

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 127**

51 Int. Cl.:

C07K 14/765 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

A61K 47/50 (2007.01)

C07K 14/78 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2015 PCT/US2015/021535**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15143199**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2015 E 15714135 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3129401**

54 Título: **Dominios de tipo III de fibronectina de unión a seroalbúmina**

30 Prioridad:

20.03.2014 US 201461968181 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.12.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MITCHELL, TRACY, S.;
GOSSELIN, MICHAEL, L.;
LIPOVSEK, DASA;
PARKER, REX;
CAMPHAUSEN, RAY;
DAVIS, JONATHAN y
FABRIZIO, DAVID**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 736 127 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

Dominios de tipo III de fibronectina de unión a seroalbúmina

5 **Antecedentes**

Las semividas inadecuadas de los tratamientos a menudo requieren su administración a altas frecuencias y/o dosis más altas, o el uso de formulaciones de liberación sostenida, para mantener los niveles en suero necesarios para los efectos terapéuticos. No obstante, esto a menudo se asocia a efectos secundarios negativos. Por ejemplo, las inyecciones sistémicas frecuentes presentan un malestar considerable para el sujeto, y representan un alto riesgo de infecciones relacionadas con la administración, y pueden requerir hospitalización o visitas frecuentes al hospital, en particular, cuando el tratamiento debe administrarse por vía intravenosa. Además, en tratamientos a largo plazo, las inyecciones intravenosas diarias también pueden conducir a efectos secundarios considerables de cicatrización del tejido y enfermedades vasculares causadas por la punción repetida de los vasos. Se conocen problemas similares para todas las administraciones sistémicas frecuentes de tratamientos, tales como, por ejemplo, la administración de insulina a diabéticos o fármacos de interferón a pacientes que padecen esclerosis múltiple. Todos estos factores conducen a una disminución en el cumplimiento del paciente y a un aumento en los costes para el sistema de salud.

El documento WO2009/133208 A1 describe la identificación de dominios ¹⁰F_n3 que se unen a HSA en un ensayo ELISA y contienen modificaciones en la secuencia del bucle CD en relación con el bucle CD de ¹⁰F_n3 de tipo silvestre. Klöhn et al., MABS, (2013), vol. 5, n.º 2, páginas 178 - 201 describen la adnectina PKE dirigida a la albúmina. Los documentos WO2011/103105 A1 y WO2011130354 A1 describen dominios ¹⁰F_n3 de unión a IL-23 o de unión a PCSK9 que se modifican en uno o más de los bucles BC, DE, FG (es decir, en el polo norte) en relación con las secuencias de tipo silvestre correspondientes y polipéptidos de fusión de los mismos con un dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA. El documento WO2011/140086 A2 describe los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA, denominados SABA (adnectina de unión a seroalbúminas), que se modifican en uno o más de los bucles BC, DE, FG en relación con las secuencias de tipo silvestre correspondientes.

Esta solicitud proporciona compuestos que aumentan la semivida en suero de diversos tratamientos, teniendo los compuestos una semivida en suero aumentada, y métodos para aumentar la semivida en suero de los tratamientos. Dichos compuestos y métodos para aumentar la semivida en suero de los tratamientos se pueden fabricar de manera rentable, poseen propiedades biofísicas deseables (por ejemplo, T_m, sustancialmente monoméricas o bien plegadas), y son de un tamaño lo suficientemente pequeño para permitir la penetración del tejido.

35 **Sumario**

La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de nuevas Adnectinas (Adnectinas PKE2) que contienen un décimo dominio de tipo III de fibronectina (¹⁰F_n3) de unión a seroalbúmina basado en el polo sur, que proporciona propiedades mejoradas sobre las Adnectinas que contienen un dominio ¹⁰F_n3 de unión a seroalbúmina basado en el polo norte anterior.

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido que comprende un dominio ¹⁰F_n3, en donde el dominio ¹⁰F_n3 comprende a) bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG, b) un bucle CD con una secuencia de aminoácidos alterada en relación con la secuencia del bucle CD correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 humano y c) en donde el polipéptido se une a la seroalbúmina humana con una K_D de menos de 500 nM, en donde el bucle CD comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula G-X₁-X₂-V-X₃-X₄-X₅-S-X₆-X₇-G-X₈-X₉-Y-X₁₀-X₁₁-X₁₂-E, en donde (a) X₁ es R; (b) X₂ es E; (c) X₃ es Q; (d) X₄ es K; (e) X₅ es Y; (f) X₆ es D; (g) X₇ es L o W; (h) X₈ es P; (i) X₉ es L; (j) X₁₀ es I; (k) X₁₁ es Y; y (l) X₁₂ es Q o N, y el polipéptido se une a uno o más de la seroalbúmina de macaco rhesus, seroalbúmina de macaco cynomolgus, seroalbúmina de ratón y seroalbúmina de rata con una K_D de menos de 500 nM, por ejemplo, menos de 100 nM o menos de 10 nM.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un polipéptido que comprende un décimo dominio de tipo III de fibronectina (¹⁰F_n3) en donde el dominio ¹⁰F_n3 comprende bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG, y en donde el bucle CD comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 106, 113, 101-105, 107-112, y 114-125, y en donde el polipéptido se une a la seroalbúmina humana con una K_D de menos de 500 nM, y a una o más de la seroalbúmina de macaco rhesus, seroalbúmina de macaco cynomolgus, seroalbúmina de ratón y seroalbúmina de rata con una K_D de menos de 500 nM, por ejemplo, menos de 100 nM o menos de 10 nM.

En determinadas realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 puede unirse a HSA, seroalbúmina de macaco rhesus y seroalbúmina de macaco cynomolgus, o el dominio ¹⁰F_n3 puede unirse a HSA, seroalbúmina de macaco rhesus, seroalbúmina de macaco cynomolgus, seroalbúmina de ratón y seroalbúmina de rata. En algunas realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 se une a la seroalbúmina correspondiente con una K_D de menos de 500 nM, por ejemplo, una K_D de menos de 100 nM, o incluso una K_D de menos de 10 nM. En algunas realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 se une a seroalbúmina en un intervalo de pH de 5,5 a 7,4.

En determinadas realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 se une al dominio I-II de HSA.

En determinadas realizaciones, la semivida en suero del polipéptido que comprende el dominio ¹⁰F_n3 en presencia de seroalbúmina humana es de al menos 10 horas, tal como al menos 20 horas, o al menos 30 horas.

En determinadas realizaciones, el bucle CD comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula G-X₁-X₂-V-X₃-X₄-X₅-S-X₆-X₇-G-X₈-X₉-Y-X₁₀-X₁₁-X₁₂-E (SEQ ID NO: 170) como se define en el presente documento. En una realización preferida, (a) X₁ es R; (b) X₂ es E; (c) X₃ es Q; (d) X₄ es K; (e) X₅ es Y; (f) X₆ es D; (g) X₇ es L; (h) X₈ es P; (i) X₉ es L; (j) X₁₀ es I; (k) X₁₁ es Y; y (l) X₁₂ es Q.

En otra realización preferida adicional, (a) X₁ es R; (b) X₂ es E; (c) X₃ es Q; (d) X₄ es K; (e) X₅ es Y; (f) X₆ es D; (g) X₇ es W; (h) X₈ es P; (i) X₉ es L; (j) X₁₀ es I; (k) X₁₁ es Y; y (l) X₁₂ es N.

En determinadas realizaciones, el bucle CD comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 101-125. En una realización preferida, el bucle CD comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 106 o 113.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona un polipéptido que comprende un dominio ¹⁰F_n3 que comprende (i) un bucle CD que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia consenso de la SEQ ID NO: 170 como se define en el presente documento o la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 101-125 y (ii) una secuencia de aminoácidos al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a las regiones de bucle no CD de las SEQ ID NO: 23-100, 184-209 y 235-260 o que difiere de una de las SEQ ID NO: 23-100, 184-209 y 235-260 en a lo sumo 1, 1-2, 1-5, 1-10 o 1-20 aminoácidos. En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 23-100, 184-209 y 235-260 o que difiere de una de las SEQ ID NO: 23-100, 184-209 y 235-260 en a lo sumo 1, 1-2, 1-5, 1-10 o 1-20 aminoácidos. Las diferencias de aminoácidos pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones.

En determinados aspectos, la invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende un décimo de dominio de tipo III de fibronectina (¹⁰F_n3) de la invención y una proteína heteróloga.

