizaciones, la región de bisagra puede incluir adicionalmente residuos procedentes de las regiones CH1 y CH2 que flanquean la secuencia bisagra del núcleo, como se analiza adicionalmente a continuación.

En ciertas realizaciones, una bisagra contiene un residuo de cisteína libre que es capaz de formar un puente de disulfuro con otro monómero para formar un dímero. La secuencia de bisagra puede contener de forma natural un residuo de cisteína, o puede estar modificada para que contenga uno o más residuos de cisteína.

En ciertas realizaciones, las proteínas de fusión Fc comprenden una región de bisagra procedente de una IgG1 humana. En algunas realizaciones, la región de bisagra comprende los residuos de bisagra del núcleo DKHTHTCPPCPAPPELLG (SEQ ID NO: 87) de la IgG1, que se corresponden con las posiciones 221-236 según la numeración EU.

En ciertas realizaciones, la secuencia de bisagra puede incluir sustituciones que confieren unas propiedades farmacocinéticas, biofísicas y/o biológicas deseables. Algunos ejemplos de secuencias de bisagra incluyen EPKSSDKHTHTCPPCPAPPELLGGPS (SEQ ID NO: 88; región bisagra del núcleo subrayada), EPKSSDKHTHTCPPCPAPPELLGGSS (SEQ ID NO: 89; región bisagra del núcleo subrayada), EPKSSSGSTHTCPPCPAPPELLGGSS (SEQ ID NO: 90; región bisagra del núcleo subrayada), DKHTHTCPPCPAPPELLGGPS (SEQ ID NO: 91; región bisagra del núcleo subrayada) y DKHTHTCPPCPAPPELLGGSS (SEQ ID NO: 92; región bisagra del núcleo subrayada). En una realización, la secuencia de bisagra es un derivado de una bisagra de la IgG1 que comprende una sustitución P122S (numeración EU 238) (por ejemplo, el residuo de prolina de la posición 122 en la SEQ ID NO: 22 está sustituido por serina). La sustitución P122S anula la función efectora del Fc y está ejemplificado por las bisagras que tienen una cualquiera de las SEQ ID NO: 25, 26 y 28. En otra realización, la secuencia de bisagra es un derivado de una bisagra de la IgG1 que comprende las sustituciones D104G y K105S (numeración EU 221-222). Las sustituciones D104G y K105S eliminan un potencial sitio de escisión, y por lo tanto aumentan la asistencia a la proteasa de la molécula de fusión. Una bisagra que tiene las sustituciones D104G y K105S está ejemplificada en la SEQ ID NO: 26. En otra realización, la secuencia de bisagra es un derivado de una bisagra de la IgG1 que comprende una sustitución C103S (numeración EU 220). La sustitución C103S impide la inadecuada formación de un puente de cisteína en ausencia de una cadena ligera. Las bisagras que tienen una sustitución C103S están ejemplificadas por las SEQ ID NO: 24-26.

Las proteínas de fusión Fc pueden comprender una secuencia de bisagra que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 %, un 60 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % con respecto a cualquier bisagra descrita en el presente documento, por ejemplo, una bisagra que tiene las SEQ ID NO: 88-92, o que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos de cualquier bisagra descrita en el presente documento, por ejemplo, una de las SEQ ID NO: 88-92. Las proteínas de fusión Fc pueden comprender una porción de bisagra que comprende al menos o como mucho 2, 5, 10, 12, 15, 18 o 20 residuos de aminoácidos contiguos de cualquiera de

las SEQ ID NO: 88-92, o una secuencia que comprende 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 2-5, 2-10, 2-15, 2-20, 5-10, 5-15, 5-20, 10-15, 10-20 o 15-20 residuos de aminoácidos contiguos de cualquiera de las SEQ ID NO: 88-92. En algunos ejemplos de realizaciones, la secuencia de bisagra comprende un residuo de cisteína.

- 5 En ciertas realizaciones, una proteína de fusión Fc no comprende una bisagra. Por ejemplo, una proteína de fusión Fc puede comprender un dominio Fc unido a una proteína heteróloga, por ejemplo, en el formato Fc-X o X-Fc, sin que comprenda una bisagra o un núcleo de bisagra. En un ejemplo, una proteína de fusión Fc no comprende la secuencia EPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 93) o una variante de la misma.
- 10 En ciertas realizaciones, una proteína de fusión Fc no comprende un conector. Por ejemplo, una proteína de fusión Fc puede comprender un dominio Fc que está unido directamente a una proteína heteróloga, por ejemplo, una proteína <sup>10</sup>Fn3 sin ninguna secuencia interviniente. En ciertas realizaciones, puede haber 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos (por ejemplo, 1-5 o 1-10 aminoácidos) entre el dominio Fc y la proteína heteróloga. Dichas proteínas de fusión Fc pueden ser proteínas de fusión X-Fc (la proteína heteróloga está unida en el N-terminal del Fc) o Fc-X (la proteína heteróloga está unida en el C-terminal del Fc), en las que X es la proteína heteróloga, y en las que X y Fc están unidos directamente entre sí.
- 15

En ciertas realizaciones, una proteína de fusión Fc no comprende ni una bisagra ni un conector.

- 20 En ciertas realizaciones, una proteína de fusión Fc es un dímero, en la que cada monómero comprende una proteína de fusión (un homodímero). En ciertas realizaciones, una proteína de fusión Fc es un heterodímero que comprende, por ejemplo, un monómero que comprende una proteína de fusión Fc y un monómero que comprende un Fc que no está unido a otra fracción. La porción Fc de un monómero puede comprender una o más modificaciones (o mutaciones) de aminoácidos con respecto a un Fc natural que favorecen la formación del dímero, por ejemplo, del heterodímero, con otro Fc. Por ejemplo, un Fc de un dímero puede comprender un "orificio" y el otro Fc del dímero puede comprender una "protuberancia" o un "bulto," según se describe, por ejemplo, en el documento WO96/027011; en el documento US 5.731.168 y en el documento US 5.821.333. Pueden usarse otras modificaciones, tales como modificaciones electrostáticas, para mejorar la formación del dímero. Algunos ejemplos de modificaciones se describen, por ejemplo, en el documento WO2007/110205; en el documento WO2009/089004 y en el documento WO2010/129304. Dichos cambios son particularmente útiles para mejorar la asociación de los dos monómeros heterólogos para formar un dímero, tal como un dímero que comprende un monómero que comprende una proteína de fusión Fc y un monómero que comprende una Fc que es diferente de la proteína de fusión Fc, por ejemplo, por la ausencia de una proteína heteróloga.
- 25
- 30 En ciertas realizaciones, una proteína de fusión Fc comprende un monómero que comprende la estructura X-Fc y un monómero que comprende la estructura Fc-X (o Fc-Y). Una proteína de fusión Fc también puede comprender dos monómeros, que comprenden cada uno la estructura X-Fc-X (una estructura en "quad"), según se usa, por ejemplo, en los Ejemplos 1-3. Una proteína de fusión Fc también puede comprender dos monómeros, que comprenden cada uno la estructura X-Fc-Y, o un monómero que comprende la estructura X-Fc-Y y un monómero que comprende la estructura Y-Fc-X. Cada monómero puede comprender opcionalmente un conector, y opcionalmente comprende una bisagra.
- 35
- 40

- Una proteína de fusión Fc puede comprender un Fc de cadena única (scFc), en el que el primer y el segundo dominio Fc (o el primer y el segundo dominio de bisagra-Fc) están unidos a través de un conector. En una realización, un scFc comprende, en orden desde el N- hacia el C-terminal, un primer dominio CH2, primer dominio CH2 que está unido a un primer dominio CH3, dominio CH3 que está unido a un conector Fc, conector Fc que está unido a un segundo dominio CH2, segundo dominio CH2 que está unido a un segundo dominio CH3, en los que el primer y el segundo dominio CH2 y CH3 se asocian para formar un Fc dimétrico. Un scFc puede comprender en orden desde el N- hacia el C-terminal, una primera bisagra, primera bisagra que está unida a un primer dominio CH2, primer dominio CH2 que está unido a un primer dominio CH3, primer dominio CH3 que está unido a un conector Fc, conector Fc que está unido a una segunda bisagra, segunda bisagra que está unida a un segundo dominio CH2, segundo dominio CH2 que está unido a un segundo dominio CH3, en los que la primera y la segunda bisagra, los dominios CH2 y los dominios CH3 se asocian para formar un Fc dimérico. Los scFc se describen, por ejemplo, en el documento WO2008/131242, en el documento WO2008/143954 y en el documento WO2008/012543.
- 45
- 50
- 55

#### **Ejemplos de conectores para conectar una proteína heteróloga a una fracción Fc**

- Puede usarse cualquier conector para unir covalentemente una proteína heteróloga, por ejemplo, una fracción de soporte a base de fibronectina, a una fracción Fc, con la condición de que el conector permita que la proteína de fusión que comprende la proteína heteróloga se pliegue adecuadamente y sea biológicamente activa. Por ejemplo, la proteína de fusión debería ser capaz de unirse eficazmente a su objetivo, y puede tener una semivida sérica larga con respecto a la proteína heteróloga que no está unida a un Fc. Un conector también es preferentemente esencialmente no inmunógeno y no reactivo con otras proteínas (es decir, químicamente inerte).
- 60

- 65 Un conector puede tener 1-6, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45, 1-50, 5-10, 5-15, 5-15, 5-20, 5-25, 5-30, 5-35, 5-40, 5-45 o 5-50 aminoácidos de longitud.

Algunos ejemplos de conectores pueden comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, conectores de GS, por ejemplo, (GS)<sub>1</sub>, (GS)<sub>2</sub>, (GS)<sub>3</sub>, (GS)<sub>4</sub>, (GS)<sub>5</sub>, (GS)<sub>6</sub>, (GS)<sub>7</sub>, (GS)<sub>8</sub>, (GS)<sub>9</sub> o (GS)<sub>10</sub>. Los conectores también pueden comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, conectores de G<sub>4</sub>S, por ejemplo, (G<sub>4</sub>S)<sub>1</sub>, (G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>, (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>, (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> o (G<sub>4</sub>S)<sub>5</sub>. Algunos ejemplos adicionales de conectores se proporcionan en el documento WO2012/142515.

### Ejemplos de proteínas de fusión Fc que pueden ser replegadas

Las proteínas de fusión que comprenden una fracción heteróloga X, por ejemplo, <sup>10</sup>Fn3, y una fracción Fc, se denominan en conjunto en el presente documento fusiones X/Fc, independientemente de si contienen un conector o una bisagra, e independientemente de la orientación (la "/" indica que cubre ambas orientaciones, es decir, cuando el Fc es N-terminal o cuando el Fc es C-terminal con respecto a X).

En ciertas realizaciones, un Fc está unido directamente a X, es decir, sin ningún aminoácido interviniente (por ejemplo, sin ningún conector). En cierta realización, un Fc está unido indirectamente a X, es decir, con uno o más aminoácidos intervinientes, por ejemplo, un conector.

Algunos ejemplos de proteínas de fusión son como sigue, y se muestran en el orden desde el N- hasta el C-terminal: X-bisagra-CH2-CH3; X-conector-bisagra-CH2-CH3; X-CH2-CH3; X-conector-CH2-CH3; bisagra-CH2-CH3-X; bisagra-CH2-CH3- conector-X; CH2-CH3-X; CH2-CH3-conector-X, en las que X es una proteína heteróloga por ejemplo, una molécula <sup>10</sup>Fn3 de unión a una diana de interés con respecto a la porción Fc. En cualquier orientación, las X/proteínas de fusión Fc descritas en el presente documento pueden contener adicionalmente una metionina N-terminal y/o una secuencia líder (por ejemplo, para su expresión en células de mamífero). Otras construcciones comprenden una segunda proteína heteróloga unida al otro extremo terminal el Fc, y puede ser la misma o diferentes moléculas heterólogas que se unen a cada extremo.

En ciertas realizaciones, una proteína de fusión comprende (i) una fracción de soporte a base de fibronectina que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-29; y (ii) una fracción Fc, por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a las SEQ ID NO: 65-86, en las que la proteína de fusión se une específicamente a un objetivo (por ejemplo, con una K<sub>d</sub> de menos de 500 nM, de 100 nM, de 50 nM, de 10 nM, de 5 nM, de 1 nM, de 500 pM, de 100 pM o menos) que no está unida por una fracción de soporte a base de fibronectina natural (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-8, 10, 12, 14 o 16). En ciertas realizaciones, una proteína de fusión comprende (i) una fracción de soporte a base de fibronectina que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a una cualquiera de las de la SEQ ID NO: 1-29; (ii) una fracción Fc, por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a las SEQ ID NO: 65-86; y (iii) un conector que une covalentemente la fracción de soporte a base de fibronectina a la fracción Fc, en el que la proteína de fusión se une específicamente a un objetivo (por ejemplo, con una K<sub>d</sub> de menos de 500 nM, de 100 nM, de 50 nM, de 10 nM, de 5 nM, de 1 nM, de 500 pM, de 100 pM o menos) que no está unida por una fracción de soporte a base de fibronectina natural (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-8, 10, 12, 14 o 16). En ciertas realizaciones, una proteína de fusión comprende (i) una fracción de soporte a base de fibronectina que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-29, (ii) una fracción Fc, por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a las SEQ ID NO: 65-86; y (iii) un conector que une covalentemente la fracción de soporte a base de fibronectina a la fracción Fc, en el que el conector comprende 1-10 aminoácidos, tal como 6 aminoácidos, y en el que la proteína de fusión se une específicamente a un objetivo (por ejemplo, con una K<sub>d</sub> de menos de 500 nM, de 100 nM, de 50 nM, de 10 nM, de 5 nM, de 1 nM, de 500 pM, de 100 pM o menos) que no está unida por una fracción de soporte a base de fibronectina natural (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-8, 10, 12, 14 o 16). Algunos ejemplos de fracciones de soporte a base de fibronectina unidas a un Fc se desvelan en el documento WO2012/142515.

También se proporcionan en el presente documento composiciones de proteína, por ejemplo, composiciones que comprenden una o más proteínas en una de las soluciones o los tampones descritos en el presente documento. Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden una proteína que comprende al menos dos cisteínas (en las que, por ejemplo, la proteína es un dímero que comprende una cisteína en cada dímero) que forman un puente de disulfuro en las condiciones apropiadas, y agua, en las que la composición no comprende una cantidad significativa de un tampón o de un agente desnaturizante y opcionalmente no comprende un agente reductor. También se proporcionan en el presente documento composiciones que comprenden una suspensión de proteínas desnaturizadas, en las que al menos algunas proteínas comprenden al menos dos cisteínas que forman un puente de disulfuro en las condiciones apropiadas, y en las que la composición no comprende un tampón o un agente desnaturizante y opcionalmente no comprende un agente reductor. Adicionalmente se proporcionan en el presente documento composiciones que comprenden una proteína que

comprende al menos dos cisteínas que forman un puente de disulfuro en las condiciones apropiadas, y un tampón de solubilización que tiene un pH en el intervalo de pH de entre 10 y 13, en las que la composición no comprende un agente desnaturizante y opcionalmente no comprende un agente reductor. También se proporcionan composiciones que comprenden una proteína que comprende al menos dos cisteínas que forman un puente de disulfuro en las condiciones apropiadas, y un tampón de repliegado que tiene un pH en el intervalo de pH de entre 9 y 11 y un agente oxidante, en las que la composición no comprende un agente reductor distinto a un agente reductor que parte de un agente oxidante que está presente en la composición. La concentración de proteínas en cualquiera de estas composiciones puede ser al menos de 20 mg/ml, de 15 mg/ml, de 10 mg/ml, de 5 mg/ml o de 1 mg/ml. Las composiciones pueden comprender al menos un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de la proteína de interés, por ejemplo, una fracción de soporte a base de fibronectina unida a un Fc, con respecto a la cantidad total (por ejemplo, en mg/ml) de proteína en la composición. En la composición que comprende un tampón de repliegado, la proteína repliegada puede constituir al menos un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 97 %, 98 % o un 99 % de la proteína de la muestra.