En determinadas realizaciones, el polipéptido de fusión comprende una adnectina de unión a albúmina que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 23-100, 184-209 y 235-260 o que difiere de una de las SEQ ID NO: 23-100, 184-209 y 235-260 en a lo sumo 1, 1-2, 1-5, 1-10 o 1-20 aminoácidos. En una realización preferida, el polipéptido de fusión comprende una adnectina de unión a albúmina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55, 81, 190 o 241. En otra realización preferida más, el polipéptido de fusión comprende una adnectina de unión a albúmina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62, 88, 197 o 248.

En determinadas realizaciones, el polipéptido de fusión comprende una adnectina de unión a albúmina y una fracción heteróloga, en donde la fracción heteróloga es una fracción terapéutica.

En determinadas realizaciones, la proteína heteróloga es un polipéptido que comprende un dominio ¹⁰F_n3. En algunas realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 se une a una proteína diana distinta de la seroalbúmina. En una realización, el dominio ¹⁰F_n3 se une a PCSK9 (es decir, una adnectina PCSK9), y comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 167 o que difiere de la SEQ ID NO: 167 en a lo sumo 1, 1-2, 1-5, 1-10 o 1-20 aminoácidos.

En determinadas realizaciones, el polipéptido de fusión es una adnectina PCSK9-PKE2 en tándem que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 168, 169 o 261 o que difiere de una de las SEQ ID NO: 168, 169 o 261 en a lo sumo 1, 1-2, 1-5, 1-10 o 1-20 aminoácidos (y puede o no comprender una metionina N-terminal).

En determinadas realizaciones, la semivida en suero del polipéptido de fusión en presencia de seroalbúmina de ratón es de al menos 10 horas. En algunas realizaciones, la semivida en suero del polipéptido de fusión en presencia de seroalbúmina de macaco cynomolgus es de al menos 50 horas. En determinadas realizaciones, la semivida en suero del polipéptido de fusión en presencia de seroalbúmina de ratón o macaco cynomolgus es de al menos 10-100 horas, tal como 10-90 horas, 10-80 horas, 10-70 horas, 10-60 horas, 10-50 horas, 10-40 horas, 10-30 horas, 10-20 horas, 50-100 horas, 60-100 horas, 70-100 horas, 80-100 horas, 90-100 horas, 20-90 horas, 30-80 horas, 40-70 horas, o 50-60 horas.

En determinados aspectos, la invención proporciona una Adnectina PKE2 o Adnectina PCSK9-PKE2 en tándem que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 23-100, 168, 169, 184-209, 235-260 y 261.

En determinados aspectos, la invención proporciona una composición que comprende una cualquiera de las Adnectinas de unión a albúmina o proteínas de fusión que las comprenden, como se describe en el presente documento, y un vehículo.

En determinados aspectos, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una cualquiera de las Adnectinas de unión a albúmina o proteínas de fusión que las comprenden, como se describen en el presente documento, por ejemplo, las que se exponen en las SEQ ID NO: 126-151 y 172, vectores de expresión que codifican las moléculas de ácido nucleico, y las células que comprenden las moléculas de ácido nucleico. También se proporcionan ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos que es al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a cualquiera de estas secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento, o que difieren de ellas en a lo sumo 1-5, 1-10, 1-50 o 1-100 nucleótidos.

En determinados aspectos, la invención proporciona un método para producir adnectinas de unión a albúmina o proteínas de fusión que las comprenden descritas en el presente documento, que comprende cultivar la célula que comprende las moléculas de ácido nucleico que las codifican en condiciones adecuadas para expresar las adnectinas o proteínas de fusión, y purificar las mismas.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra un diagrama esquemático del ensayo AlphaScreen competitivo descrito en el Ejemplo 6.

La **Figura 2** es un gráfico que muestra la competencia de varias Adnectinas con el receptor FcRn humano para unirse a la seroalbúmina humana (HSA).

La **Figura 3** es un gráfico que representa las semividas en plasma de Adnectinas PKE2 2629_E06 y 2630_D02 en ratones TS.

La **Figura 4** es un gráfico que representa los resultados de la proliferación de linfocitos T para el porcentaje de antigenicidad y la presentación de las respuestas proliferativas para las Adnectinas 2629_E06 y 2630_D02, y la molécula original 2270_C01.

La **Figura 5** muestra una comparación de la modularidad de las adnectinas en tándem. La Adnectina 1318_H04 corresponde a una Adnectina de unión a seroalbúmina basada en el polo norte. La "X" se refiere a la configuración de la adnectina específica de diana no PKE (es decir, miostatina; "myo" o PCSK9). El panel inferior representa una leyenda para los tonos de gris en cada recuadro que corresponden a las relaciones de CE₅₀ de adnectina en tándem: monoadnectina de unión a HSA según lo determinado por ELISA de unión directa (es decir, cuanto más oscuro sea el tono de gris, más fuerte será la unión a HSA).

La **Figura 6** muestra los sensogramas de interferometría de biocapa de las adnectinas PCSK9-PKE2 en tándem que se unen a hPCSK9 en presencia o ausencia de HSA.

La **Figura 7** es un sensograma de Biacore que muestra la unión de la Adnectina PCSK9-PKE2 4472_C06 en tándem primero a HSA, luego a PCSK9 después de la inyección de las proteínas correspondientes.

La **Figura 8** es un gráfico que muestra el perfil PK *in vivo* de la adnectina PCSK9-PKE2 4772_C06 en tándem en ratones C57 Bl/6 de tipo silvestre.

La **Figura 9** muestra los niveles de PCSK9 libre después de la dosificación del vehículo o Adnectina PCSK9-PKE2 4472_C06 a 0,5 mg/kg o 2 mg/kg en ratones transgénicos hPCSK9.

La **Figura 10** es un gráfico que muestra los perfiles PK en plasma y las vidas medias de la Adnectina PKE2 2629_E06, la Adnectina PCSK9-PKE2 5190_E01 en tándem y PCSK9 PEGilada en macacos cynomolgus.

La **Figura 11** es un gráfico que muestra la semivida en plasma de la Adnectina PKE2 2270_C01 en macacos cynomolgus.

La **Figura 12** es un gráfico que muestra el perfil farmacodinámico de LDL-c y PCSK9 en macacos cynomolgus después de la administración de la adnectina PCSK9-PKE2 5190_E01 en tándem en macacos cynomolgus. El perfil demuestra una reducción robusta de LDL-c, la inhibición de PCSK9 libre y un aumento en el PCSK9 total, todos los cuales regresan a los valores iniciales al final del estudio.

La **Figura 13** es un gráfico que muestra los efectos de disminución de LDL-c de la adnectina PCSK9-PKE2 5190_E01 en tándem y un comparador de Adnectina PCSK9 PEGilada, junto con el control PKE2 2629_E06 en macacos cynomolgus.

La **Figura 14** muestra el compromiso de la diana por parte de la adnectina PCSK9-PKE2 en tándem en dos concentraciones diferentes en comparación con la adnectina PCSK9 PEGilada y la adnectina PKE2 2629_E06 en macacos cynomolgus.

La **Figura 15** muestra los niveles de PCSK9 totales a lo largo del tiempo en macacos cynomolgus después de la

administración de la adnectina PCSK9-PKE2 en tándem, la adnectina PCSK9 pegilada o la adnectina PKE2 2629_E06.

La **Figura 16** es un gráfico que muestra los resultados de la proliferación de linfocitos T para el porcentaje y la presentación de las respuestas proliferativas para las Adnectinas PCSK9-PKE2 en tándem 4472_F08, 4472_E06 y 4472_C06, así como el componente Adnectina PKE2 2629_E06 y el componente PCSK9 Adnectina 2382_D09. Las barras en el extremo izquierdo del gráfico corresponden a proteínas de control con antigenicidad baja, media y alta.

La **Figura 17** muestra las secuencias de aminoácidos de las Adnectinas PKE2 descritas en el presente documento.

Las **Figuras 18A-18C** muestran las secuencias de ácido nucleico de las Adnectinas PKE2 y Adnectinas PCSK9-PKE2 en tándem descritas en el presente documento.

Descripción detallada

Definiciones

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de la invención descrita también se pueden usar cualquier método y composición similar o equivalente a los descritos en el presente documento, en el presente documento se describen los métodos y composiciones preferentes. La siguiente descripción define realizaciones de la invención que se incluyen en las reivindicaciones.

Un "polipéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier secuencia de dos o más aminoácidos, independientemente de la longitud, modificación posterior a la traducción o función. "Polipéptido," "péptido", y "proteína" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Los polipéptidos pueden incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N.º 6.559.126. Los polipéptidos también se pueden modificar mediante cualquiera de varias formas químicas habituales (por ejemplo, se puede modificar un aminoácido con un grupo protector; el aminoácido de carboxilo terminal se puede convertir en un grupo amida terminal; el resto de amino terminal se puede modificar con grupos para, por ejemplo, mejorar la lipofilia; o el polipéptido se puede glucosilar químicamente o modificar de otro modo para aumentar la estabilidad o la semivida *in vivo*). Las modificaciones de polipéptidos pueden incluir la unión de otra estructura tal como un compuesto cíclico u otra molécula al polipéptido y también puede incluir polipéptidos que contienen uno o más aminoácidos en una configuración alterada (es decir, R o S; o, L o D).

Una "cadena polipeptídica", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido en donde cada uno de los dominios del mismo está unido a otro(s) dominio(s) mediante enlace(s) peptídico(s), en oposición a interacciones no covalentes o enlaces disulfuro.

Un polipéptido "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En las realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) en más de un 95 % en peso de polipéptido, según se determina mediante el método de Lowry y, lo más preferentemente, en más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. Un polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* con células recombinantes, ya que no estará presente al menos un componente del ambiente natural del polipéptido. Habitualmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Una "región" de un dominio ¹⁰Fn3 tal como se usa en el presente documento se refiere o bien a un bucle (AB, BC, CD, DE, EF y FG), una cadena β (A, B, C, D, E, F y G), el extremo N (que corresponde a los restos de aminoácidos 1-7 de la SEQ ID NO: 1), o el extremo C (que corresponde a los restos de aminoácidos 93-94 de la SEQ ID NO: 1) del dominio ¹⁰Fn3 humano.

Un "bucle del polo norte" se refiere a uno cualquiera de los bucles BC, DE y FG de un décimo dominio de tipo 3 de fibronectina (¹⁰Fn3) humano.

Un "bucle del polo sur" se refiere a cualquiera de los bucles AB, CD y EF de un décimo dominio de tipo 3 de fibronectina (¹⁰Fn3) humano.

Una "región de armazón" se refiere a cualquier región sin bucle de un dominio ¹⁰Fn3 humano. La región de armazón incluye las cadenas β A, B, C, D, E, F y G, así como la región N-terminal (aminoácidos correspondientes a los restos

1-8 de la SEQ ID NO: 1) y la región C-terminal (aminoácidos correspondientes a los restos 93-94 de la SEQ ID NO: 1 y que comprende opcionalmente los 7 aminoácidos que constituyen el enlazador natural entre la 10ª y la 11ª repetición del dominio Fn3 en la fibronectina humana).

5 "Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en una secuencia seleccionada, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y no considerar cualquier sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre toda la longitud de las secuencias que se comparan. A efectos del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se obtienen como se describe a continuación mediante el uso del programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue programado por Genentech, Inc. junto con la documentación para usuarios, se han depositado en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, donde está registrado bajo el Registro de Derechos de Autor de los Estados Unidos N.º TXU510087, y está disponible públicamente a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencia se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

25 A efectos del presente documento, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A para, con o contra una secuencia de aminoácidos dada B (que puede, como alternativa, citarse como una secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un % determinado de identidad de secuencia para, con o frente a una secuencia de aminoácidos B) se calcula del modo siguiente: 100 veces la fracción X/Y, donde X es el número de restos de aminoácidos puntuados como pares idénticos por el programa de alineación de secuencia ALIGN-2 en la alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A.

35 Las expresiones "se une específicamente", "unión específica", "unión selectiva", y "se une selectivamente", como se usa indistintamente en el presente documento, se refieren a una Adnectina que muestra afinidad por una seroalbúmina, pero no se une de manera significativa (por ejemplo, menos de aproximadamente el 10 % de unión) a un polipéptido diferente según lo medido por una técnica disponible en la técnica tal como, pero sin limitación, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva (por ejemplo, ELISA de competición, ensayo BIACORE). El término también es aplicable cuando, por ejemplo, un dominio de unión de una Adnectina de la invención es específico para la seroalbúmina.

45 La "semivida" de un polipéptido se puede definir generalmente como el tiempo que tarda la concentración del polipéptido en suero en reducirse en un 50 %, *in vivo*, por ejemplo, debido a la degradación del polipéptido y/o al aclaramiento o secuestro del polipéptido mediante mecanismos naturales. La semivida puede determinarse de cualquier manera conocida per se, tal como mediante análisis farmacocinético. Las técnicas adecuadas serán evidentes para el experto en la materia, y pueden, por ejemplo, implicar generalmente las etapas de administrar una dosis adecuada de un polipéptido a un primate; recoger muestras de sangre u otras muestras de dicho primate a intervalos regulares; determinar el nivel o la concentración del polipéptido en dicha muestra de sangre; y calcular, a partir de (una gráfica de) los datos así obtenidos, el tiempo hasta que el nivel o la concentración del polipéptido se ha reducido en un 50 % en comparación con el nivel inicial en la dosificación. Se pueden encontrar métodos para determinar la semivida, por ejemplo, en Kenneth et al., *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists* (1986); Peters et al., *Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach* (1996); y "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2ª edición rev. (1982).

55 La semivida se puede expresar utilizando parámetros tales como $t_{1/2}$ -alfa, $t_{1/2}$ -beta y el área bajo la curva (AUC). En la presente memoria descriptiva, un "aumento en la semivida" se refiere a un aumento en una cualquiera de estos parámetros, dos cualquiera de estos parámetros, o en los tres parámetros. En determinadas realizaciones, un aumento en la semivida se refiere a un aumento en $t_{1/2}$ -beta, ya sea con o sin un aumento en la $t_{1/2}$ -alfa y/o el AUC o ambos.

60 El término " K_D ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación en el equilibrio de una interacción Adnectina-proteína particular o la afinidad de una Adnectina por una proteína (por ejemplo, seroalbúmina), tal como se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial o un ensayo de unión celular. Una " K_D deseada", como se usa en el presente documento, se refiere a una K_D de una Adnectina que es suficiente para los fines contemplados. Por ejemplo, una K_D deseada puede referirse a la K_D de una Adnectina requerida para provocar un efecto funcional en un ensayo *in vitro*, por ejemplo, un ensayo de luciferasa basado en

células.

El término " k_{ass} ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de la tasa de asociación para la asociación de una Adnectina en el complejo Adnectina/proteína.

El término " k_{diss} ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de la tasa de disociación para la disociación de una Adnectina a partir del complejo Adnectina/proteína.

El término " CI_{50} ", como se usa en el presente documento, se refiere a la concentración de una Adnectina que inhibe una respuesta, bien en un ensayo *in vitro* o en un ensayo *in vivo*, a un nivel que es el 50 % de la respuesta inhibitoria máxima, es decir, a medio camino entre la respuesta inhibitoria máxima y la respuesta sin tratamiento.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados al trastorno.

Como se usa en este documento, "evitar" una enfermedad o trastorno se refiere a reducir la probabilidad de aparición de un estado de enfermedad en una muestra estadística en relación con una muestra de control no tratada, o retrasar la aparición o reducir la gravedad de uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno en relación a la muestra de control no tratada. Los pacientes pueden seleccionarse para terapia preventiva basándose en factores que se sabe que incrementan el riesgo o que sufren un estado patológico clínico en comparación con la población general. El término "tratar", como se usa en el presente documento, incluye (a) inhibir el estado patológico, es decir, detener su desarrollo; y/o (b) aliviar el estado patológico, es decir, causar la regresión del estado patológico una vez que se ha establecido.

Visión general

Los nuevos polipéptidos de armazón basados en fibronectina descritos en el presente documento se unen a seroalbúmina de varias especies y se pueden acoplar a moléculas adicionales, tales como otros dominios $^{10}\text{Fn3}$ que se unen a diferentes dianas, o polipéptidos para los cuales es beneficiosa una mayor semivida.

A. Estructura general de los armazones basados en fibronectina

Fn3 se refiere a un dominio de tipo III de la fibronectina. Un dominio Fn3 es pequeño, monomérico, soluble y estable. Carece de enlaces disulfuro y, por lo tanto, es estable en condiciones reductoras. La estructura general de Fn3 se parece al pliegue de inmunoglobulina. Los dominios Fn3 comprenden, en orden desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, una cadena beta o de tipo beta, A; un bucle, AB; una cadena beta o de tipo beta, B; un bucle, BC; una cadena beta o de tipo beta, C; un bucle, CD; una cadena beta o de tipo beta, D; un bucle, DE; una cadena beta o de tipo beta, E; un bucle, EF; una cadena beta o de tipo beta, F; un bucle, FG; y una cadena beta o de tipo beta, G. Las siete cadenas β antiparalelas se disponen como dos láminas beta que forman un núcleo estable, mientras que crean dos "caras" compuestas de los bucles que conectan las cadenas beta o de tipo beta. Los bucles AB, CD y EF se localizan en una cara ("el polo sur") y los bucles BC, DE y FG se localizan en la cara opuesta ("el polo norte"). Cualquiera o todos los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG pueden participar en la unión del ligando. Hay al menos 15 módulos Fn3 diferentes en la fibronectina humana, y aunque la secuencia de homología entre los módulos es baja, todos comparten una elevada similitud en la estructura terciaria.