## 15 Síntesis de las proteínas

Las proteínas que pueden ser repliegadas según se describe en el presente documento pueden ser sintetizadas según cualquier método conocido en la materia. Algunas células hospedadoras adecuadas incluyen células procariontas, de levaduras o de mamífero, o células bacterianas. Algunas bacterias adecuadas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *E. coli* o *Bacillus* spp. También pueden usarse levaduras, preferentemente de la especie *Saccharomyces*, tal como *S. cerevisiae*, para la producción de polipéptidos. También pueden emplearse diversos sistemas de cultivo de células de mamífero o de insecto para expresar las proteínas recombinantes. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto son analizados por Luckow y Summers, (*Bio/Technology*, 6: 47, 1988). Las proteínas purificadas pueden prepararse mediante el cultivo en sistemas de hospedador/vector adecuados para expresar las proteínas recombinantes. Las proteínas expresadas, por ejemplo, las proteínas de soporte a base de fibronectina, pueden purificarse después a partir del medio de cultivo o de los extractos celulares.

Las proteínas pueden ser sintetizadas químicamente, enzimáticamente o recombinantemente. Las proteínas también pueden producirse usando sistemas de traducción exentos de células. Para dicho propósito, los ácidos nucleicos que codifican la proteína de fusión deben ser modificados para permitir una transcripción *in vitro* para producir el ARNm y permitir una traducción exenta de células del ARNm en el sistema exento de células en particular que se esté utilizando (eucariota, tal como un sistema de traducción exento de células de mamífero o de levadura, o procarionta, tal como un sistema de traducción exento de células bacteriano). Para una síntesis química, véanse, por ejemplo, los métodos descritos en *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2<sup>o</sup> ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

El uso de codones puede seleccionarse de forma que mejore la expresión en una célula. Dicho uso de los codones dependerá del tipo de célula seleccionado. Se han desarrollado patrones de uso de codones especializados para *E. coli* y otras bacterias, así como para células de mamífero, células vegetales, células de levadura y células de insecto. Véase, por ejemplo: Mayfield et al., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 21 de enero de 2003; 100 (2): 438-42; Sinclair et al. *Protein Expr Purif.* Octubre de 2002; 26 (1): 96-105; Connell ND. *Curr Opin Biotechnol.* Octubre de 2001; 12 (5): 446-9; Makrides et al. *Microbiol Rev.* Septiembre de 1996; 60 (3): 512-38; y Sharp et al. *Yeast.* Octubre de 1991; 7 (7): 657-78.

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

Las proteínas pueden comprender una secuencia de señalización u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el N-terminal de la proteína o el polipéptido maduros. La secuencia de señalización heteróloga seleccionada preferentemente es aquella que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa de señalización) por parte de la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariontas que no reconocen ni procesan una secuencia de señalización nativa, la secuencia de señalización puede ser sustituida por una secuencia de señalización procarionta seleccionada, por ejemplo, entre el grupo de los líderes de la fosfatasa alcalina, de la penicilinas, del lpp o de la enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levadura, la secuencia de señalización nativa puede ser sustituida, por ejemplo, por la líder de la invertasa de levadura, un líder de factor (incluyendo los líderes de factor alfa de *Saccharomyces* y de *Kluyveromyces*) o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en la Publicación PCT nº WO90/13646. Para la expresión en células

de mamífero, están disponibles las secuencias de señalización de mamífero, así como los líderes de secreción víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simplex. El ADN de dichas regiones precursoras puede estar ligado en marco de lectura al ADN que codifica la proteína.

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

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

20 El ADN recombinante también puede incluir cualquier tipo de secuencia de etiqueta de la proteína que puede ser útil para la purificación de las proteínas de fusión. Algunos ejemplos de etiquetas de proteínas incluyen, pero no se limitan a, una etiqueta de histidina, una etiqueta de FLAG, una etiqueta de myc, una etiqueta de HA o una etiqueta de GST. Algunos vectores de clonación y de expresión apropiados para su uso con hospedadores de células bacterianas, fúngicas, de levadura y de mamífero puede encontrarse en *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, (Elsevier, Nueva York, 1985), cuya divulgación relevante se incorpora en el presente documento a modo de referencia.

25 La construcción de expresión puede ser introducida en la célula hospedadora usando un método apropiado para la célula hospedadora, como será evidente para el experto en la materia. En la materia se conocen diversos métodos para la introducción de ácidos nucleicos en células hospedadoras, que incluyen, pero no se limitan a, electroporación; transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo con microproyectiles; lipofección; e infección (cuando el vector es un agente infeccioso).

35 La expresión en células bacterianas puede llevarse a cabo esencialmente como sigue o con ciertas variaciones de lo mismo. Se inserta el ADN que codifica una proteína de interés, por ejemplo, una proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc, en el vector pET9d (EMD Bioscience, San Diego, CA) y se expresa en células de *E. coli* HMS 174. Se usan veinte ml de un cultivo de inóculo (generado a partir de una única colonia en placa) para inocular 1 litro de medio LB que contiene 50 µg/ml de carbenicilina y 34 µg/ml de clorfenicol. El cultivo se cultiva 37 °C hasta una A<sub>600</sub> de 0,6-1,0. Después de la inducción con isopropil-β-tiogalactósido 1 mM (IPTG), el cultivo se cultiva durante 4 horas a 30 °C y se recoge mediante una centrifugación durante 30 minutos a ≥ 10.000 g a 4 °C. Los sedimentos de células se congelan a -80 °C. El sedimento de células se resuspende en 25 ml de tampón de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 0,5 M, 1x de cóctel inhibidor de la proteasa completo exento de EDTA (Roche), PMSF 1 mM, a un pH de 7,4) usando un homogeneizador Ultra-turrax (IKA works) en hielo. La lisis celular se consigue mediante una homogeneización a alta presión (≥ 18.000 psi) usando un Modelo M-110S de MICROFLUIDIZER® (Microfluidics). La fracción insoluble se separa mediante una centrifugación durante 30 minutos a 23.300 g a 4 °C. El sedimento insoluble recuperado a partir de la centrifugación del lisado se lava con fosfato de sodio 20 mM / NaCl 500 mM, a un pH de 7,4. El sedimento puede lavarse opcionalmente adicionalmente con agua, y suspenderse en una solución en suspensión como se describe adicionalmente en el presente documento. Otros métodos se describen en el documento WO2012/142515.

50 Las proteínas pueden ser purificadas mediante los métodos de aislamiento/purificación para proteínas conocidos de forma general en el ámbito de la química de proteínas. Algunos ejemplos no limitantes incluyen extracción, recristalización, precipitación salina (por ejemplo, con sulfato de amonio o sulfato de sodio), centrifugación, diálisis, ultrafiltración, adsorción cromatografía, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacciones hidrófobas, cromatografía en fase normal, cromatografía en fase inversa, filtración en gel, cromatografía de penetración en gel, cromatografía de afinidad, electroforesis, distribución a contracorriente o cualquier combinación de éstas. Después de la purificación, las proteínas pueden ser intercambiadas en diferentes tampones y/o concentradas mediante cualquiera de diversos métodos conocidos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, filtración y diálisis. Algunos métodos para la expresión de proteínas de fusión en *E. coli* también se proporcionan en el documento WO2012/142515.

60 La proteína purificada puede ser un 85 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % pura. Independientemente del valor numérico exacto de la pureza, la proteína puede ser lo suficientemente pura como para su uso en forma de un producto farmacéutico.

65

**Ejemplos de usos**

En un aspecto, la solicitud proporciona proteínas, por ejemplo, proteínas de fusión, que comprenden una fracción de soporte a base de fibronectina, útil en el tratamiento de trastornos. Las enfermedades o los trastornos que pueden ser tratados estarán dictados por la especificidad de unión de la fracción de soporte a base de fibronectina. Según se describe en el presente documento, las fracciones de soporte a base de fibronectina pueden estar diseñadas para unirse a cualquier objetivo de interés. Algunos ejemplos de objetivos incluyen, por ejemplo, el TNF-alfa, el VEGFR2, la PCSK9, la IL-23, el EGFR y el IGF1R. Simplemente como un ejemplo, las fracciones de soporte a base de fibronectina que se unen al TNF-alfa pueden usarse para el tratamiento de trastornos autoinmunes tales como la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria del intestino, la psoriasis y el asma. Las proteínas de fusión descritas en el presente documento también pueden usarse para el tratamiento del cáncer.

La solicitud también proporciona métodos para la administración de las proteínas de fusión a un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión son farmacéuticamente aceptables para un mamífero, en particular un ser humano. Una composición "farmacéuticamente aceptable" se refiere a una composición que es administrada a un animal sin unas consecuencias médicas adversas significativas. Algunos ejemplos de composiciones farmacéuticamente aceptables incluyen composiciones, por ejemplo, que comprenden una fracción de soporte a base de fibronectina, que están esencialmente exentas de endotoxinas o de pirógenos o que tienen unos niveles muy bajos de endotoxinas o de pirógenos.

**SECUENCIAS**

Dominio <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> natural:

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVP  
GSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIDKPSQ (SEQ ID  
NO: 1)

Dominio <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> de la SEQ ID NO: 1 (con D97E)

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVP  
GSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIEKPSQ (SEQ ID  
NO: 2)

Secuencia de núcleo del dominio <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> natural versión 1:

LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTAT  
ISGLKPGVDYITITVYAVTGRGDSPASSKPISINY (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de núcleo del dominio <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> natural versión 2:

EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATI  
SGLKPGVDYITITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 4)

Secuencia de núcleo del dominio <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> natural versión 3:

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVP  
GSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 5)

Secuencia de núcleo del dominio <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> natural versión 4:

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP  
GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTE (SEQ ID NO: 6)

Secuencia de núcleo del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural versión 5:

5 VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP  
GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 7)

Secuencia de núcleo del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural versión 6:

10 VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP  
GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEID (SEQ ID NO: 8)

Secuencia de núcleo del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 versión 7 (versión 6 con D97E):

15 VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP  
GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIE (SEQ ID NO: 9)

Secuencia de núcleo del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural versión 8:

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP  
GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIDK (SEQ ID NO:  
10)

Secuencia de núcleo del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 versión 9 (versión 8 con D97E):

20 VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP  
GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIEK (SEQ ID NO:  
11)

Secuencia de núcleo del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural versión 10:

25 VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP  
GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIDKP (SEQ ID NO:  
12)

Secuencia de núcleo del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 versión 11 (versión 10 con D97E):

30 VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP  
GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIEKP (SEQ ID NO:  
13)

Secuencia de núcleo del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural versión 12:

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP  
GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPI SINYRTEIDKPS (SEQ ID  
NO: 14)

Secuencia de núcleo del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 versión 13 (versión 12 con D97E):

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP  
GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPI SINYRTEIEKPS (SEQ ID NO:  
5 15)

Dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural con la sustitución D80E

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP  
GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQ (SEQ ID  
10 NO: 16)

Degenerada

Secuencia de núcleo del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural:

VSDVPRDLEVVA A(X)<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVY  
A(X)<sub>z</sub>ISINYRT (SEQ ID NO: 17)

VSDVPRDLEVVA A(X)<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVY  
A(X)<sub>z</sub>ISINYRTE (SEQ ID NO: 18)

VSDVPRDLEVVA A(X)<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVY  
A(X)<sub>z</sub>ISINYRTEI (SEQ ID NO: 19)

VSDVPRDLEVVA A(X)<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVY  
A(X)<sub>z</sub>ISINYRTEID (SEQ ID NO: 20)

VSDVPRDLEVVA A(X)<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVY  
A(X)<sub>z</sub>ISINYRTEIE (SEQ ID NO: 21)

VSDVPRDLEVVA A(X)<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVY  
15 A(X)<sub>z</sub>ISINYRTEIDK (SEQ ID NO: 22)

VSDVPRDLEVVA A(X)<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVY  
A(X)<sub>z</sub>ISINYRTEIEK (SEQ ID NO: 23)

VSDVPRDLEVVAAX<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVY  
A(X)<sub>z</sub>ISINYRTEIDKP (SEQ ID NO: 24)

VSDVPRDLEVVAAX<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVY  
A(X)<sub>z</sub>ISINYRTEIEKP (SEQ ID NO: 25)

VSDVPRDLEVVAAX<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVY  
A(X)<sub>z</sub>ISINYRTEIDKPS (SEQ ID NO: 26)

VSDVPRDLEVVAAX<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVY  
A(X)<sub>z</sub>ISINYRTEIEKPS (SEQ ID NO: 27)

VSDVPRDLEVVAAX<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVY  
A(X)<sub>z</sub>ISINYRTEIDKPSQ (SEQ ID NO: 28)

VSDVPRDLEVVAAX<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVY  
A(X)<sub>z</sub>ISINYRTEIEKPSQ (SEQ ID NO: 29)

- MGVSDVPRDL (SEQ ID NO: 30)
- GVSDVPRDL (SEQ ID NO: 31)
- X<sub>n</sub>SDVPRDL (SEQ ID NO: 32)
- X<sub>n</sub>DVPRDL (SEQ ID NO: 33)
- X<sub>n</sub>VPRDL (SEQ ID NO: 34)
- X<sub>n</sub>PRDL (SEQ ID NO: 35)
- X<sub>n</sub>RDL (SEQ ID NO: 36)
- X<sub>n</sub>DL (SEQ ID NO: 37)
- MASTSG (SEQ ID NO: 38)
- EIEK (SEQ ID NO: 39)
- EGSGC (SEQ ID NO: 40)
- EIEKPCQ (SEQ ID NO: 41)
- EIEKPSQ (SEQ ID NO: 42)
- EIEKP (SEQ ID NO: 43)
- EIEKPS (SEQ ID NO: 44)
- EIEKPC (SEQ ID NO: 45)
- HHHHHH (SEQ ID NO: 46)
- EIDK (SEQ ID NO: 47)
- EIDKPCQ (SEQ ID NO: 48)
- EIDKPSQ (SEQ ID NO: 49)

MPAPDLRFTNETPSSLLISWTPPRVQITGYIIRYGPVGS DGRVKEFTVPPS  
VSSATITGLKPGTEYTISVIALKDNQESEPLRGRVTTGG (FibconB; SEQ ID NO: 50)

TPSS (SEQ ID NO: 51)  
TPPRVQI (SEQ ID NO: 52)  
VGSDGR (SEQ ID NO: 53)  
PSVS (SEQ ID NO: 54)  
GLKPG (SEQ ID NO: 55)  
KDNQESEP (SEQ ID NO: 56)

LDAPTDLQVTNVTDTSITVSWTPPSATITGYRITYTPSNGPGEKELTVPPS  
STSVTITGITPGVEYVVSUYALKDNQESPLVGTCTT (SEQ ID NO: 57)

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGAINLTVPG  
SERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (SEQ ID NO: 58)

TEDS (SEQ ID NO: 59)  
TAPDAAF (SEQ ID NO: 60)  
SEKVG (SEQ ID NO: 61)  
GSER (SEQ ID NO: 62)  
GLKPG (SEQ ID NO: 63)  
KGGHRSN (SEQ ID NO: 64)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV  
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP  
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP  
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL  
SLSPGK (SEQ ID NO: 65)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP  
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH  
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 66)

VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV  
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ  
ID NO: 67)

EPRSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH  
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 68)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH  
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 69)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH  
NHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 70)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH  
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 71)

EPRSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH  
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 72)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP  
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH  
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 73)

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH  
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH  
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 75)

EPKSSDKTHTSPPSPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH  
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 76)

EPKSSDKTHTSPPSPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLGSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH  
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 77)

EPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLGSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH  
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 78)

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED  
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA  
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL  
HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 79)

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS  
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM  
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 80)

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLAPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 81)

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  
EALHNAYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 82)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 83)

EPKSSDKTHTSPPSPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALGSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 84)

EPKSSDKTHTSPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS  
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALGSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH  
 EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 85)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV  
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP  
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM  
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 86)

DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 87)  
 EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO: 88)  
 EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 89)  
 EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 90)  
 DKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO: 91)  
 DKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 92)  
 EPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 93)

Los siguientes Ejemplos representativos contienen información adicional, de ejemplificación y de guía que puede ser adaptada a la práctica de esta invención en sus varias realizaciones.