En algunas realizaciones, el dominio Fn3 es un dominio Fn3 procedente del décimo módulo de tipo silvestre del dominio de tipo III de fibronectina humana ($^{10}\text{Fn3}$):

VSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATIS

GLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 1) (los bucles AB, CD y EF están subrayados).

En algunas realizaciones, las secuencias de unión sin ligando de $^{10}\text{Fn3}$, es decir, el "armazón $^{10}\text{Fn3}$ ", pueden alterarse siempre que el $^{10}\text{Fn3}$ retenga la función de unión del ligando y/o la estabilidad estructural. Han sido informados varios armazones mutantes $^{10}\text{Fn3}$. En un aspecto, uno o más de Asp 7, Glu 9 y Asp 23 se reemplaza por otro aminoácido, tal como, por ejemplo, un resto de aminoácido no cargado negativamente (por ejemplo, Asn, Lys, etc.). Se ha informado que estas mutaciones tienen el efecto de promover una mayor estabilidad del $^{10}\text{Fn3}$ mutante a un pH neutro en comparación con la forma de tipo silvestre (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 02/04523). Se ha desvelado varias alteraciones adicionales en el armazón $^{10}\text{Fn3}$ que son beneficiosas o neutrales. Véase, por ejemplo, Batori et al., Protein Eng., 15(12):1015-1020 (Diciembre de 2002); Koide et al., Biochemistry, 40(34):10326-10333 (28 de agosto de 2001).

Tanto la proteína $^{10}\text{Fn3}$ variante como la de tipo silvestre se caracterizan por la misma estructura, a saber, siete secuencias de dominio de cadena beta designadas de A a G y seis regiones de bucle (bucle AB, bucle BC, bucle CD, bucle DE, bucle EF y bucle FG) que conectan las siete secuencias de dominio de cadena beta. Las cadenas beta ubicadas más cerca de los extremos N y C pueden adoptar una conformación tipo beta en solución. En la SEQ ID NO: 1, el bucle AB corresponde a los restos 14-17, el bucle BC corresponde a los restos 23-31, el bucle CD

corresponde a los restos 37-47, el bucle DE corresponde a los restos 51-56, el bucle EF corresponde a los restos 63-67, y el bucle FG corresponde a los restos 76-87.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la adnectina de unión a seroalbúmina de la invención es un polipéptido ¹⁰F_n3 que es al menos el 40 %, 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % idéntico al dominio ¹⁰F_n3 humano, mostrado en la SEQ ID NO: 1. Gran parte de la variabilidad generalmente ocurrirá en uno o más de los bucles. Cada una de las cadenas beta o de tipo beta de un polipéptido ¹⁰F_n3 puede consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a la secuencia de una cadena beta o de tipo beta correspondiente de la SEQ ID NO: 1, siempre que dicha variación no interrumpa la estabilidad del polipéptido en condiciones fisiológicas.

De manera adicional, también se pueden hacer inserciones y deleciones en las regiones bucle mientras que aún se producen dominios de unión a ¹⁰F_n3 de unión a suero de alta afinidad. Por consiguiente, en algunas realizaciones, uno o más bucles seleccionados de AB, BC, CD, DE, EF y FG se pueden alargar o acortar en longitud en relación con el correspondiente bucle en ¹⁰F_n3 humano de tipo silvestre. En cualquiera de los polipéptidos dados, uno o más bucles se pueden extender en longitud, uno o más bucles se pueden reducir en longitud o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la longitud de un bucle dado se puede extender en 2-25, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20, o 10-15 aminoácidos. En algunas realizaciones, la longitud de un bucle dado se puede reducir en 1-15, 1-11, 1-10, 1-5, 1-3, 1-2, 2-10, o 2-5 aminoácidos.

Como se describió anteriormente, los restos de aminoácidos correspondientes a los restos 14-17, 23-30, 37-47, 51-56, 63-67 y 76-87 de la SEQ ID NO: 1 definen los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG, respectivamente. Sin embargo, se debería de entender que no todos los restos en una región de bucle necesitan modificarse para lograr un dominio de unión de ¹⁰F_n3 que tiene una gran afinidad por una diana deseada. En algunas realizaciones, solo los restos en un bucle, es decir, el bucle CD se modifican para producir dominios ¹⁰F_n3 de unión a diana de alta afinidad.

En algunas realizaciones, la invención proporciona polipéptidos que comprenden un dominio ¹⁰F_n3, en donde el dominio ¹⁰F_n3 comprende bucles AB, BC, CD, EF y FG, el bucle CD con una secuencia de aminoácidos alterada en relación con la secuencia del bucle CD correspondiente del dominio de ¹⁰F_n3 humano como se define en el presente documento, y tiene al menos un bucle seleccionado de los bucles AB, CD y EF con una secuencia de aminoácidos alterada en relación con la secuencia del bucle correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 humano de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, los bucles AB, CD y EF están alterados. En determinadas realizaciones, solo el bucle CD está alterado. En determinadas realizaciones, los bucles AB y CD están ambos alterados. En determinadas realizaciones, los bucles CD y EF están ambos alterados. En algunas realizaciones, se combinan una o más alteraciones específicas del armazón con una o más alteraciones del bucle. Con "alteración" se refiere a una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos en relación con una secuencia de molde (es decir, el correspondiente dominio de fibronectina humano de tipo silvestre) e incluye adiciones, deleciones y sustituciones de aminoácidos.

En algunas realizaciones, la proteína de armazón basada en fibronectina comprende un dominio ¹⁰F_n3 que tiene una combinación de alteraciones de bucles del polo norte y sur. Por ejemplo, uno o más de los bucles AB, CD y EF, en combinación con uno o más de los bucles BC, DE y FG, pueden alterarse en relación con los bucles correspondientes del dominio ¹⁰F_n3 humano de la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, el polipéptido comprende un dominio ¹⁰F_n3 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 100 % idéntica a las regiones sin bucle y/o regiones de bucle no modificadas de la SEQ ID NO: 1, en donde al menos el bucle CD está alterado. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el bucle AB puede tener hasta 4 sustituciones de aminoácidos, hasta 10 inserciones de aminoácidos, hasta 3 deleciones de aminoácidos o una combinación de las mismas; y el bucle EF puede tener hasta 5 sustituciones de aminoácidos, hasta 10 inserciones de aminoácidos, hasta 3 deleciones de aminoácidos o una combinación de las mismas; y/o el bucle FG puede tener hasta 12 sustituciones de aminoácidos, hasta 11 deleciones de aminoácidos, hasta 25 inserciones de aminoácidos o una combinación de las mismas.

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

En determinadas realizaciones, la proteína de armazón basada en fibronectina comprende un dominio ¹⁰F_n3 que se define generalmente siguiendo la secuencia:

VSDVPRDLEVVAAX_uLLISW(X)_vYRITY(X)_wFTV(X)_xATISGL(X)_yYTITVYA(X)_zISI
 NYRT (SEQ ID NO: 2)

- En la SEQ ID NO: 2, el bucle AB se representa mediante (X)_u, el bucle BC se representa mediante (X)_v, el bucle CD se representa mediante (X)_w, el bucle DE se representa mediante (X)_x, el bucle EF se representa mediante (X)_y y el bucle FG se representa mediante X_z. X representa cualquier aminoácido, y el subíndice tras la X representa un número entero del número de aminoácidos. En particular, u, v, w, x, y y z pueden ser cada uno independientemente de 2-20, 2-15, 2-10, 2-8, 5-20, 5-15, 5-10, 5-8, 6-20, 6-15, 6-10, 6-8, 2-7, 5-7, o 6-7 aminoácidos. Las secuencias de las cadenas beta (subrayadas) pueden tener en cualquier parte de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, o de 0 a 1 sustituciones, deleciones o adiciones a través de las 7 regiones de armazón en relación con los correspondientes aminoácidos mostrados en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, las secuencias de las cadenas beta pueden tener en cualquier parte de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2 o de 0 a 1 sustituciones conservadoras a través de las 7 regiones de armazón en relación con los correspondientes aminoácidos mostrados en la SEQ ID NO: 2. En determinadas realizaciones, los restos de aminoácidos hidrófobos del núcleo (restos en **negrita** en la SEQ ID NO: 2 arriba) son fijos, y cualquier sustitución, sustituciones conservativas, deleciones o adiciones tienen lugar en otros restos que no sean los restos de aminoácidos hidrófobos del núcleo. En algunas realizaciones, los restos hidrófobos del núcleo de los polipéptidos proporcionados en el presente documento no se han modificado en relación con el dominio ¹⁰Fn3 humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1).
- En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de las regiones N-terminal y/o C-terminal de los polipéptidos proporcionados en el presente documento se pueden modificar mediante deleción, sustitución o inserción en relación con las secuencias de aminoácidos de las correspondientes regiones del dominio ¹⁰Fn3 humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). Los dominios ¹⁰Fn3 generalmente comienzan con el aminoácido número 1 de la SEQ ID NO: 1. Sin embargo, los dominios con deleciones de aminoácidos también se abarcan por la invención. También pueden añadirse secuencias adicionales al extremo N o C de un dominio ¹⁰Fn3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la extensión de N-terminal consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: M, MG y G.
- En realizaciones ilustrativas, se puede añadir una región N-terminal alternativa que tiene de 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, o 1 aminoácidos de longitud a la región N-terminal de la SEQ ID NO: 1. Las regiones N-terminales alternativas a modo de ejemplo incluyen (representadas por el código de aminoácidos de una sola letra) M, MG, G, MGVSVDVPRDL (SEQ ID NO: 3) y GVSVDVPRDL (SEQ ID NO: 4). Otras regiones adecuadas de N-terminal alternativas incluyen, por ejemplo, X_nSDVPRDL (SEQ ID NO: 5), X_nDVPRDL (SEQ ID NO: 6), X_nVPRDL (SEQ ID NO: 7), X_nPRDL (SEQ ID NO: 8), X_nRDL (SEQ ID NO: 9), X_nDL (SEQ ID NO: 10) o X_nL, en donde n = 0, 1 o 2 aminoácidos, en donde cuando n = 1, X es Met o Gly, y cuando n = 2, X es Met-Gly. Cuando se añade una secuencia de Met-Gly al extremo N-terminal de un dominio ¹⁰Fn3, la M generalmente se escindirán, dejando una G en el extremo N-terminal. En determinadas realizaciones, la región de N-terminal alternativa comprende la secuencia de aminoácidos MASTSG (SEQ ID NO: 11).
- En realizaciones ilustrativas, se puede añadir una región C-terminal alternativa que tiene de 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, o 1 aminoácidos de longitud a la región C-terminal de la SEQ ID NO: 1. Los ejemplos específicos de secuencias alternativas de la región C-terminal incluyen, por ejemplo, polipéptidos que comprenden, que consisten esencialmente en, o que consisten en, EIEK (SEQ ID NO: 12), EGSGC (SEQ ID NO: 13), EIEKPCQ (SEQ ID NO: 14), EIEKPSQ (SEQ ID NO: 15), EIEKP (SEQ ID NO: 16), EIEKPS (SEQ ID NO: 17) o EIEKPC (SEQ ID NO: 18). En algunas realizaciones, la región alternativa de C-terminal comprende EIDK (SEQ ID NO: 19 y, en realizaciones particulares, la región alternativa de C-terminal es o bien EIDKPCQ (SEQ ID NO: 20) o bien EIDKPSQ (SEQ ID NO: 21). Las regiones alternativas de C-terminal adecuadas adicionales incluyen las que se muestran en la Tabla 20 y las SEQ ID NO: 210-220.
- En determinadas realizaciones, las secuencias de extensión de C-terminal comprenden restos E y D, y pueden tener de entre 8 y 50, 10 y 30, 10 y 20, 5 y 10, y 2 y 4 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, las secuencias de cola incluyen enlazadores basados en ED en los que la secuencia comprende repeticiones en tándem de ED. En realizaciones ilustrativas, la secuencia de cola comprende 2-10, 2-7, 2-5, 3-10, 3-7, 3-5, 3, 4 o 5 repeticiones de ED. En determinadas realizaciones, las secuencias de cola basadas en ED también pueden incluir restos de aminoácidos adicionales, tales como, por ejemplo: EI, EID, ES, EC, EGS y EGC. Dichas secuencias se basan, en parte, en secuencias de cola de Adnectina conocidas, tal como EIDKPSQ (SEQ ID NO: 21), en las que se han eliminado los restos D y K. En realizaciones ilustrativas, la cola basada en ED comprende un resto E, I o EI antes de que se repita el ED.
- En determinadas realizaciones, una fracción alternativa de C-terminal, que puede estar unida a los aminoácidos de C-terminal RT (es decir, el aminoácido 93-94 de la SEQ ID NO: 1) de cualquiera de las Adnectinas proporcionadas en el presente documento comprende los aminoácidos P_mX_n, en donde P es prolina, X es cualquier aminoácido, m es un número entero que es al menos 1 y n es 0 o un número entero que es al menos 1. En determinadas

realizaciones, la fracción alternativa de C-terminal comprende los aminoácidos PC. En determinadas realizaciones, la fracción alternativa de C-terminal comprende los aminoácidos PI, PC, PID, PIE, PIDK (SEQ ID NO: 221), PIEK (SEQ ID NO: 222), PIDKP (SEQ ID NO: 223), PIEKP (SEQ ID NO: 224), PIDKPS (SEQ ID NO: 225), PIEKPS (SEQ ID NO: 226), PIDKPC (SEQ ID NO: 227), PIEKPC (SEQ ID NO: 228), PIDKPSQ (SEQ ID NO: 229), PIEKPSQ (SEQ ID NO: 230), PIDKPCQ (SEQ ID NO: 231), PIEKPCQ (SEQ ID NO: 232), PHHHHHH (SEQ ID NO: 233) y PCHHHHHH (SEQ ID NO: 234).

En determinadas realizaciones, las proteínas de armazón basadas en fibronectina comprenden un dominio ¹⁰F_n3 que tiene tanto una secuencia de la región N-terminal alternativa como una secuencia de la región C-terminal alternativa.

B. Aglutinantes de seroalbúmina que tienen bucles modificados en el polo sur

Los dominios ¹⁰F_n3 se eliminan rápidamente de la circulación mediante la filtración renal y la degradación debido a su pequeño tamaño de aproximadamente 10 kDa ($t_{1/2}$ = 15-45 minutos en ratones; 3 horas en monos). En determinados aspectos, la solicitud proporciona dominios ¹⁰F_n3 con modificaciones del polo sur que se unen específicamente a la seroalbúmina, por ejemplo, seroalbúmina humana (HSA) para prolongar la $t_{1/2}$ del dominio ¹⁰F_n3.

La HSA tiene una concentración en suero de 600 μ M y una $t_{1/2}$ de 19 días en seres humanos. La $t_{1/2}$ extendida de HSA se ha atribuido, en parte, a su reciclado a través del receptor de Fc neonatal (FcRn). La HSA se une a FcRn de una manera dependiente del pH después de la captación endosomal en las células endoteliales; esta interacción recicla HSA de nuevo en el torrente sanguíneo, lo que la aleja de la degradación lisosomal. FcRn se expresa ampliamente y se piensa que la ruta de reciclado es constitutiva. En la mayoría de los tipos de células, la mayoría de los FcRn residen en el endosoma de clasificación intracelular. La HSA se internaliza fácilmente mediante un mecanismo no específico de pinocitosis en fase líquida y se rescata de la degradación en el lisosoma por FcRn. Al pH ácido en el que se encuentra el endosoma, la afinidad de HSA por FcRn aumenta (5 μ M a pH 6,0). Una vez que se une a FcRn, la HSA se desvía de la vía de degradación lisosomal, se transciota y se libera en la superficie celular.