5

## Ejemplos

### **Ejemplo 1: cribado de alto rendimiento de las condiciones del tampón para el repliegado de proteínas desnaturalizadas**

10

Con objeto de identificar las condiciones de repliegado eficaces para las proteínas <sup>10</sup>Fn3/de fusión Fc producidas en *E. coli*, se usó una plataforma automatizada de manipulación de líquidos para ejecutar el repliegado de la proteína mediante una dilución por triplicado en placas de 96 pocillos.

15

Se produjo la biomasa de una proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc en un fermentador de 10 l. La biomasa se recogió y los Cl se recuperaron y se lavaron mediante una centrifugación antes de ser congelados.

20

El estudio de cribado se centraba en la concentración de proteína, el tampón de resolubilización, el pH de repliegado, la temperatura, los excipientes para la supresión de la agregación y los excipientes redox. Se usó el programa informático JMP Design of Experiments (DoE) para diseñar el estudio de cribado y analizar los datos. Los datos fueron recogidos usando un lector de placas y una SE-HPLC. Los datos sugirieron que un tampón de resolubilización a un pH de aproximadamente 8 con guanidina y un tampón de repliegado con arginina para suprimir la agregación, y un sistema redox de Glutación, a un pH de aproximadamente 10, favorecían la formación de una proteína soluble. Además, estas condiciones mostraron una proteína alrededor del peso molecular correcto en disolución, lo que indicaba la formación de puentes de disulfuro, necesaria para formar el homodímero <sup>10</sup>Fn3/Fc.

25

30

El escalado de la dilución de repliegado hasta unos volúmenes de repliegado finales de 50 ml, de 100 ml y de 200 ml usando las condiciones identificadas anteriormente se llevó a cabo usando una bomba y una mezcla calibradas. Se observó un acontecimiento de precipitación variable e importante en todos los casos, y se observó una baja recuperación de proteína. Únicamente se recuperó aproximadamente entre el 10 y el 20 % de la proteína en disolución, y se encontró que tenía el peso molecular apropiado. Para un subconjunto de diluciones de repliegado a escala de laboratorio, se encontró que la mayoría de la proteína recuperada en disolución tenía un peso molecular menor, correspondiente al monómero <sup>10</sup>Fn3/Fc, e indicando que no se habían formado los puentes de disulfuro. Con estos datos, se determinó que deberían ser evaluados unos métodos de repliegado alternativos para las moléculas de <sup>10</sup>Fn3/Fc.

35

**Ejemplo 2: replegado de una proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc con FFT**

Este ejemplo describe el uso de la filtración de flujo tangencial (FFT) como un método de intercambio de tampones para replegar proteínas <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 / Fc desnaturalizadas en forma de cuerpos de inclusión (CI). Las condiciones del tampón para la FFT se determinaron mediante los experimentos de cribado originales de alto rendimiento. La proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc utilizada en este ejemplo tenía una estructura cuádruple, es decir, comprendía dos monómeros, cada monómero consistía en un Fc (que comprende una bisagra, dominios CH2 y CH3) a los que se unen dos moléculas <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 idénticas que se unen a una proteína diana específica, uno en su N-terminal y otro en su C-terminal.

Los CI se lavaron resuspendiéndolos dos veces en un tampón que contenía un detergente (Triton X-100 al 1%) y dos veces en agua RODI, centrifugando los CI y vertiendo el sobrenadante entre cada lavado. Los CI lavados (2,0 gramos) se suspendieron al 20 % (p/v) (40 ml) en un tampón de solubilización (Tris 50 mM, clorhidrato de guanidina 6 M, TCEP 2 mM, pH 8,0). Después de aproximadamente una hora, la solución de proteína se diluyó 5 veces, con un tampón que contenía Tris 50 mM, guanidina 3,5 M (la concentración final de guanidina es 4 M), pH 8, se filtró a través de una membrana de 0,2 µm y se transfirió a un depósito de FFT, que se configuró para permitir una mezcla suave.

La solución de proteína solubilizada se mantuvo a volumen constante y se diafiltró con tampón de replegado. La FFT se hizo funcionar con una TMP entre 10 y 30 PSI con un UPMT de membrana de 30 kDa, dimensionada para que la operación dure entre 3 y 6 horas. La solución de proteína se diafiltró con 3 diavolumenes (es decir, 3 veces 200 ml) de un tampón de replegado que consta de Tris 50 mM, TCEP 2 mM, arginina 0,4 M, pH 10. Posteriormente, la solución de proteína se diafiltró con 4 diavolumenes (es decir, 4 veces 200 ml) de un tampón de replegado/oxidación que consiste en Tris 50 mM, glutatión oxidado 1 mM, glutatión reducido 0,2 mM, arginina 0,4 M, pH 10. La solución de proteína replegada se retiró del depósito de FFT. La solución de proteína se incubó durante la noche a temperatura ambiente. La proteína se purificó luego de acuerdo con métodos estándar.

El grado de formación de dímero se evaluó durante el proceso mediante cromatografía de fase inversa (RP) y SDS-PAGE. Brevemente, una muestra de entre 2 y 50 µl de la reacción de la etapa 1 de replegado y entre 2 y 50 µl de la reacción de la etapa 2 de replegado, ambas obtenidas al final de cada etapa de replegado, se cargaron en una columna de cromatografía analítica de fase inversa usando un instrumento HPLC. Se realizó una elución en gradiente y se midió A280 para la elución. Se usó un estándar para hacer una curva de calibración, que relacionaba el área del pico con la concentración. Esto permitió determinar la concentración de una proteína particular de interés en la muestra replegada. El acoplamiento del instrumento de HPLC a un espectrómetro de masas se usó para confirmar la identidad de la proteína para un pico dado en el cromatograma.

Los cromatogramas RP se muestran en las Figuras 3A y B y el gel SDS-PAGE teñido se muestra en la Figura 3C. Como se muestra en estas Figuras, la proteína obtenida después de la primera etapa de replegado está principalmente en forma de un monómero (véase las Figuras 3A y C), mientras que la proteína obtenida después de la segunda etapa de replegado está principalmente en forma de un dímero (véase las Figuras 3B y C), lo que indica que la segunda etapa de replegado promovió la formación de enlaces disulfuro, en particular, la formación de enlaces disulfuro intercatenarios. Las identidades de los picos se confirmaron por espectrometría de masas. No se observó precipitación por inspección visual, aumentando la presión en la FFT que indicaría ensuciamiento de la membrana, espectroscopía UV-VIS o balance de masa de la solución de proteína de principio a fin.

El análisis del mapa de péptidos LC / MS mostró que todos los enlaces disulfuro, incluidos los de la región bisagra, se formaron como se esperaba, excepto que el nivel de bucles abiertos CH3 (enlace disulfuro no formado) estaba entre el 3 y el 12 %, en comparación con un nivel de entre el 1 y el 3 % en Fes purificado de muestras humanas.

La proteína se purificó usando técnicas de cromatografía comunes y había esperado actividad *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, la unión de la proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc replegada a la proteína A se demostró de la siguiente manera: la muestra de proteína replegada se unió a una columna de cromatografía empaquetada con resina de proteína A a un pH entre 7 y 9. La columna se lavó para eliminar la proteína no unida. Se usó un tampón de pH bajo para eluir la columna al interrumpir la asociación entre la proteína A en la resina y cualquier región Fc funcional que se hubiera unido. Se utilizaron un detector UV en línea y un medidor de pH para capturar los datos de la ejecución. El cromatograma de la elución, que se muestra en la Figura 4, muestra que la región Fc de la proteína se une a la proteína A y luego se eluye con un pH bajo, tal como se esperaba para una proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc plegada adecuadamente. Este resultado indica que la porción Fc de la proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc está al menos lo suficientemente plegada que se une a la proteína A de la manera esperada.

El análisis de la proteína replegada por SE-HPLC, RP-HPLC/MS y SDS-PAGE indicó que este método generó proteína replegada con alta eficiencia, es decir, entre el 70 y el 95 %.

Por lo tanto, la FFT se puede usar como un método de intercambio de tampón para lograr el replegado de las proteínas <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc desnaturalizadas.

**Ejemplo 3: Replegado de una molécula de <sup>10</sup>Fn3/Fc con FFT en ausencia de un agente reductor**

Este ejemplo muestra que las proteínas <sup>10</sup>Fn3/Fc desnaturalizadas pueden replegarse tal como se describe en el ejemplo 2, pero sin incluir un agente reductor en los tampones de solubilización o replegado, y a una escala 10 veces mayor en relación con las condiciones del ejemplo 2.

El experimento se realizó con la misma proteína que en el Ejemplo 2 y usando los métodos descritos en el Ejemplo 2, excepto que se realizó sin incluir un agente reductor en los tampones de solubilización y replegado, y a una escala 10 veces mayor.

Los CI se lavaron resuspendiéndolos dos veces en un tampón que contenía un detergente (Triton X-100 al 1 %) y dos veces en agua RODI, centrifugando los CI y vertiendo el sobrenadante entre cada lavado. Los CI lavados (20 gramos) se suspendieron al 20 % (p/v) (400 ml) en un tampón de solubilización (Tris 50 mM, clorhidrato de guanidina 6 M, pH 8,0). Después de aproximadamente una hora, la solución de proteína se diluyó 4 veces, con un tampón que contenía guanidina 3,5 M (la concentración final de guanidina es 4 M), se filtró a través de una membrana de 0,2 µm y se transfirió a un depósito de FFT, que se configuró para permitir una mezcla suave.

La solución de proteína solubilizada se mantuvo a volumen constante y se diafiltró con tampón de replegado. La FFT se hizo funcionar con una TMP entre 10 y 30 PSI con un UPMT de membrana de 30 kDa, dimensionada para que la operación dure entre 3 y 6 horas. La solución de proteína se diafiltró con 3 diavolúmenes (es decir, 3 veces 1,6 litros) de un tampón de replegado que consta de Tris 50 mM, arginina 0,4 M, pH 10. Posteriormente, la solución de proteína se diafiltró con 4 diavolúmenes (es decir, 4 veces 1,6 litros) de un tampón de replegado/oxidación que consiste en Tris 50 mM, glutatión oxidado 1 mM, glutatión reducido 0,2 mM, arginina 0,4 M, pH 10. La solución de proteína de replegado se retiró del depósito de FFT. La solución de proteína se incubó durante la noche a temperatura ambiente. La proteína se purificó luego de acuerdo con métodos estándar.

El grado de formación de dímero se evaluó durante el proceso mediante cromatografía de fase inversa (RP) y SDS-PAGE como se describe en el Ejemplo 2. Los cromatogramas RP se muestran en las Figuras 5A y B y el gel de SDS-PAGE teñido se muestra en la Figura 5C. Como se muestra en estas Figuras, la proteína obtenida después de la primera etapa de replegado está principalmente en forma de un monómero (véase las Figuras 5A y C), mientras que la proteína obtenida después de la segunda etapa de replegado está principalmente en forma de un dímero (véase las Figuras 5B y C), lo que indica que la segunda etapa de replegado promovió la formación de enlaces disulfuro, en particular, la formación de enlaces disulfuro intercatenarios. No se observó precipitación por inspección visual, aumentando la presión en el FFT que indicaría ensuciamiento de la membrana, espectroscopía UV-VIS o balance de masa de la solución de proteína de principio a fin.

El análisis del mapa de péptidos por LC/MS mostró que todos los enlaces disulfuro, incluidos los de la región de bisagra, se formaron como se esperaba, incluido el enlace disulfuro en los dominios CH3, con un nivel de bucle abierto CH3 (enlace disulfuro no formado) entre el 1 y el 3 %, es decir, similar al de Fes purificado de muestras humanas. Por lo tanto, eliminar el agente reductor TCEP de todos los tampones fue eficaz para reducir el nivel de bucles abiertos CH3 en las proteínas replegadas.

La proteína se purificó usando técnicas de cromatografía comunes y había esperado actividad *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, la unión de la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc replegada a la proteína A se demostró cómo se describe en el Ejemplo 2. Brevemente, la muestra de proteína replegada se unió a una columna de cromatografía empaquetada con resina de proteína A y se eluyó la proteína. El cromatograma de la elución, que se muestra en la Figura 6, muestra que la región Fc de la proteína se une a la proteína A y luego se eluye con un pH bajo, tal como se esperaba para una proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc correctamente plegada. Este resultado indica que la porción Fc de la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc está al menos suficientemente plegada que se une a la proteína A de la manera esperada.

También se evaluó la unión de la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc a su diana. La proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc obtenida tal como se describe en este ejemplo se sometió a RPS en presencia de la proteína diana a la que se une el resto <sup>10</sup>Fn3. Los anticuerpos anti-Fc humanos se inmovilizaron en una microplaca. La proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc se aplicó en condiciones que permitieron la unión de la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc a los anticuerpos inmovilizados. Luego se aplicó la diana a la que se une el resto <sup>10</sup>Fn3 y se midió la respuesta de la RPS con el tiempo para detectar cambios. Se detectó una respuesta inicial y luego la diana a la que se une el resto <sup>10</sup>Fn3 ya no se aplicó, lo que permitió la detección del retorno de la respuesta a las condiciones iniciales como la diana disociada del resto <sup>10</sup>Fn3. La Figura 7 muestra los sensores resultantes que demuestran la unión de la proteína replegada a su diana, tal como se esperaba. Por lo tanto, el resto <sup>10</sup>Fn3 de la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc está al menos lo suficientemente plegado para que se una a su diana de la manera esperada.

La actividad biológica de la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc replegada también se evaluó y se comparó con la de la misma proteína producida en un cultivo de células de mamífero. La proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc del cultivo de células de mamífero se produjo por expresión transitoria en células HEK y se purificó por cromatografía de proteína A, en un método lo más similar posible a la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc producida en células de *E. coli*, excepto que la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc producida en el cultivo de células de mamífero no se resolubilizó ni replegó. La Figura 8 muestra que la proteína <sup>10</sup>Fn3/Fc replegada inhibió el crecimiento de células tumorales de manera similar a la misma proteína expresada y purificada

del cultivo de células de mamífero. Estos resultados indican que la proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc se une a su diana y tiene actividad biológica, presumiblemente porque se ha replegado.