Las adnectinas de unión a seroalbúmina basadas en el polo norte, en el presente documento, denominadas adnectinas de unión a seroalbúmina de "primera generación", se han descrito en, por ejemplo, el documento WO2011140086. Con el fin de mejorar las adnectinas de unión a la seroalbúmina (SABA) de primera generación basadas en el polo norte, algunas de las cuales no se unieron a la seroalbúmina de ratón o rata, no tenían una alta afinidad por las seroalbúminas de todas las especies, y no siempre fueron compatibles en una plataforma multivalente basada en ¹⁰F_n3, las adnectinas de unión a la seroalbúmina de segunda generación basadas en el polo sur (Adnectinas PKE2) con bucles del polo sur modificados se desarrollaron como se describe en los Ejemplos.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un dominio ¹⁰F_n3 que tiene (i) una modificación en la secuencia de aminoácidos de al menos un bucle del polo sur seleccionado de los bucles AB, CD y EF en relación con el bucle correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), en donde el bucle CD comprende una secuencia de aminoácidos como se define en el presente documento y en donde el dominio ¹⁰F_n3 se une a la seroalbúmina humana con una K_D de menos de 500 nM, y a uno o más de seroalbúmina de macaco rhesus, seroalbúmina de macaco cynomolgus, seroalbúmina de ratón y seroalbúmina de rata con una K_D de menos de 500 nM, por ejemplo, menos de 100 nM o menos de 10 nM. Los bucles modificados del polo sur contribuyen a la unión a la misma diana. Se contemplan diversas combinaciones de los bucles modificados del polo sur. Por ejemplo, un ¹⁰F_n3 puede comprender un bucle modificado del polo sur, dos bucles modificados del polo sur o incluso los tres bucles modificados del polo sur. En determinadas realizaciones, se pueden hacer uno o más bucles modificados del polo sur junto con uno o más bucles modificados del polo norte (es decir, uno o más de los bucles BC, DE y FG). Los bucles modificados pueden tener modificaciones de la secuencia a través de todo el bucle o solo en una parte del bucle. De manera adicional, uno o más de los bucles modificados puede tener inserciones o deleciones de manera que la longitud del bucle es variada en relación con la longitud del bucle correspondiente de la secuencia de tipo silvestre (es decir, SEQ ID NO: 1). En determinadas realizaciones, las regiones adicionales en el dominio ¹⁰F_n3 (es decir, además de los bucles del polo sur), tal como las cadenas β , las regiones de N-terminal y/o de C-terminal, también se pueden modificar en la secuencia en relación con el dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre, y tales modificaciones adicionales también pueden contribuir a la unión a la diana. En determinadas realizaciones, un bucle del polo sur es el único dominio que se modifica. En realizaciones específicas, el bucle CD es el único dominio que se modifica. En determinadas realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 de unión al suero puede modificarse para comprender una secuencia de extensión N-terminal y/o una secuencia de extensión C-terminal, como se describe *supra*.

La invención proporciona Adnectinas que se unen a la seroalbúmina que tiene un bucle CD alterado en relación con el bucle correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 humano de tipo silvestre, por ejemplo, los dominios ¹⁰F_n3 establecidos en las SEQ ID NO: 23-100, 184-209 y 235-260. En algunas realizaciones, las adnectinas de unión a albúmina comprenden, o alternativamente, carecen de una cola his 6X. En algunas realizaciones, las adnectinas de unión a albúmina corresponden a las adnectinas del núcleo que carecen del líder N-terminal y la cola C-terminal, como se establece en las SEQ ID NO: 75-100.

En realizaciones ilustrativas, las proteínas ¹⁰F_n3 de unión a la seroalbúmina descritas en el presente documento se unen a la seroalbúmina humana con una K_D de menos de 3 μM, 2,5 μM, 2 μM, 1,5 μM, 1 μM, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, 100 pM, 50 pM o 10 pM. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, de 0,1 nM a 100 nM, de 0,1 nM a 1 μM, de 0,5 nM a 50 nM, de 0,5 nM a 100 nM, de 0,5 nM a 1 μM, de 1 nM a 50 nM, de 1 nM a 100 nM o de 1 nM a 1 μM.

Las adnectinas de unión a albúmina (o proteínas ¹⁰F_n3) descritas en el presente documento también se unen a la seroalbúmina de uno o más de macacos cynomolgus, macaco rhesus, de rata o ratón.

En determinadas realizaciones, las proteínas ¹⁰F_n3 de unión a seroalbúmina descritas en el presente documento se unen a la seroalbúmina de macaco rhesus (RhSA) o la seroalbúmina de macaco cynomolgus (CySA) con una K_D de menos de 3 μM, 2,5 μM, 2 μM, 1,5 μM, 1 μM, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM o 100 pM. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, de 0,1 nM a 100 nM, de 0,1 nM a 1 μM, de 0,5 nM a 50 nM, de 0,5 nM a 100 nM, de 0,5 nM a 1 μM, de 1 nM a 50 nM, de 1 nM a 100 nM o de 1 nM a 1 μM.

En determinadas realizaciones, las proteínas ¹⁰F_n3 de unión a seroalbúmina descritas en el presente documento se unen a la seroalbúmina de macaco rhesus (RhSA), seroalbúmina de macaco cynomolgus (CySA) y seroalbúmina de ratón (MSA) con una K_D de menos de 3 μM, 2,5 μM, 2 μM, 1,5 μM, 1 μM, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM o 100 pM. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, de 0,1 nM a 100 nM, de 0,1 nM a 1 μM, de 0,5 nM a 50 nM, de 0,5 nM a 100 nM, de 0,5 nM a 1 μM, de 1 nM a 50 nM, de 1 nM a 100 nM o de 1 nM a 1 μM.

En determinadas realizaciones, las proteínas ¹⁰F_n3 de unión a seroalbúmina descritas en el presente documento se unen a la seroalbúmina de macaco rhesus (RhSA), seroalbúmina de macaco cynomolgus (CySA), seroalbúmina de ratón (MSA) y seroalbúmina de rata (RSA) con una K_D de menos de 3 μM, 2,5 μM, 2 μM, 1,5 μM, 1 μM, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM o 100 pM. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, de 0,1 nM a 100 nM, de 0,1 nM a 1 μM, de 0,5 nM a 50 nM, de 0,5 nM a 100 nM, de 0,5 nM a 1 μM, de 1 nM a 50 nM, de 1 nM a 100 nM o de 1 nM a 1 μM.

En determinadas realizaciones, las adnectinas de unión a albúmina descritas en el presente documento se unen a seroalbúmina en un intervalo de pH de 5,5 a 7,4.

En determinadas realizaciones, las adnectinas de unión a albúmina descritas en el presente documento se unen al dominio I-II de la seroalbúmina humana.

En determinadas realizaciones, la semivida en suero de las adnectinas de unión a albúmina de la invención o la semivida en suero de las adnectinas de unión a albúmina unidas a una fracción heteróloga, por ejemplo, una segunda adnectina, es de al menos 2 horas, 2,5 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 15 horas, 20 horas, 25 horas, 30 horas, 35 horas, 40 horas, 50 horas, 60 horas, 70 horas, 80 horas, 90 horas, 100 horas, 110 horas, 120 horas, 130 horas, 135 horas, 140 horas, 150 horas, 160 horas, o 200 horas. En determinadas realizaciones, la semivida en suero de las adnectinas de unión a albúmina o la semivida en suero de las adnectinas de unión a albúmina unidas a una fracción heteróloga, por ejemplo, una segunda adnectina, es de 2-200 horas, 5-200 horas, 10-200 horas, 25-200 horas, 50-200 horas, 100-200 horas, 150-200 horas, 2-150 horas, 2-100 horas, 2-50 horas, 2-25 horas, 2-10 horas, 2-5 horas, 5-150 horas, 10-100 horas, o 25-50 horas.

En determinadas realizaciones, las Adnectinas de unión a albúmina comprenden una secuencia que tiene al menos el 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 % u 85 % idéntico al dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). En una realización, al menos uno de los bucles AB, CD o EF se modifica en relación con el dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre. En determinadas realizaciones, al menos dos de los bucles AB, CD o EF se modifican en relación con el dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre. En determinadas realizaciones, los tres bucles AB, CD o EF se modifican en relación con el dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre. En determinadas realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 de unión a seroalbúmina comprende una secuencia que tiene al menos el 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a una cualquiera de las SEQ ID NO: 23-100, 184-209 y 235-260.

En determinadas realizaciones, un dominio ¹⁰F_n3 de unión a seroalbúmina (o Adnectina) puede comprender la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en donde el bucle CD está representado por (X)_w y se reemplaza por un bucle CD de cualquiera de las 26 secuencias de adnectina PKE2 de núcleo (es decir, SEQ ID NO: 75-100). Las regiones de armazón de dichas adnectinas de unión a albúmina pueden tener en cualquier parte de 0 a 20, de 0 a 15, de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, o de 0 a 1 sustituciones, sustituciones conservativas, delecciones o adiciones en relación a los restos de aminoácidos de armazón de la SEQ ID NO: 1. Dichas modificaciones de armazón pueden realizarse, siempre y cuando la adnectina de unión a albúmina sea capaz de unirse a la seroalbúmina, por ejemplo, HSA, con una K_D deseada.

En algunas realizaciones, la región de bucle CD de las adnectinas de unión a albúmina de la invención se puede describir de acuerdo con una secuencia consenso.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, el bucle CD está definido mediante la secuencia consenso G-X₁-X₂-V-X₃-X₄-X₅-S-X₆-X₇-G-X₈-X₉-Y-X₁₀-X_n-X₁₂-E (SEQ ID NO: 170), en donde,

- 5 (a) X₁ es R;
- (b) X₂ es E;
- (c) X₃ es Q;
- (d) X₄ es K;
- (e) X₅ es Y;
- (f) X₆ es D;
- 10 (g) X₇ es L o W;
- (h) X₈ es P;
- (i) X₉ es L;
- (j) X₁₀ es I;
- (k) X₁₁ es Y; y
- 15 (l) X₁₂ es Q o N.

En una realización preferida, X₇ es L y X₁₂ es Q.

En otra realización preferida, X₇ es W y X₁₂ es N.

- 20 En una realización preferida, el bucle CD de las adnectinas de unión a albúmina de la invención comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 25 GRHVQIYSDLGPLYIYTE (SEQ ID NO: 101),
- GRHVHIYSDWGPMYIYTE (SEQ ID NO: 102),
- GREVQKYSVLGPLYIYTE (SEQ ID NO: 103),
- GREVQMYSYDLGPLYVYSE (SEQ ID NO: 104),
- GREVQKFSDWGPLYIYTE (SEQ ID NO: 105),
- GREVQKYSDLGPLYIYQE (SEQ ID NO: 106),
- 30 GREVHQYSDWGPMYIYNE (SEQ ID NO: 107),
- GREVHKNSDWGTLIYIYTE (SEQ ID NO: 108),
- GREVQKYSDLGPLYIYAE (SEQ ID NO: 109),
- GREVHLYSDWGPMYIYTE (SEQ ID NO: 110),
- GRHVQMYSYDLGPLYIFSE (SEQ ID NO: 111),
- 35 GREVHMYSDFGPMYIYTE (SEQ ID NO: 112),
- GREVQKYSDWGPLYIYNE (SEQ ID NO: 113),
- GREVQMYSYDLGPLYIYNE (SEQ ID NO: 114),
- GREVQMYSYDLGPLYIYTE (SEQ ID NO: 115),
- GRHVQIYSDLGPLYIYNE (SEQ ID NO: 116),
- 40 GREVQIYSDWGPLYIYNE (SEQ ID NO: 117),
- GREVQKYSDWGPLYIYQE (SEQ ID NO: 118),
- GRHVHLYSEFGPMYIYNE (SEQ ID NO: 119),
- GRDVHMYSDWGPMYIYQE (SEQ ID NO: 120),
- GRHVQIYSDWGPLYIYNE (SEQ ID NO: 121),
- 45 GRYVQLYSDWGPMYIYTE (SEQ ID NO: 122),
- GRQVQVFSYDLGPLYIYNE (SEQ ID NO: 123),
- GRQVQIYSDWGPLYIYNE (SEQ ID NO: 124), y
- GRQVQMYSYDLGPLYIYAE (SEQ ID NO: 125).

- 50 En algunas realizaciones, la adnectina de unión a albúmina comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 23-100, 184-209 y 235-260 o difiere de la misma en a lo sumo 1, 1-2, 1-3, 1-5, 1-10 o 1-20 diferencias de aminoácidos, por ejemplo, deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservativas). En determinadas realizaciones, las moléculas de unión a albúmina comprenden una secuencia de aminoácidos al
- 55 menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a las regiones de bucle no CD de las SEQ ID NO: 23-100, 184-209 y 235-260.

- En una realización preferida, la Adnectina de unión a albúmina comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 29, 55, 81, 190 y 241. En otra realización preferida, la Adnectina de unión a
- 60 albúmina comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 36, 62, 88, 197 y 248.

- En algunas realizaciones, la invención proporciona moléculas de adnectina de unión a albúmina mutante que tienen un resto de cisteína introducido en una posición específica. Las mutaciones de cisteína a modo de ejemplo son
- 65 A12C, A26C, S55C, T56C y T58C (véase Tabla 7 en los Ejemplos). En una realización preferida, las mutaciones de cisteína no alteran sustancialmente la unión de la adnectina de unión a albúmina, a la seroalbúmina.

En determinadas realizaciones, se introduce un resto de prolina en el extremo C del dominio ¹⁰F_n3, por ejemplo, como se muestra, por ejemplo, en las SEQ ID NO: 184-209 y 235-260. En determinadas realizaciones, se introduce un resto de prolina en el extremo C de una adnectina de unión a albúmina en tándem, como se muestra, por ejemplo, en las SEQ ID NO: 168 y 261. La adición del resto de prolina no excluye la adición de secuencias de aminoácidos adicionales al extremo C de una adnectina de unión a albúmina o adnectina de unión a albúmina en tándem.

C. Adnectinas de competencia cruzada y/o adnectinas que se unen al mismo sitio de unión de adnectina

En el presente documento se proporcionan proteínas, tales como adnectinas, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, moléculas pequeñas, péptidos y similares que compiten (por ejemplo, competencia cruzada) por la unión a seroalbúmina (por ejemplo, HSA) con las Adnectinas PKE2 particulares descritas en el presente documento. Dichas proteínas competidoras, por ejemplo, adnectinas, pueden identificarse en función de su capacidad para inhibir competitivamente la unión a la seroalbúmina (por ejemplo, HSA) de las adnectinas descritas en el presente documento en ensayos estándar de unión a seroalbúmina. Por ejemplo, se pueden usar ensayos ELISA estándar en los que se inmoviliza una proteína de seroalbúmina recombinante en la placa, una de las proteínas se marca con fluorescencia y se evalúa la capacidad de la proteína no marcada para competir con la unión de la proteína marcada.

Los siguientes ensayos de competencia a modo de ejemplo se proporcionan en el contexto de adnectinas que compiten por la unión a seroalbúmina con una de las proteínas PKE2 descritas en el presente documento. Se pueden realizar los mismos ensayos cuando una proteína que no es Adnectina se prueba para competir. En una realización, se puede realizar un formato ELISA competitivo para determinar si dos adnectinas de seroalbúmina se unen a los sitios de unión de adnectina superpuestos (epítomos) en la seroalbúmina (por ejemplo, HSA). En un formato, Adnectina n.º 1 se reviste en una placa, que luego se bloquea y se lava. A esta placa se añade seroalbúmina sola o seroalbúmina preincubada con una concentración de saturación de adnectina n.º 2. Después de un período de incubación adecuado, la placa se lava y se prueba con un anticuerpo policlonal anti-seroalbúmina, seguido de detección con conjugado de estreptavidina-HRP y procedimientos estándar de desarrollo de tetrametilbenzidina. Si la señal de DO es la misma con o sin preincubación con Adnectina n.º 2, entonces las dos Adnectinas se unen independientemente entre sí y sus sitios de unión a Adnectina no se superponen. Si, sin embargo, la señal de DO para los pocillos que recibieron mezclas de seroalbúmina/Adnectina n.º 2 es menor que para aquellos que recibieron solo seroalbúmina, se confirma que la unión de Adnectina n.º 2 bloquea la unión de Adnectina n.º 1 a la seroalbúmina.

Como alternativa, se lleva a cabo un experimento similar mediante resonancia de plasmón superficial (SPR, por ejemplo, BIAcore). La adnectina n.º 1 se inmoviliza en una superficie de chip de SPR, seguida de inyecciones de seroalbúmina sola o seroalbúmina preincubada con una concentración de saturación de adnectina n.º 2. Si la señal de unión para las mezclas de seroalbúmina/Adnectina n.º 2 es la misma o mayor que la de la seroalbúmina sola, entonces las dos Adnectinas se unen independientemente entre sí y sus sitios de unión a Adnectina no se superponen. Si, sin embargo, la señal de unión para las mezclas de seroalbúmina/Adnectina n.º 2 es menor que la señal de unión para seroalbúmina sola, se confirma que la unión de Adnectina n.º 2 bloquea la unión de Adnectina n.º 1 a la seroalbúmina. Una característica de estos experimentos es el uso de concentraciones de saturación de Adnectina n.º 2. Si la seroalbúmina no está saturada con adnectina n.º 2, las conclusiones anteriores no son válidas. Se pueden usar experimentos similares para determinar si alguna de las dos proteínas de unión a seroalbúmina se une a sitios de unión de adnectina superpuestos.

Ambos ensayos ejemplificados anteriormente también se pueden realizar en el orden inverso en donde la adnectina n.º 2 se inmoviliza y la seroalbúmina-Adnectina n.º 1 se añade a la placa. Como alternativa, la adnectina n.º 1 y/o n.º 2 se puede reemplazar con un anticuerpo monoclonal y/o una proteína de fusión de receptor-Fc soluble.