El análisis por SE-HPLC, RP-HPLC/MS y SDS-PAGE indica que este método tuvo éxito al replegar la proteína con alta eficiencia, entre el 70 y el 95 %.

Por lo tanto, las proteínas <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc desnaturalizadas se pueden replegar sin incluir un agente reductor en los tampones de solubilización o replegado, y a una escala 10 veces mayor en relación con las condiciones del Ejemplo 2.

#### **Ejemplo 4: Replegado de proteínas a altas concentraciones con FFT**

Este ejemplo muestra que el replegado de una proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc desnaturalizada se puede realizar tal como se describe en el Ejemplo 2, pero a una concentración de proteína elevada.

El experimento se realizó con la misma proteína que en el Ejemplo 2 y usando los métodos descritos en el Ejemplo 2, excepto que se realizó sin una etapa de dilución antes de la FFT.

Los CI se lavaron resuspendiéndolos dos veces en un tampón que contenía un detergente (Triton X-100 al 1%) y dos veces en agua RODI, centrifugando los CI y vertiendo el sobrenadante entre cada lavado. Los CI lavados (2,0 gramos) se suspendieron al 20 % (p/v) (40 ml) en un tampón de solubilización (Tris 50 mM, clorhidrato de guanidina 6 M, pH 8,0). Después de aproximadamente una hora, la solución de proteína se filtró a través de una membrana de 0,2 µm y se transfirió a un depósito de FFT, que se configuró para permitir una mezcla suave. En este caso, en contraste con los Ejemplos 2 y 3, la solución de proteína no se diluyó antes de transferirla al depósito de FFT.

La solución de proteína solubilizada se mantuvo a volumen constante y se diafiltró con tampón de replegado. La FFT se hizo funcionar con una TMP entre 10 y 30 PSI con un UPMT de membrana de 30 kDa, dimensionada para que la operación dure entre 3 y 6 horas. La solución de proteína se diafiltró con 3 diavolumenes (es decir, 3 veces 40 ml) de un tampón de replegado que consta de Tris 50 mM, arginina 0,4 M, pH 10. Posteriormente, la solución de proteína se diafiltró con 5 diavolumenes (es decir, 5 veces 40 ml) de un tampón de replegado que consiste en Tris 50 mM, glutatión oxidado 1 mM, glutatión reducido 0,2 mM, arginina 0,4 M, pH 10. La solución de proteína de replegado se retiró del depósito de FFT. La solución de proteína se incubó durante la noche a temperatura ambiente. La proteína se purificó luego de acuerdo con métodos estándar.

El grado de formación de dímero se evaluó durante el proceso mediante cromatografía de fase inversa (RP) y SDS-PAGE tal como se describe en el Ejemplo 2. Los cromatogramas RP se muestran en las Figuras 9A y B y el gel de SDS-PAGE teñido se muestra en la Figura 9C. Tal como se muestra en estas Figuras, la proteína obtenida después de la primera etapa de replegado está principalmente en forma de un monómero (véase las Figuras 9A y C), mientras que la proteína obtenida después de la segunda etapa de replegado está principalmente en forma de un dímero (véase las Figuras 9B y C), lo que indica que la segunda etapa de replegado promovió la formación de enlaces disulfuro, en particular, la formación de enlaces disulfuro entre cadenas. No se observó precipitación por inspección visual, aumentando la presión en la FFT que indicaría ensuciamiento de la membrana, espectroscopía UV-VIS o balance de masa de la solución de proteína de principio a fin.

El análisis del mapa de péptidos por LC/MS mostró que todos los enlaces disulfuro, incluidos los de la región de bisagra, se formaron tal como se esperaba.

La proteína se purificó usando técnicas de cromatografía comunes y se había esperado actividad *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, la unión de la proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc replegada a la proteína A se demostró tal como se describe en el Ejemplo 2. Brevemente, la muestra de proteína replegada se unió a una columna de cromatografía empaquetada con resina de proteína A y se eluyó la proteína. El cromatograma de la elución, que se muestra en la Figura 10, muestra que la región Fc de la proteína se une a la proteína A y luego se eluye con un pH bajo, tal como se esperaba para una proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc plegada adecuadamente. Este resultado indica que la porción Fc de la proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc está al menos lo suficientemente plegada para que se una a la proteína A de la manera esperada.

La unión de la proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc a su diana se evaluó tal como se describe en el Ejemplo 3. Brevemente, la proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc obtenida tal como se describe en este Ejemplo se sometió a RPS en presencia de la proteína diana a la que se une el resto <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3. La Figura 11 muestra los sensogramas resultantes que demuestran la unión de la proteína replegada a su diana, tal como se esperaba. Por lo tanto, el resto <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 de la proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc está al menos lo suficientemente plegado para que se una a su diana de la manera esperada.

El análisis por SE-HPLC, RP-HPLC / MS y SDS-PAGE indicó que este método fue exitoso en el replegado de la proteína con alta eficacia, entre el 70 y el 95 %.

Por lo tanto, se descubrió que la dilución antes de la FFT, después de la solubilización inicial, no era necesaria, permitiendo que se produzca el replegado a una concentración de proteína de hasta 10 g/l.

**Ejemplo 5: Replegado de una proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3-Fc con FFT.**

5 Este ejemplo muestra que una proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc desnaturalizada que tiene una estructura y un <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que es diferente de la de las proteínas <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc utilizadas en los ejemplos anteriores, también se puede replegar usando la FFT como método de intercambio de tampón.

10 Se usó una molécula <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc que tiene la molécula <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 unida al extremo N-terminal de la Fc ("<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3-Fc") y que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (la secuencia <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 se muestra en cursiva):

10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40

MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWVPPSDDYGYRITYGETGGNSPVQEFVPIGKGTATISGLKPGVDYTTIVYAVEFPWPHAGYYHRPISINYRTEIEPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 94).

15 La molécula <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 tiene una secuencia de aminoácidos diferente y se une a una proteína diana diferente en relación con la molécula <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 usada en los ejemplos anteriores.

20 Se expresó la proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc en *E. coli* y se recogieron los CI. Los CI se lavaron resuspendiéndolos dos veces en un tampón que contenía un detergente (Triton X-100 al 1%) y dos veces en agua RODI, centrifugando los CI y vertiendo el sobrenadante entre cada lavado. Los CI lavados (20 gramos) se suspendieron al 20 % (p/v) (400 ml) en un tampón de solubilización (Tris 50 mM, clorhidrato de guanidina 6 M, TCEP 5 mM, pH 8,0). Después de aproximadamente una hora, la solución de proteína se diluyó 4 veces, con un tampón que contenía guanidina 3,5 M (la concentración final de guanidina es 4 M), se filtró a través de una membrana de 0,2 µm y se transfirió a un depósito de FFT, que se configuró para permitir una mezcla suave.

25 La solución de proteína solubilizada se mantuvo a volumen constante y se diafiltró con el tampón de replegado. La FFT se ejecutó con una presión transmembrana (TMP) entre 10 y 30 PSI con un UPMT de membrana de 30 kDa, dimensionado para que la operación dure entre 3 y 6 horas. La solución de proteína se diafiltró con 3 diavolumenes de un tampón de replegado que consistía en Tris 50 mM, arginina 0,4 M, TCEP 5 mM, pH 10 (etapa de replegado 1). Posteriormente, la solución de proteína se diafiltró con 4 diavolumenes de un tampón de replegado que consiste en Tris 50 mM, glutatión oxidado 1 mM, glutatión reducido 0,2 mM, arginina 0,4 M, pH 10 (etapa de replegado 2). La solución de proteína replegada se retiró del reservorio de FFT. La solución de proteína se incubó toda la noche a temperatura ambiente. La proteína se purificó entonces de acuerdo con los métodos estándar.

35 El grado de formación del dímero se evaluó durante el proceso mediante cromatografía de fase inversa (RP) y SDS-PAGE tal como se describe en el Ejemplo 2. Los cromatogramas RP se muestran en las Figuras 12A y B y el gel de SDS-PAGE teñido se muestra en la Figura 12C. Tal como se muestra en estas Figuras, la proteína obtenida después de la primera etapa de replegado está principalmente en forma de un monómero (véase las Figuras 12A y C), mientras que la proteína obtenida después de la segunda etapa de replegado está principalmente en forma de un dímero (véase las Figuras 12B y C), lo que indica que la segunda etapa de replegado promovió la formación de enlaces disulfuro, en particular, la formación de enlaces disulfuro intercatenarios. No se observó precipitación por inspección visual, aumentando la presión en la FFT que indicaría ensuciamiento de la membrana, espectroscopía UV-VIS o balance de masa de la solución de proteína de principio a fin.

45 La proteína se purificó usando técnicas de cromatografía comunes y se había esperado actividad *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, la unión de la proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc replegada a la proteína A se demostró tal como se describe en el Ejemplo 2. Brevemente, la muestra de proteína replegada se unió a una columna de cromatografía empaquetada con resina de proteína A y se eluyó la proteína. El cromatograma de la elución, que se muestra en la Figura 13, muestra que la región Fc de la proteína se une a la proteína A y luego se eluye con un pH bajo, tal como se esperaba para una proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc debidamente plegada. Este resultado indica que la porción Fc de la proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc está al menos lo suficientemente plegada que se una a la proteína A de la manera esperada.

50 La unión de la proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc a su diana se evaluó tal como se describe en el Ejemplo 3. Brevemente, la proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc obtenida tal como se describe en este Ejemplo se sometió a SPR en presencia de la proteína diana a la que se une el resto <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3. La Figura 14 muestra los sensogramas resultantes que demuestran la unión de la proteína replegada a su diana, tal como se esperaba. Por lo tanto, el resto <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 de la proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3/Fc está al

menos lo suficientemente plegado para que se una a su diana de la manera esperada.

Por lo tanto, una proteína <sup>10</sup>F<sub>n3</sub>/Fc desnaturalizada que tiene la estructura <sup>10</sup>F<sub>n3</sub>-Fc se puede replegar usando la FFT como método de intercambio de tampón.

5

#### **Ejemplo 6: Replegado de una proteína Fc-<sup>10</sup>F<sub>n3</sub> con FFT**

Este ejemplo muestra que una proteína <sup>10</sup>F<sub>n3</sub>/Fc desnaturalizada que tiene una estructura y un <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> que es diferente del de las proteínas <sup>10</sup>F<sub>n3</sub>/Fc usadas en los anteriores ejemplos, también se puede replegar usando la FFT como un método de intercambio de tampón.

10

Este ejemplo describe el uso de la FFT como un método de intercambio de tampón para realizar el replegado de una proteína <sup>10</sup>F<sub>n3</sub>/Fc desnaturalizada que está en la forma de un CI y que es diferente de la del Ejemplo 1. Por lo tanto, este Ejemplo muestra que el método es aplicable a diferentes tipos de proteínas <sup>10</sup>F<sub>n3</sub>/Fc.

15

La proteína <sup>10</sup>F<sub>n3</sub>/Fc usada en este Ejemplo tiene la porción Fc (bisagra-CH1-CH2 de IgG1 humana de tipo silvestre) que está en N-terminal con el resto <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> (es decir, la orientación opuesta de la proteína en el Ejemplo 5) y la molécula <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> es diferente de, y se une a una proteína diana diferente, en relación con la del ejemplo 5. El Fc tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

20

MGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
KVS<sup>10</sup>NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<sup>10</sup>VFSCSVMHE  
ALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 95).

La proteína <sup>10</sup>F<sub>n3</sub>/Fc se expresó en *E. coli* y se recogieron los CI. Los CI se lavaron resuspendiéndolos dos veces en un tampón que contenía un detergente (Triton X-100 al 1 %) y dos veces en agua RODI, centrifugando los CI y vertiendo el sobrenadante entre cada lavado. Los CI lavados (20 gramos) se suspendieron al 20 % (p/v) (400 ml) en un tampón de solubilización (Tris 50 mM, clorhidrato de guanidina 6 M, TCEP 5 mM, pH 8,0). Después de aproximadamente una hora, la solución de proteína se diluyó 4 veces, con un tampón que contenía guanidina 3,5 M (la concentración final de guanidina es 4 M), se filtró a través de una membrana de 0,2 µm y se transfirió a un depósito de FFT, que se configuró para permitir una mezcla suave.

25

30

La solución de proteína solubilizada se mantuvo a volumen constante y se diafiltró con tampón de replegado. La FFT se ejecutó con una TMP entre 10 y 30 PSI con un UPMT de 30 kDa, dimensionada para que la operación dure entre 3 y 6 horas. La solución de proteína se diafiltró con 3 diavolumenes de un tampón de replegado que consistía en Tris 50 mM, arginina 0,4 M, TCEP 5 mM, pH 10 (etapa 1 de replegado). Posteriormente, la solución de proteína se diafiltró con 4 diavolumenes de un tampón de replegado que consta de Tris 50 mM, glutatión oxidado 1 mM, glutatión reducido 0,2 mM, arginina 0,4 M, pH 10. La solución de proteína replegable se retiró del depósito de FFT (etapa de replegado 2). La solución de proteína se incubó durante la noche a temperatura ambiente. La proteína se purificó luego de acuerdo con métodos estándar.

35

40

El grado de formación de dímero se evaluó durante el proceso mediante cromatografía de fase inversa (RP) y SDS-PAGE tal como se describe en el Ejemplo 2. Los cromatogramas RP se muestran en las Figuras 14A y B y el gel de SDS-PAGE teñido se muestra en la Figura 14C. Tal como se muestra en estas figuras, la proteína obtenida después de la primera etapa de replegado está principalmente en forma de un monómero (véase las Figuras 14A y C), mientras que la proteína obtenida después de la segunda etapa de replegado está principalmente en forma de un dímero (véase las Figuras 14B y C), lo que indica que la segunda etapa de replegamiento promovió la formación de enlaces disulfuro, en particular, la formación de enlaces disulfuro entre cadenas. No se observó precipitación por inspección visual, aumentando la presión en el TFF que indicaría ensuciamiento de la membrana, espectroscopía UV-VIS o balance de masa de la solución de proteína de principio a fin.

45

50

La proteína se purificó usando técnicas de cromatografía comunes y había esperado actividad *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, la unión de la proteína <sup>10</sup>F<sub>n3</sub>/Fc replegada a la proteína A se demostró tal como se describe en el Ejemplo 2. Brevemente, la muestra de proteína replegada se unió a una columna de cromatografía empaquetada con resina de proteína A y se eluyó la proteína. El cromatograma de la elución, que se muestra en la Figura 15, muestra que la región Fc de la proteína se une a la proteína A y luego se eluye con un pH bajo, tal como se esperaba para una proteína <sup>10</sup>F<sub>n3</sub>/Fc correctamente plegada. Este resultado indica que la porción Fc de la proteína <sup>10</sup>F<sub>n3</sub>/Fc está al menos lo suficientemente plegada para que se una a la proteína A de la manera esperada.

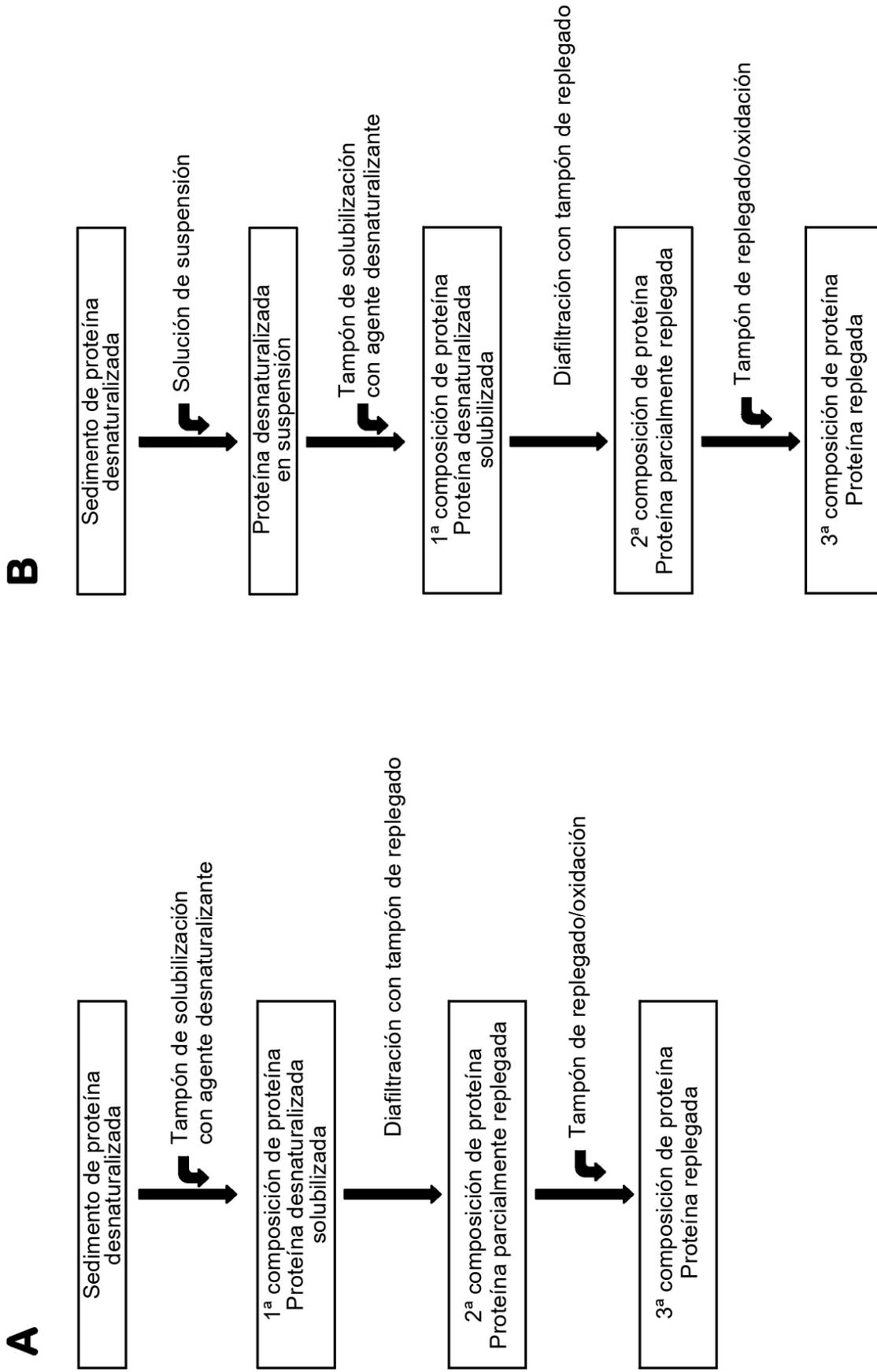
55

Por lo tanto, el uso de la FFT como un sistema de intercambio de tampones para replegar proteínas

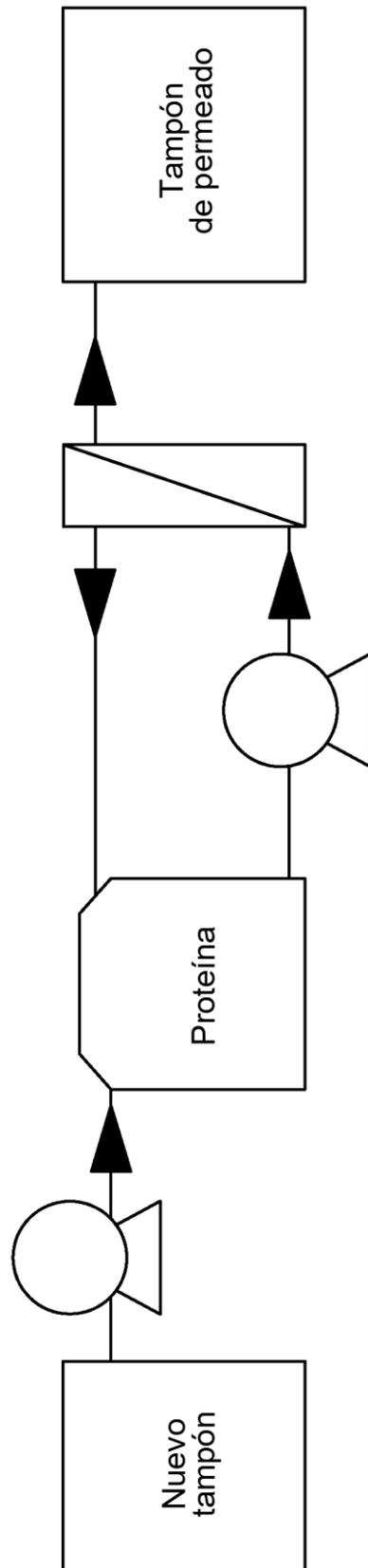
desnaturalizadas es aplicable a diferentes proteínas  $^{10}\text{Fn3}/\text{Fc}$ , independientemente de si la molécula  $^{10}\text{Fn3}$  está unida al extremo N-terminal, al extremo C-terminal o a ambos, del Fc, e independientemente de la naturaleza de la molécula  $^{10}\text{Fn3}$ .

## REIVINDICACIONES

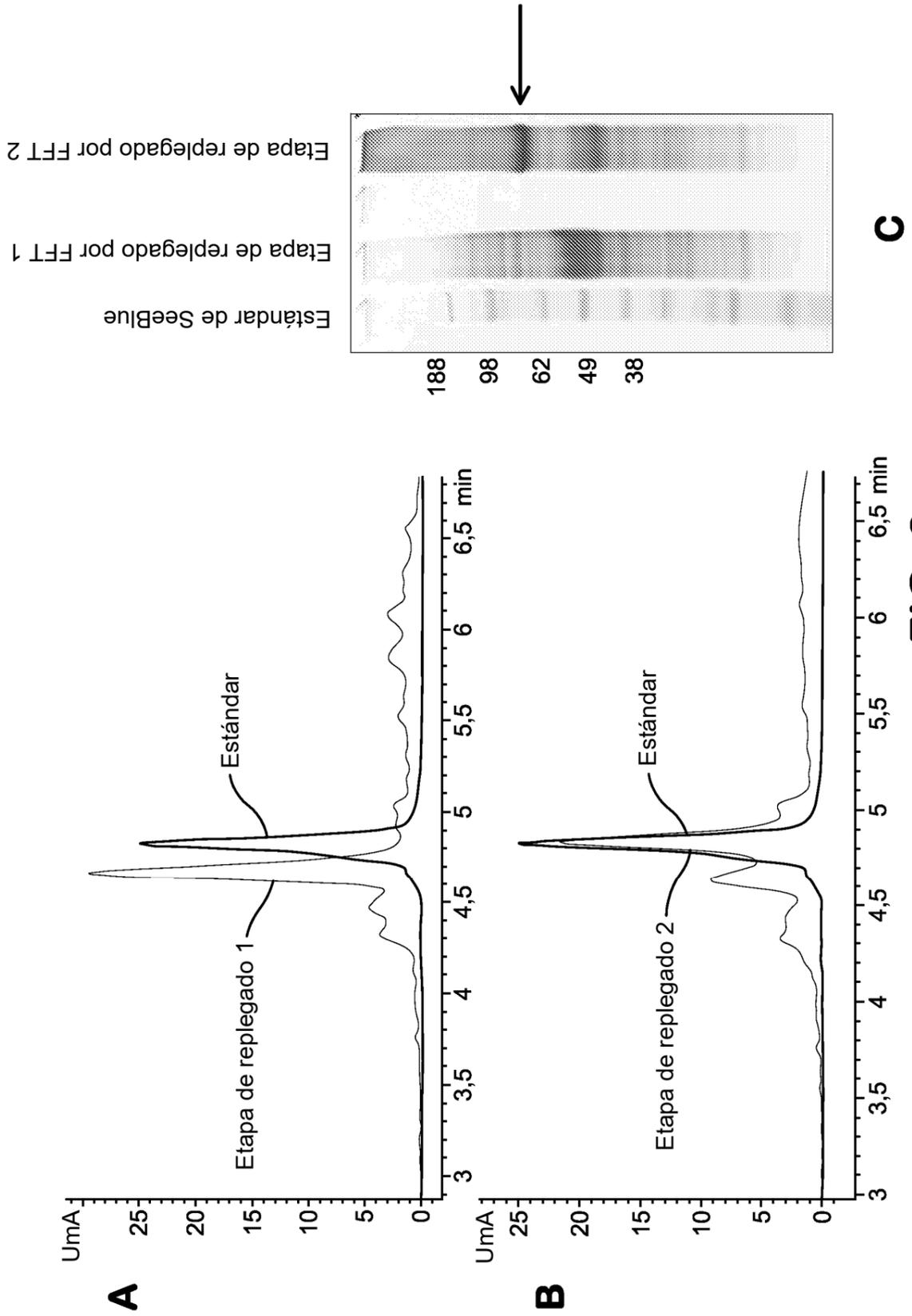
1. Un método para el replegado de una proteína desnaturalizada, que comprende
- 5 combinar la proteína desnaturalizada con un tampón de solubilización que comprende un agente desnaturalizante, para obtener una primera composición de proteína que comprende proteína desnaturalizada solubilizada, en donde la proteína desnaturalizada comprende una región Fc y un dominio de soporte a base de fibronectina;
- 10 diafiltrar la primera composición de proteína que comprende proteína desnaturalizada solubilizada con 2-4 diavolumenes de un tampón de replegado que tiene un pH en el intervalo de 9 a 11 para obtener una segunda composición de proteína que comprende proteína parcialmente replegada; e
- 15 incubar la segunda composición de proteína que comprende proteína parcialmente replegada con un tampón de replegado/oxidación que tiene un pH en el intervalo de 9 a 11 para obtener una tercera composición de proteína que comprende la proteína en un estado replegado, en donde la proteína en el estado replegado es un dímero con enlace disulfuro.
2. Un método para replegar una proteína desnaturalizada que está presente en cuerpos de inclusión (CI), que comprende
- 20 suspender los CI en una solución en suspensión, para obtener una composición que comprende proteína desnaturalizada suspendida, en donde la proteína desnaturalizada comprende una región Fc y un dominio de soporte a base de fibronectin;
- 25 combinar la composición que comprende los CI suspendidos con un tampón de solubilización que comprende un agente desnaturalizante para obtener una primera composición de proteína que comprende proteína desnaturalizada solubilizada;
- 30 diafiltrar la primera composición de proteína que comprende proteína desnaturalizada solubilizada con 2-4 diavolumenes de un tampón de replegado que tiene un pH en el intervalo de 9 a 11 para obtener una segunda composición de proteína que comprende proteína parcialmente replegada; e
- 35 incubar la segunda composición de proteína que comprende proteína parcialmente replegada con un tampón de replegado/oxidación que tiene un pH en el intervalo de 9 a 11 para obtener una tercera composición de proteína que comprende la proteína en un estado replegado, en donde la proteína en el estado replegado es un dímero con enlace disulfuro.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la incubación de la segunda composición de proteína que comprende proteína parcialmente replegada con un tampón de replegado/oxidación comprende diafiltrar la segunda composición de proteína con 2-6 diavolumenes de un tampón de replegado/oxidación.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la diafiltración de la primera composición de la proteína y/o la segunda composición de la proteína se lleva a cabo, al menos en parte, con un dispositivo de filtración de flujo tangencial (FFT).
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la diafiltración con el tampón de replegado dura entre 0,5 y 3 horas y/o la diafiltración con tampón de replegado/oxidación dura entre 0,5 y 3 horas.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el tampón de replegado y/o el tampón de replegado/oxidación comprende Arginina.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el tampón de replegado/oxidación comprende Arginina y glutatión.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en donde la proteína desnaturalizada se suspende en una solución de suspensión a una proporción de peso (gramos) de proteína desnaturalizada:volumen (ml) de solución de suspensión de 1:1-10.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la composición que comprende proteína desnaturalizada solubilizada no se diluye y/o filtra antes de la diafiltración.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la tercera solución de proteína comprende 1-10 mg/ml de proteína.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la eficacia de recuperación es al menos del 70 %.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el dominio de soporte a base de fibronectina es un dominio <sup>19</sup>FN3 que se fusiona a una región Fc que comprende una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.



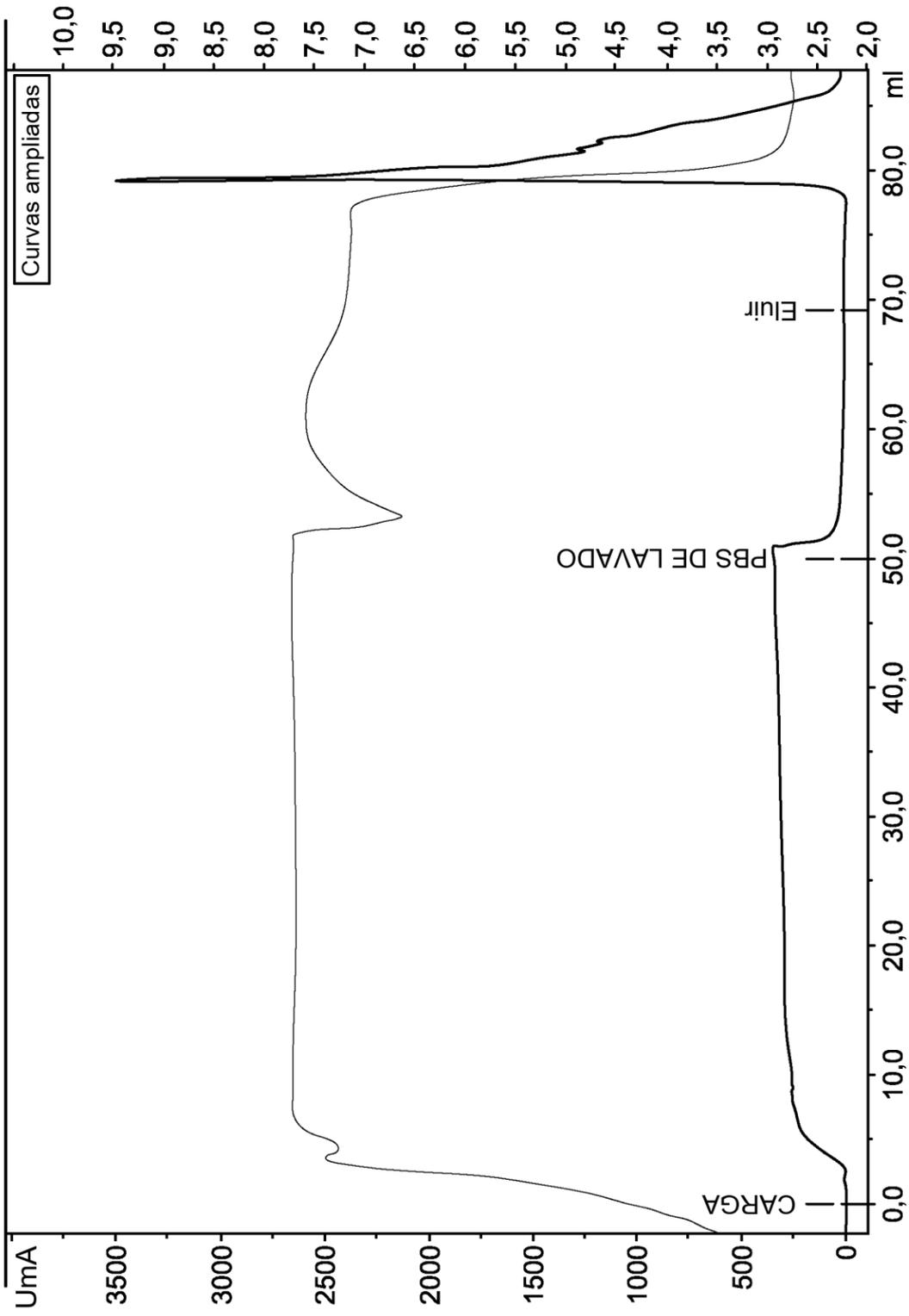
**FIG. 1**



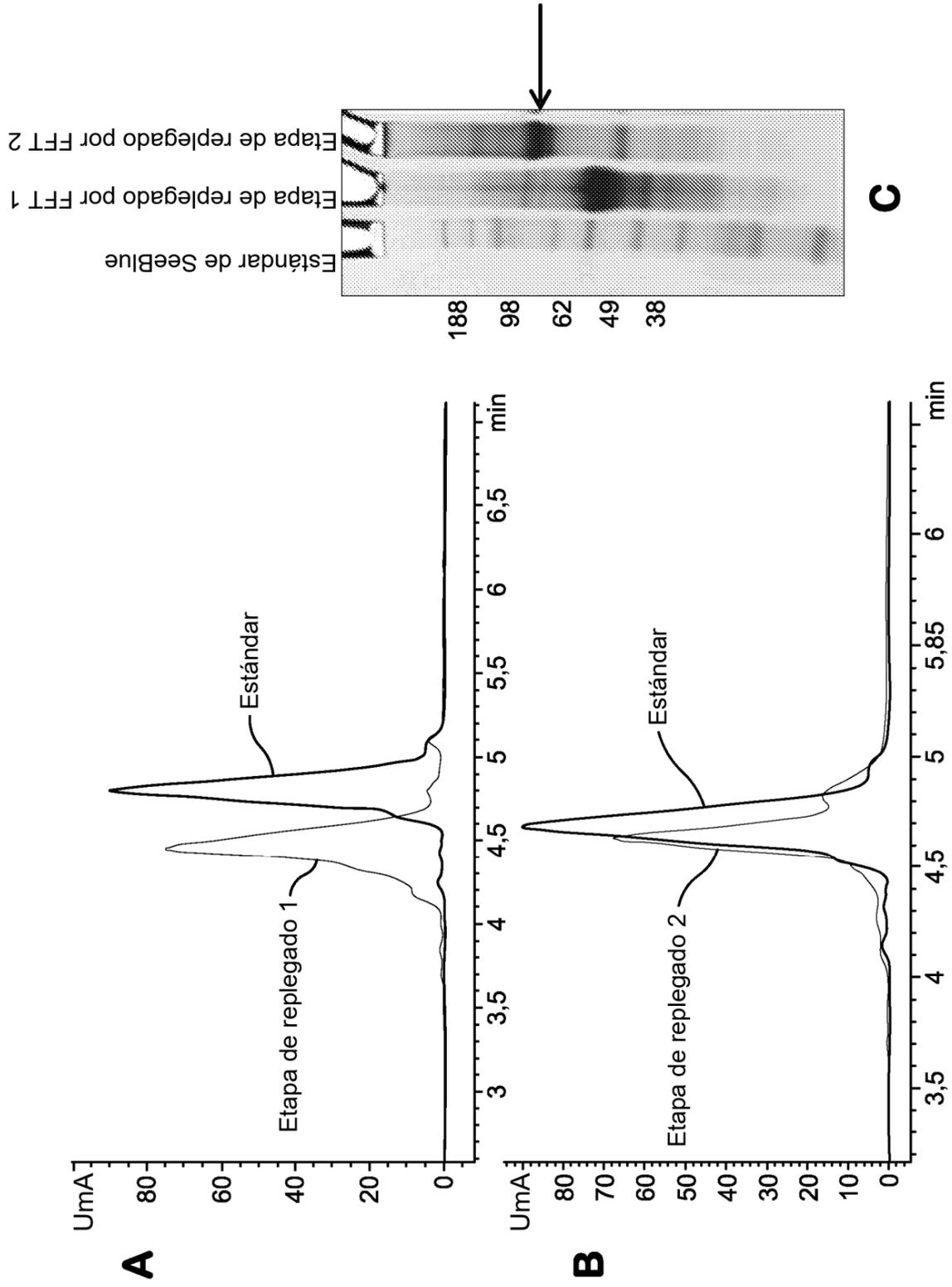
**FIG. 2**



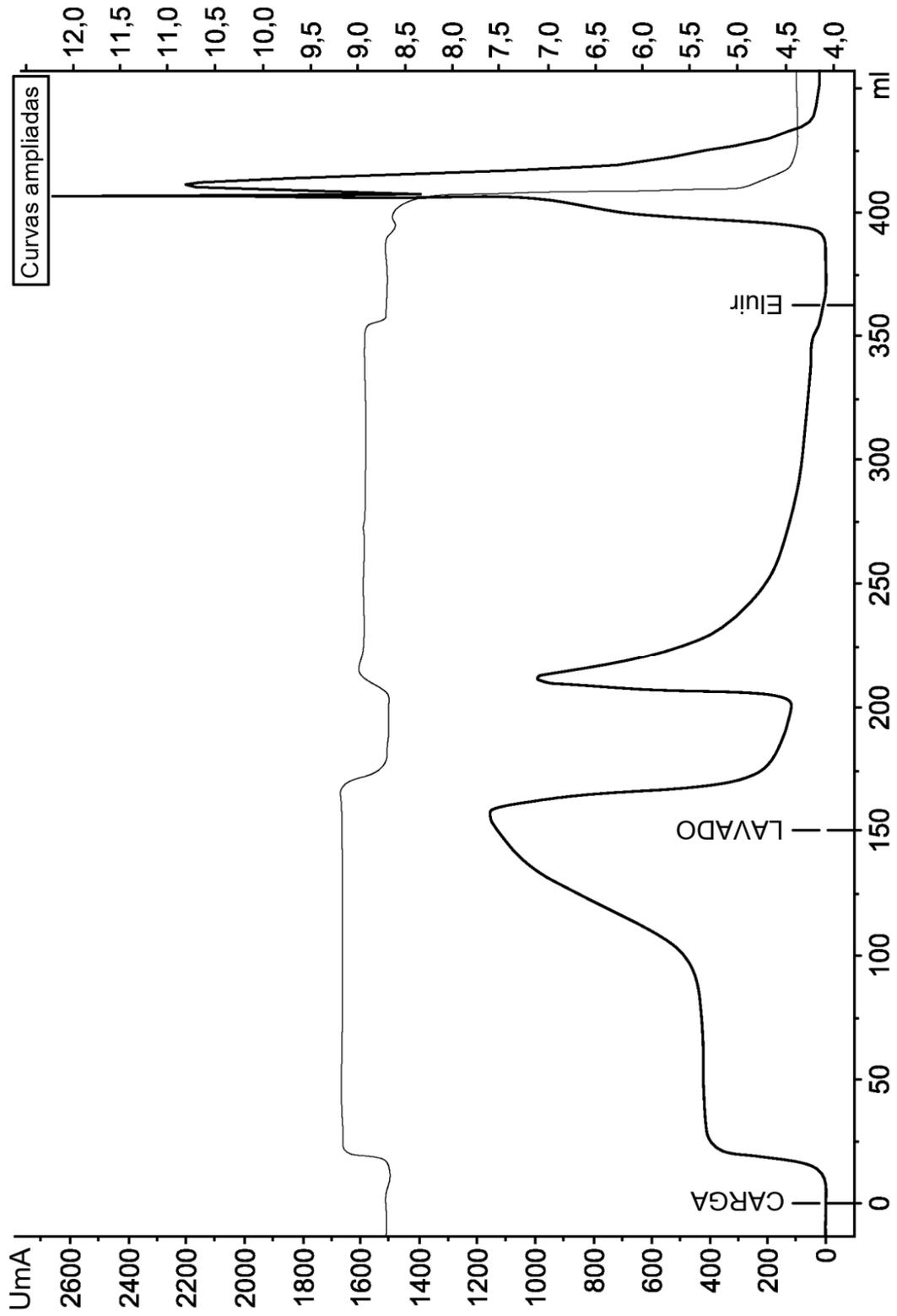
**FIG. 3**



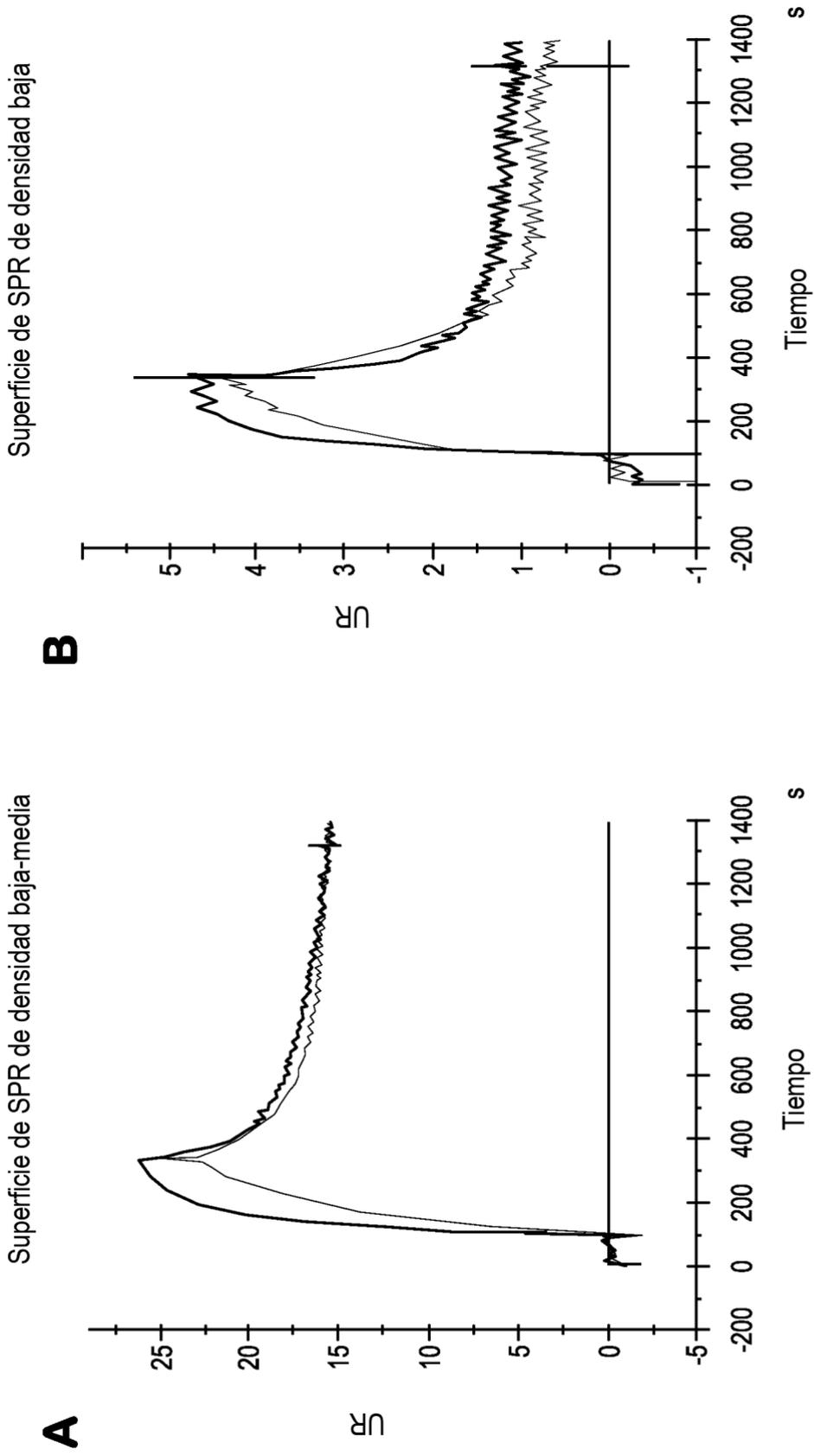
**FIG. 4**



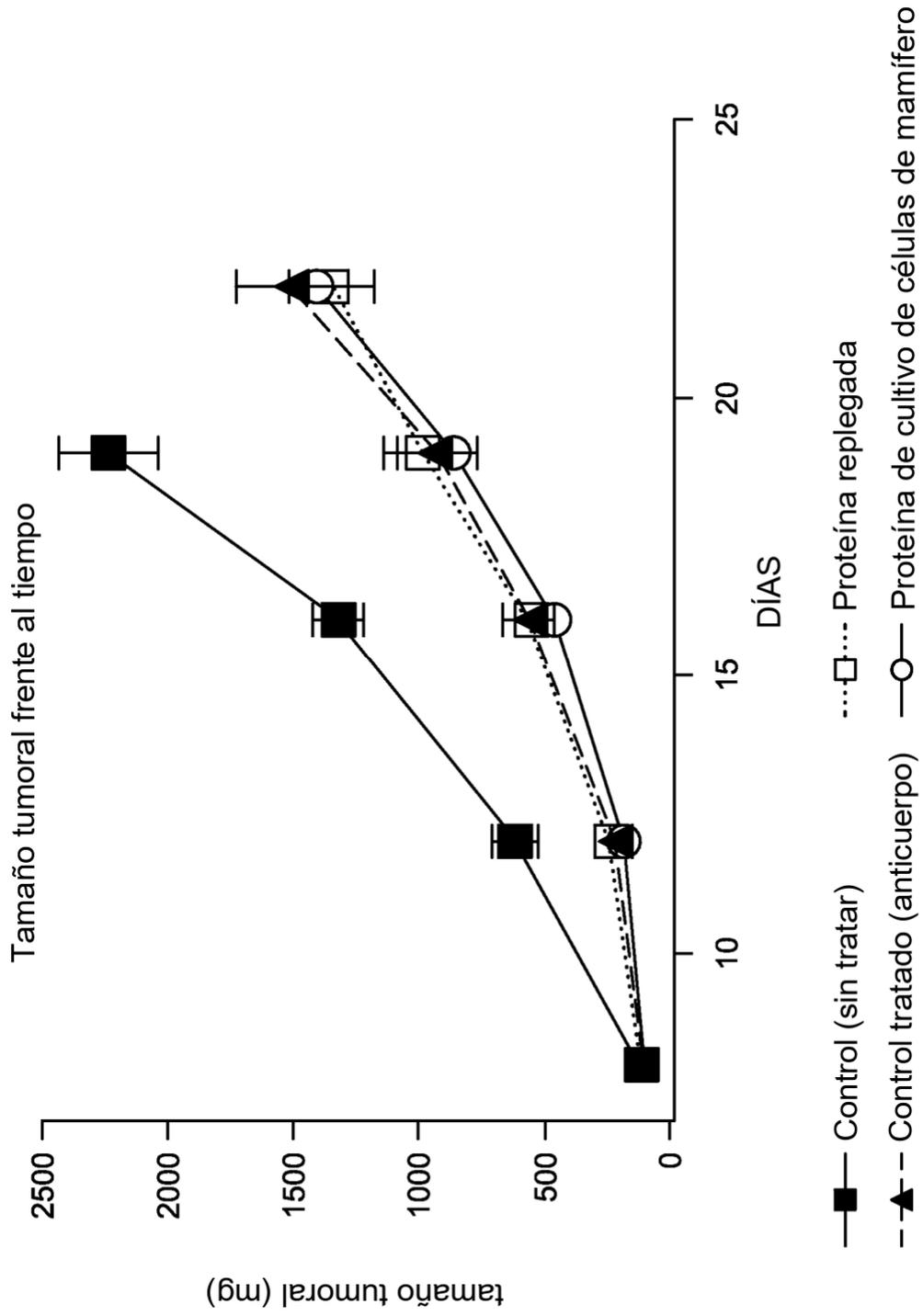
**FIG. 5**



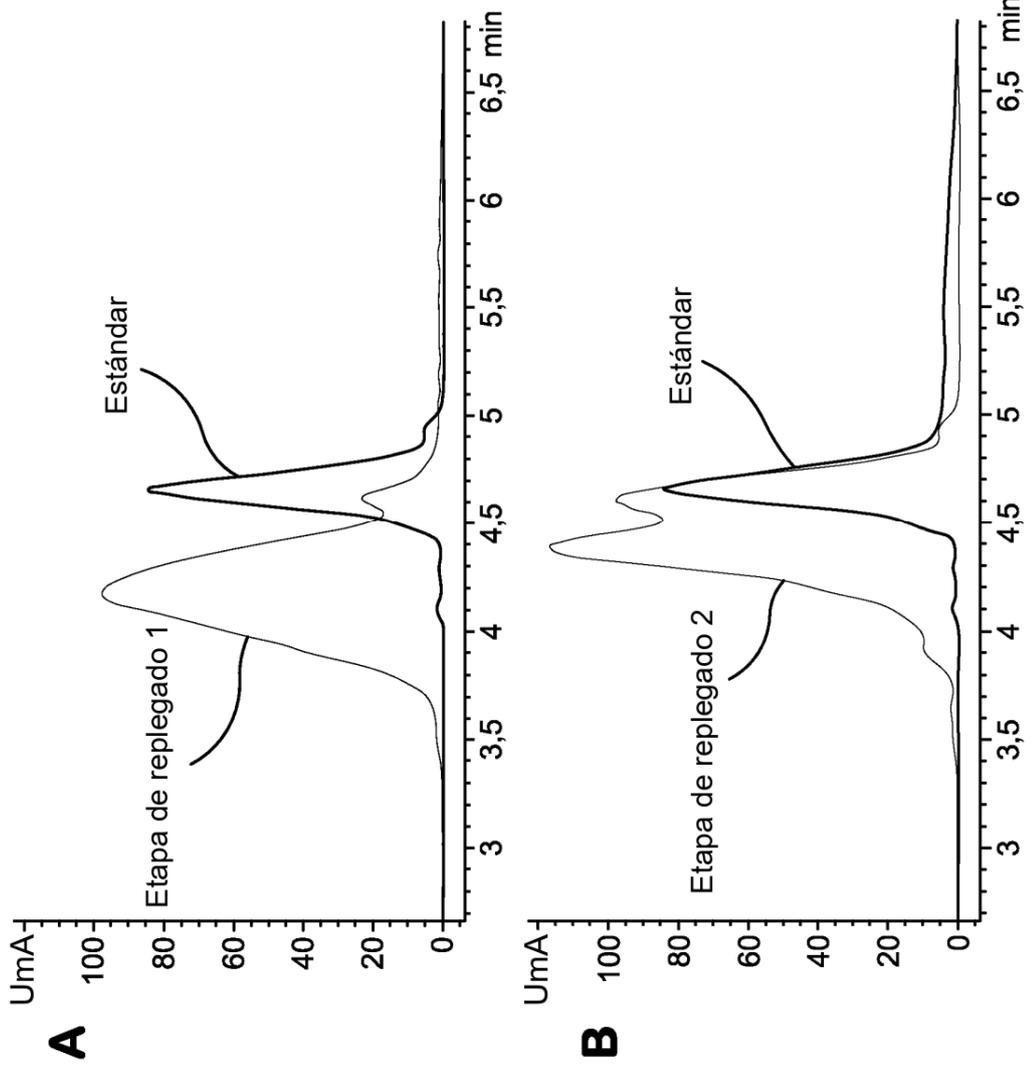
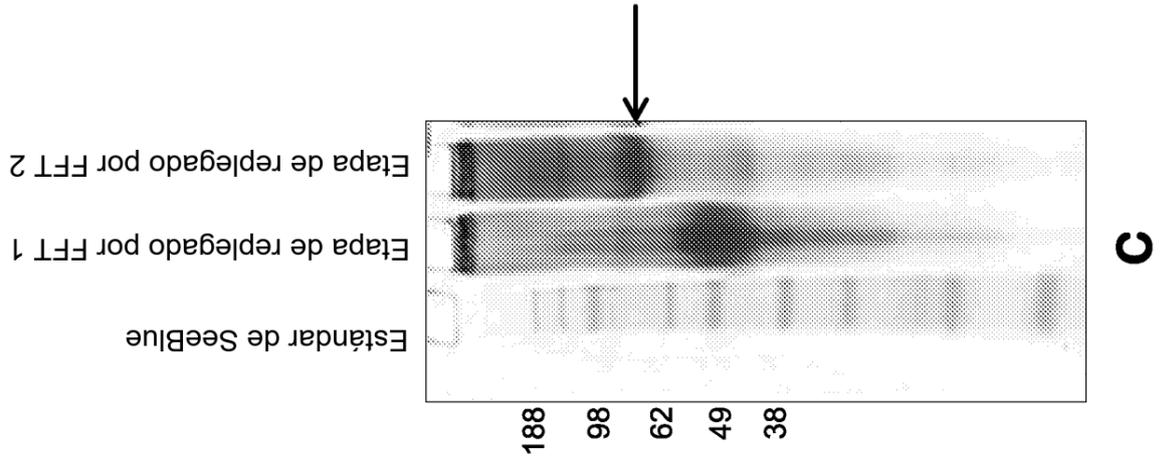
**FIG. 6**



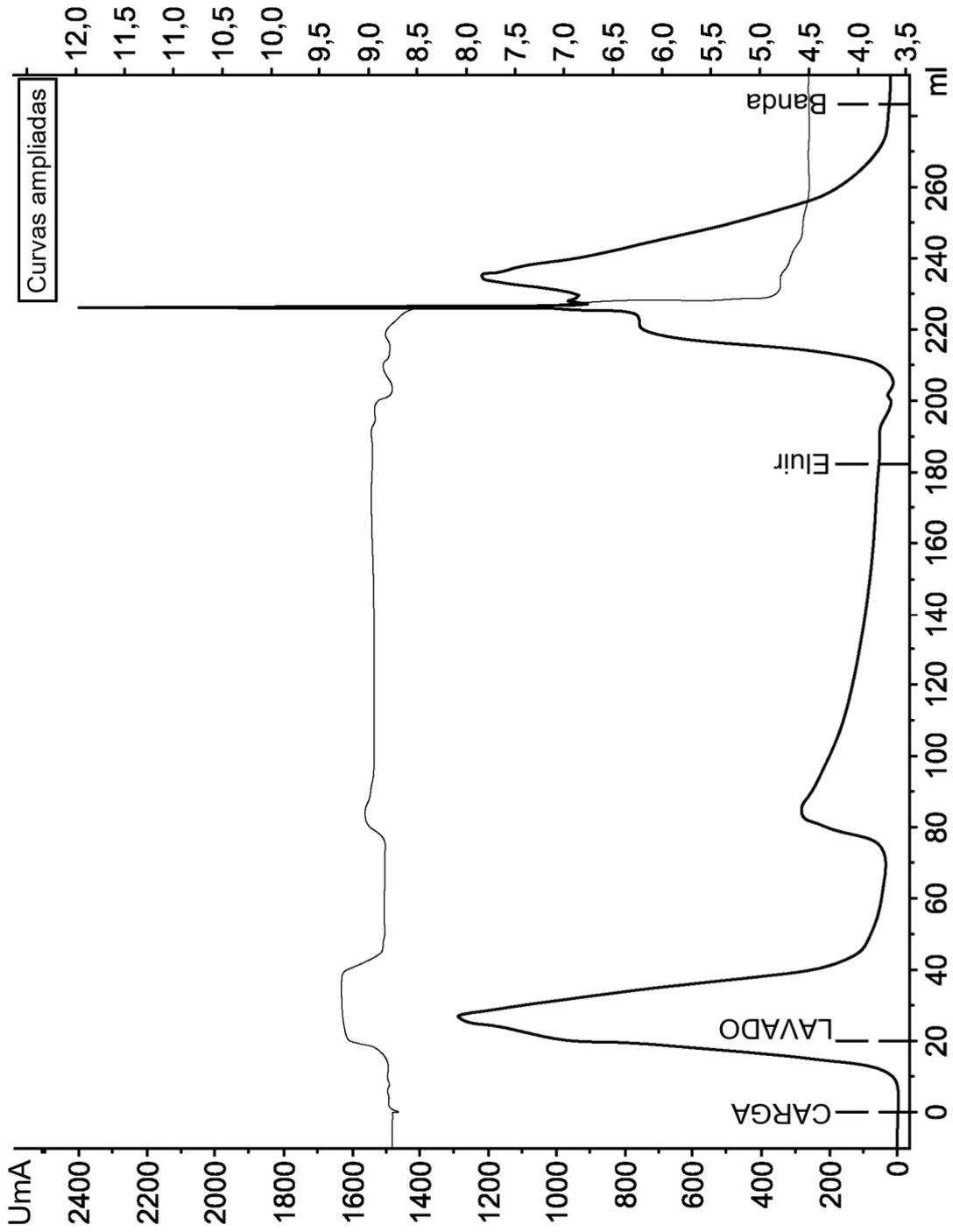
**FIG. 7**



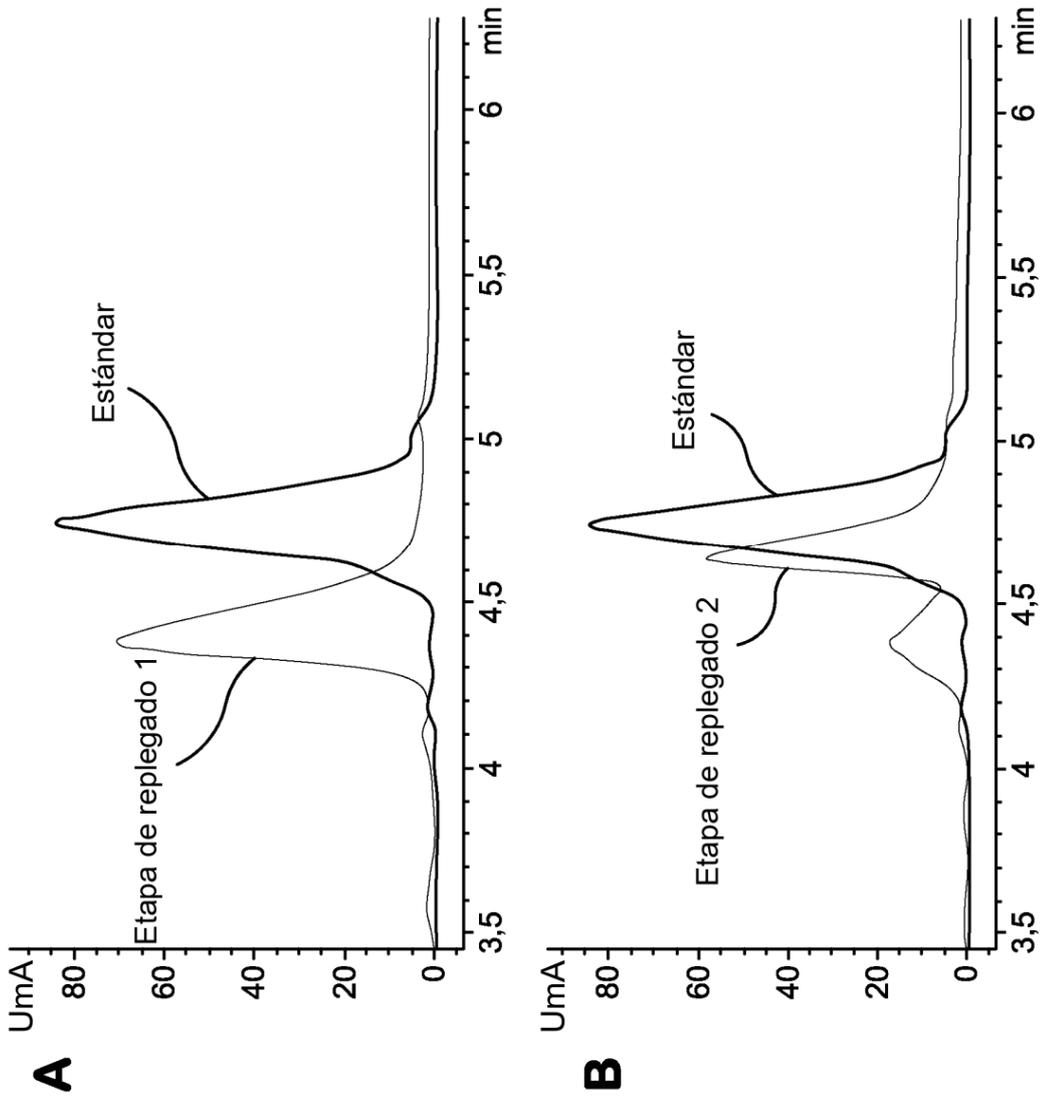
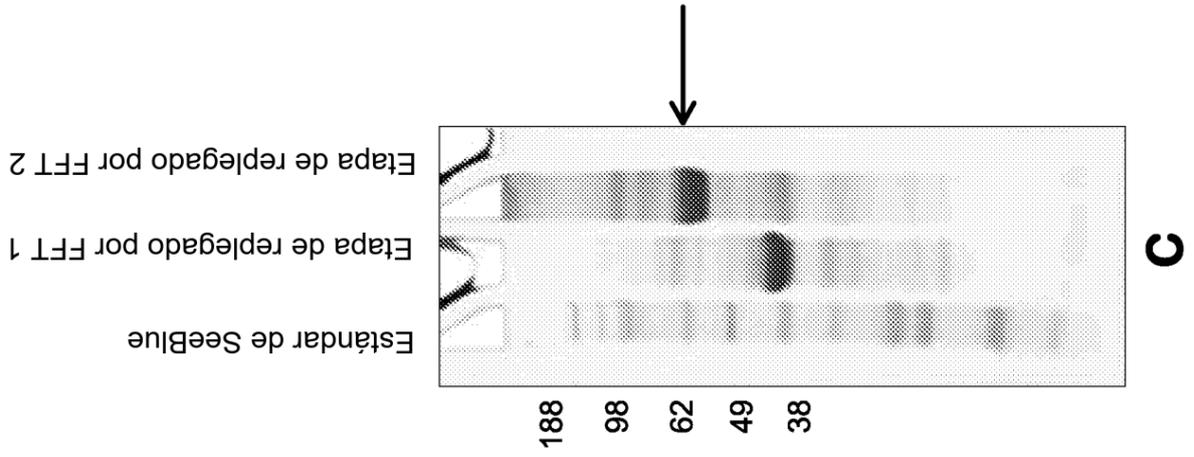
**FIG. 8**



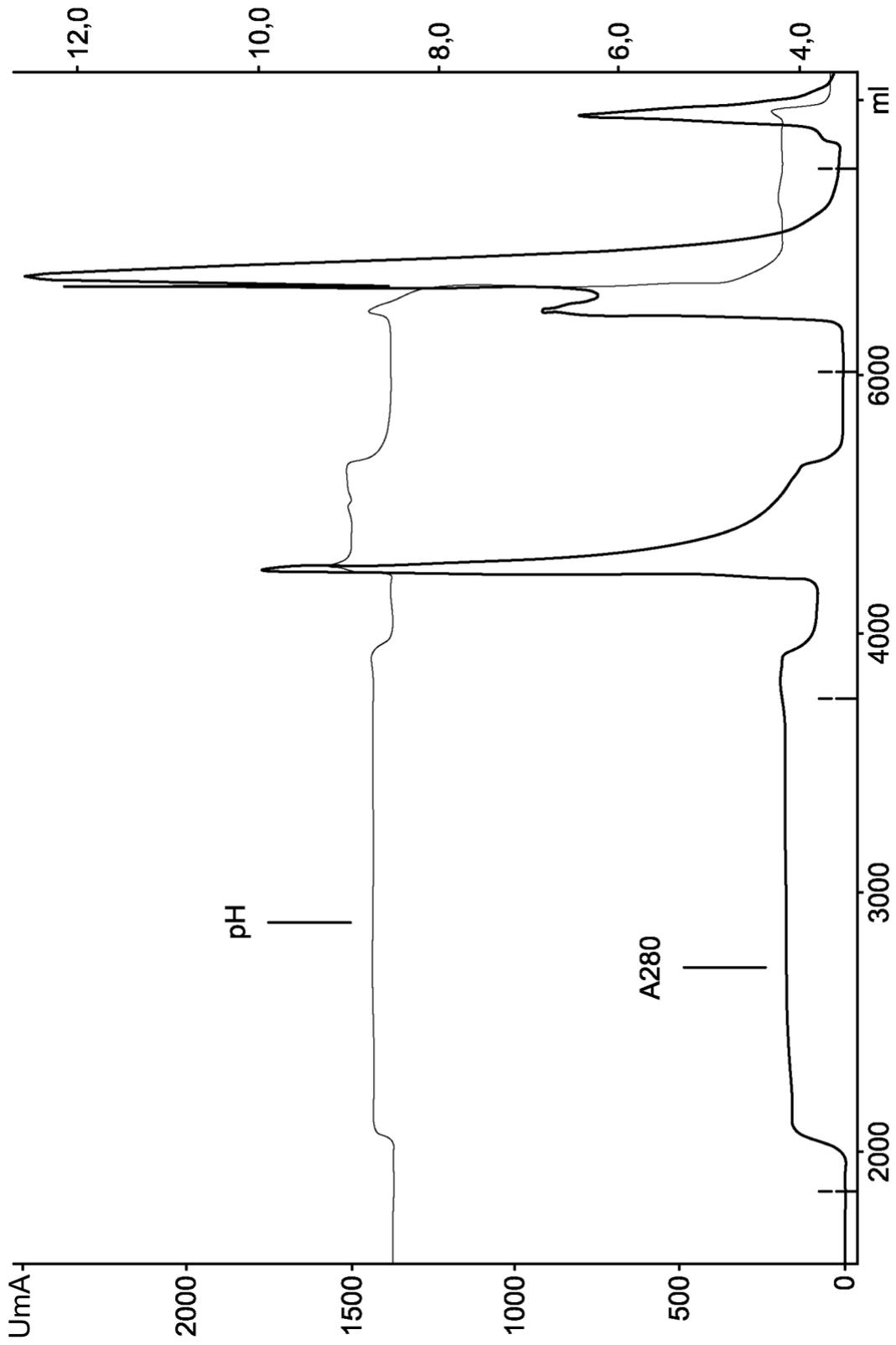
**FIG. 9**



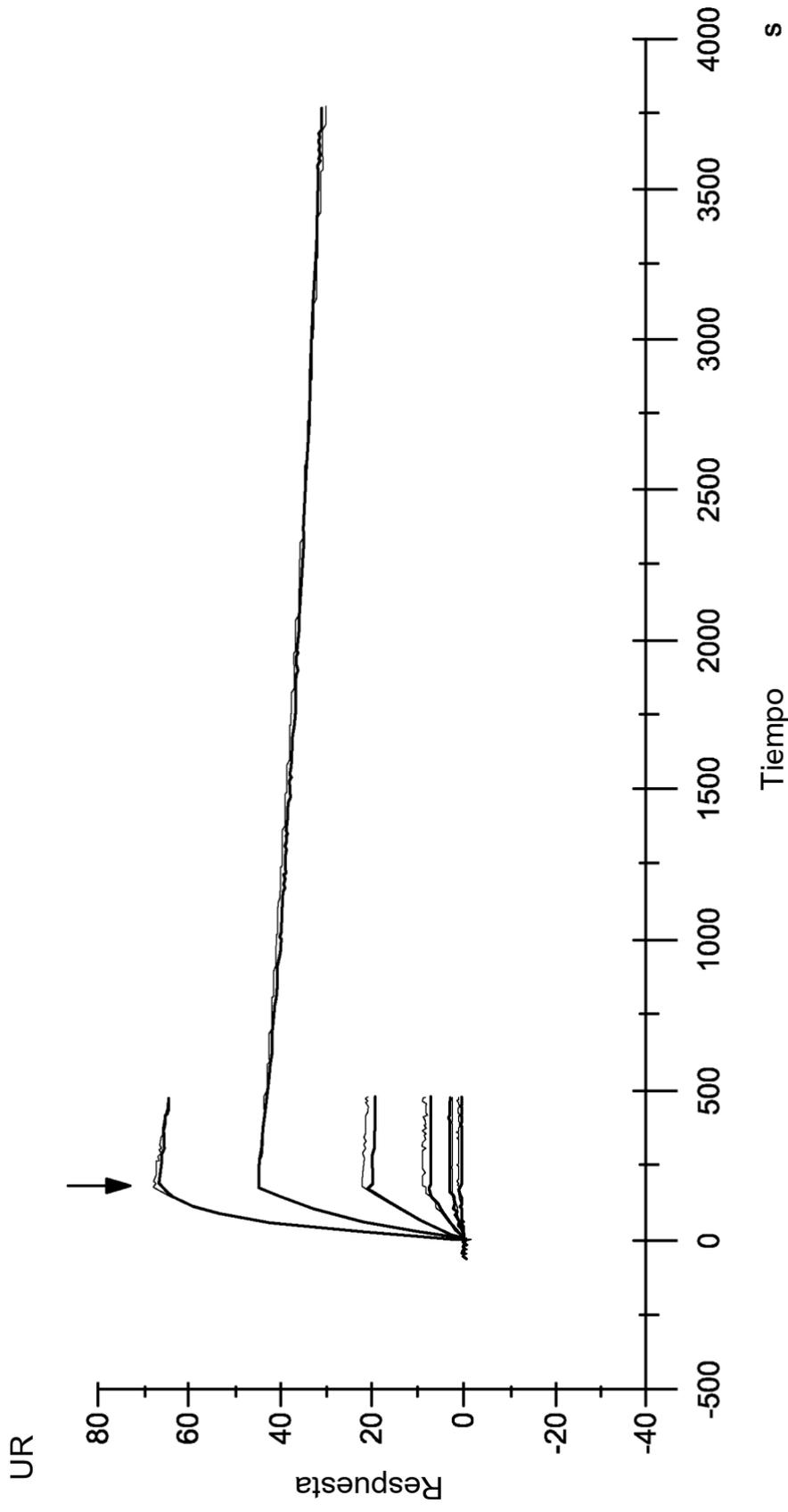
**FIG. 10**



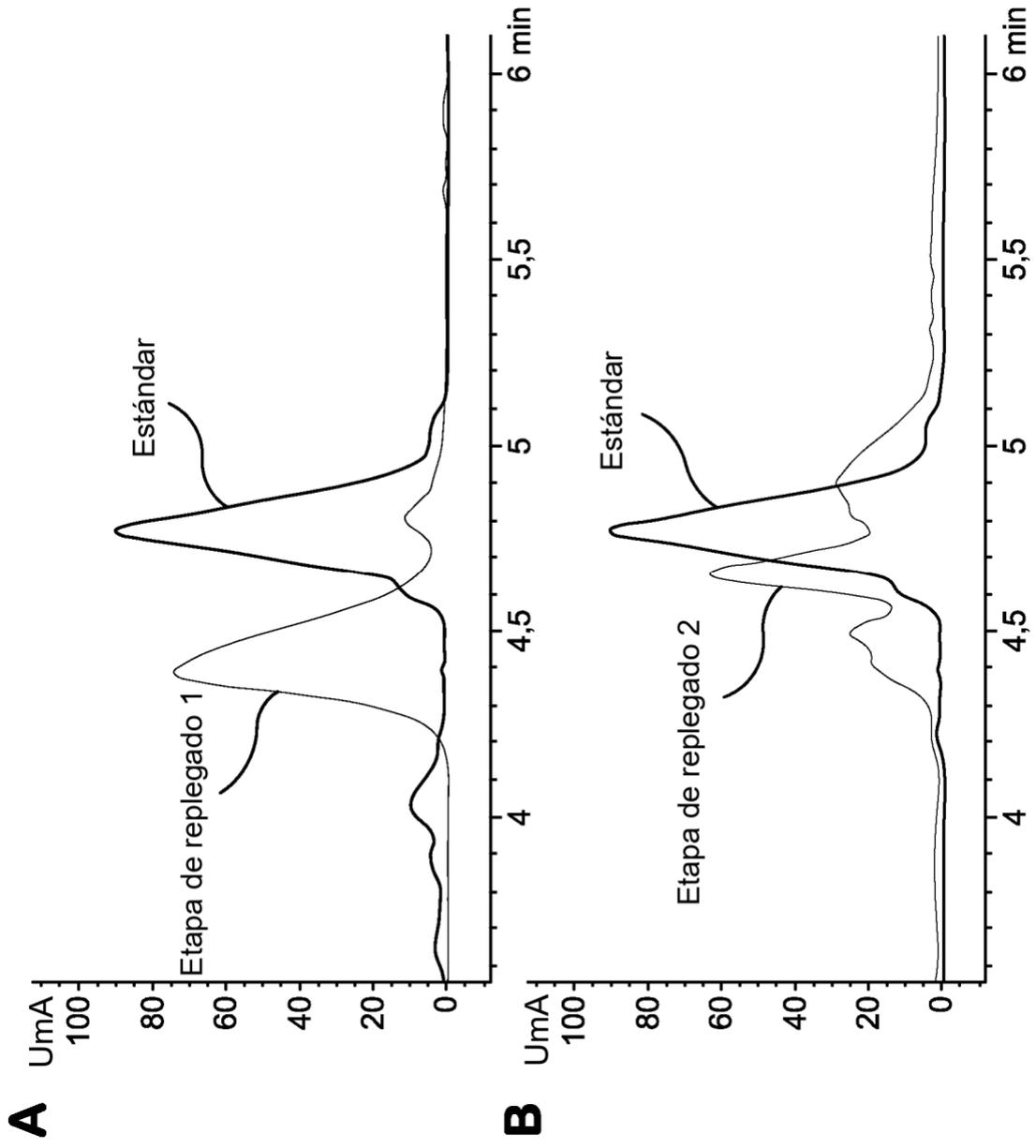
**FIG. 11**



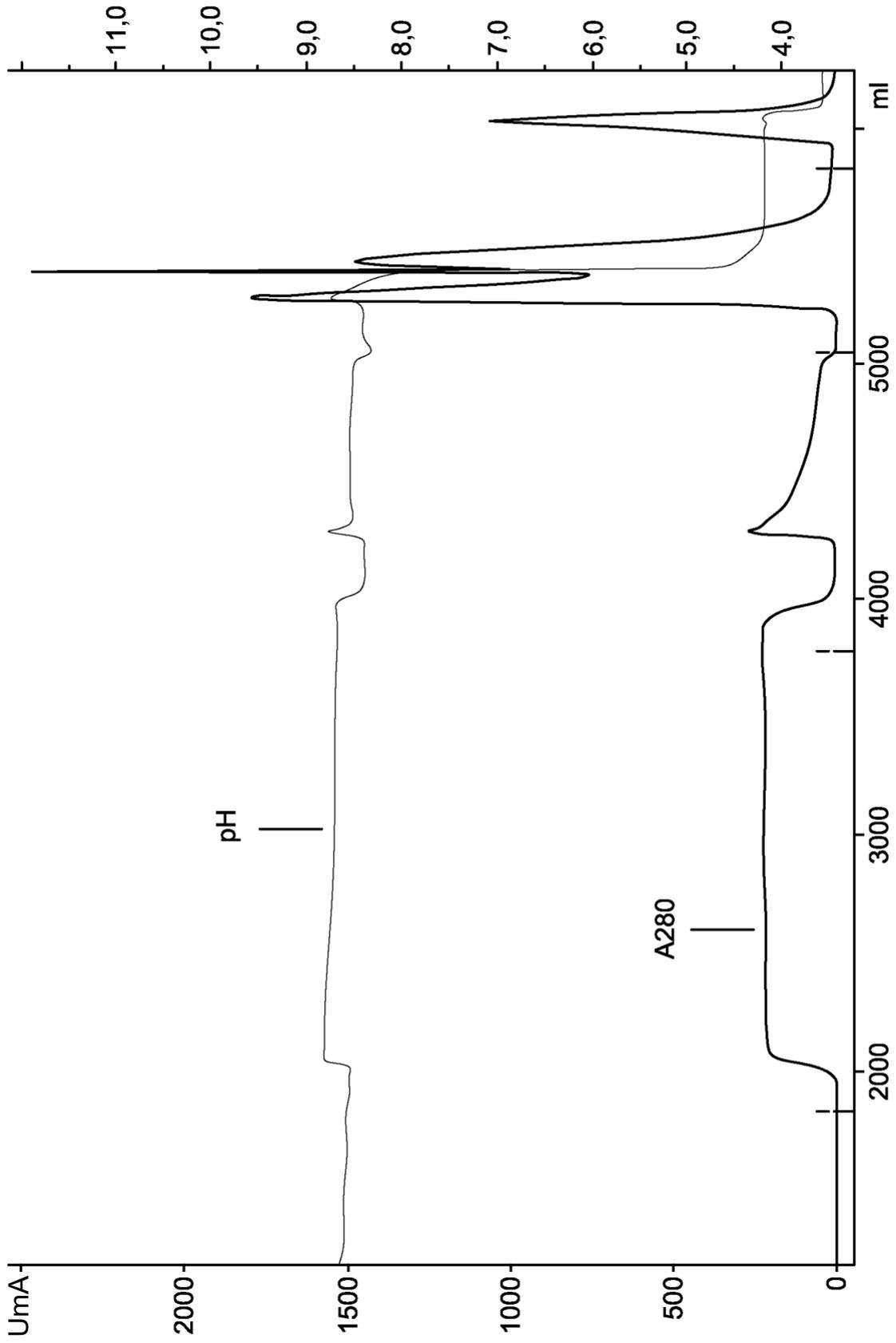
**FIG. 12**



**FIG. 13**



**FIG. 14**



**FIG. 15**