En determinadas realizaciones, la competencia puede determinarse usando un ensayo en sándwich HTRF.

En determinadas realizaciones, la Adnectina competidora es una Adnectina que se une al mismo sitio de unión de Adnectina en la seroalbúmina como una Adnectina PKE2 particular descrita en el presente documento. Se pueden utilizar técnicas de mapeo estándar, tal como el mapeo de proteasas, el análisis mutacional, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional, para determinar si una Adnectina se une al mismo sitio de unión de Adnectina como una Adnectina de referencia (véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

Las proteínas de unión a albúmina candidatas competidoras, por ejemplo, adnectinas, pueden inhibir la unión de las adnectinas PKE2 de la invención a la seroalbúmina (por ejemplo, HSA) en al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %. El % de competencia puede determinarse utilizando los métodos descritos anteriormente.

D. Adnectinas multivalentes/en tándem

En el presente documento se proporcionan proteínas multivalentes que comprenden dos o más dominios ¹⁰F_n3 que se unen específicamente a una diana (adnectinas). Por ejemplo, una proteína multivalente puede comprender 2, 3 o más dominios ¹⁰F_n3 que se asocian covalentemente. En realizaciones ilustrativas, la proteína multivalente es una proteína biespecífica o dimérica que comprende dos dominios ¹⁰F_n3. En determinadas realizaciones, una proteína multivalente comprende un primer dominio ¹⁰F_n3 de la invención que se une a la seroalbúmina como se define en el presente documento y un segundo dominio ¹⁰F_n3 que se une a una segunda molécula diana (por ejemplo, PCSK9). Cuando tanto la primera como la segunda molécula diana son seroalbúmina, el primer y el segundo dominio ¹⁰F_n3 pueden unirse a los mismos epítomos o diferentes. De manera adicional, cuando la primera y la segunda molécula diana son la misma, las regiones de modificación en el dominio ¹⁰F_n3 que están asociadas a la unión a la diana pueden ser iguales o diferentes. En realizaciones ilustrativas, cada dominio ¹⁰F_n3 de un armazón de proteína multivalente basado en fibronectina se une a una diana deseada con una K_D de menos de 500 nM, 100 nM, 50 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM o menos. En algunas realizaciones, cada dominio ¹⁰F_n3 de un armazón de proteína multivalente basado en fibronectina se une a una diana deseada con una K_D entre 1 pM y 1 μM, entre 100 pM y 500 nM, entre 1 nM y 500 nM, o entre 1 nM y 100 nM. En realizaciones ilustrativas, cada dominio ¹⁰F_n3 de un armazón de proteínas multivalentes basado en fibronectina se une específicamente a una diana que no está unida por un dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre, particularmente el dominio ¹⁰F_n3 humano de tipo silvestre.

Los dominios ¹⁰F_n3 en una proteína de armazón multivalente basada en fibronectina pueden estar conectados por un enlazador polipeptídico. Los enlazadores polipeptídicos a modo de ejemplo incluyen polipéptidos que tienen de 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, o 1-2 aminoácidos. Los enlazadores adecuados para unir los dominios ¹⁰F_n3 son aquellos que permiten que los dominios separados se plieguen independientemente uno de otro formando una estructura tridimensional que permite la unión de alta afinidad a una molécula diana. Los ejemplos específicos de enlazadores adecuados incluyen enlazadores basados en glicina-serina, enlazadores basados en glicina-prolina, enlazadores basados en prolina-alanina así como enlazadores que tienen la secuencia de aminoácidos PSTPTSPSTPTSPSPS (SEQ ID NO: 152). En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador basado en glicina-serina. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador basado en glicina-serina. Estos enlazadores comprenden restos de glicina y serina y pueden tener entre 8 y 50, 10 y 30, y 10 y 20 aminoácidos de longitud. Los ejemplos incluyen enlazadores que tienen una secuencia de aminoácidos (GS)₇ (SEQ ID NO: 153), G(GS)₆ (SEQ ID NO: 154), y G(GS)₇G (SEQ ID NO: 155). Otros enlazadores contienen ácido glutámico, e incluyen, por ejemplo, (GSE)₅ (SEQ ID NO: 156) y GGSEGGSE (SEQ ID NO: 157). Otros enlazadores de glicina-serina a modo de ejemplo incluyen (GS)₄ (SEQ ID NO: 158), (GGGGGS)₇ (SEQ ID NO: 159), (GGGGGS)₅ (SEQ ID NO: 160), y (GGGGGS)₃G (SEQ ID NO: 161). En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador basado en glicina-prolina. Estos enlazadores comprenden restos de glicina y prolina y pueden tener entre 3 y 30, 10 y 30, y 3 y 20 aminoácidos de longitud. Los ejemplos incluyen enlazadores que tienen una secuencia de aminoácidos (GP)₃G (SEQ ID NO: 162), (GP)₅G (SEQ ID NO: 163), y GPG. En determinadas realizaciones, el enlazador puede ser un enlazador basado en prolina-alanina que tiene entre 3 y 30, 10 y 30, y 3 y 20 aminoácidos de longitud. Ejemplos de enlazadores basados en prolina-alanina incluyen, por ejemplo, (PA)₃ (SEQ ID NO: 164), (PA)₆ (SEQ ID NO: 165) y (PA)₉ (SEQ ID NO: 166). Se contempla, que la longitud óptima del enlazador y la composición de aminoácidos pueden determinarse por experimentación rutinaria mediante métodos bien conocidos en la técnica. En realizaciones ilustrativas, el enlazador no contiene ningún par de Asp-Lys (DK).

En determinadas realizaciones, el enlazador tiene la secuencia de aminoácidos PSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 173), PSPEPPTPEPPSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 174), PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 175), o PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 176). En general, un enlazador puede comprender la secuencia de aminoácidos (PSPEPPTPEP)_n (SEQ ID NO: 262), en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1-5 o 1-10. En determinadas realizaciones, el enlazador tiene la secuencia de aminoácidos EEEEEDE (SEQ ID NO: 177), EEEEEDEEDE (SEQ ID NO: 178), EEEEEDEEEEEDEEEEEDE (SEQ ID NO: 179), EEEEEDEEEEEDEEEEEDEEEEEDE (SEQ ID NO: 180). Generalmente, un enlazador puede comprender la secuencia (EEEEDE)_nE (SEQ ID NO: 263), en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1-5 o 1-10. En determinadas realizaciones, el enlazador tiene la secuencia de aminoácidos RGGEKKKEKEKEEQEERETKTP (SEQ ID NO: 181). Dichos enlazadores se pueden usar para conectar la adnectina de unión a albúmina a otro polipéptido (por ejemplo, otra adnectina). Los usos a modo de ejemplo del enlazador PSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 173) se muestran a continuación.

Adnectina N-terminal conectada al polipéptido en C-terminal:

...NYRTPG**PSPEPPTPEP**-polipéptido (SEQ ID NO: 182)

polipéptido N-terminal conectada a adnectina C-terminal:

polipéptido-**PSPEPPTPEP**GVSDV... (SEQ ID NO: 183)

En algunas realizaciones, la Adnectina multivalente es una Adnectina en tándem que comprende un primer dominio ¹⁰F_n3 que se une a una seroalbúmina (por ejemplo, una Adnectina PKE2), y un segundo dominio ¹⁰F_n3 que se une a una diana específica. Las adnectinas en tándem pueden tener la configuración Adnectina de unión a albúmina-X y X-Adnectina de unión a albúmina, en donde X es un dominio ¹⁰F_n3 específico de diana. El experto en la materia

estaría familiarizado con los métodos para probar la actividad funcional y evaluar las propiedades biofísicas de dichas moléculas de adnectina en tándem.

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende un primer décimo dominio de tipo III de fibronectina (¹⁰F_n3) de la invención y un segundo dominio ¹⁰F_n3. Un "primer" dominio y un segundo "dominio" pueden estar en la orientación de N terminal a C terminal o de C terminal a N terminal.

En algunas realizaciones, por ejemplo, de adnectinas multivalentes, el primer dominio ¹⁰F_n3 comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 23-100, 184-209 y 235-260 o difiere de la misma en a lo sumo 1, 1-2, 1-5, 1-10 o 1-20 aminoácidos, por ejemplo, delecciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas).

En algunas realizaciones, el primer dominio ¹⁰F_n3 comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 24-48, 50-74, 76-100, 185-209 y 236-260.

En una realización preferida, el primer dominio ¹⁰F_n3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29, 55, 81, 190 o 241. En otra realización preferida, el primer dominio ¹⁰F_n3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, 62, 88, 197 o 248.

En algunas realizaciones, la adnectina multivalente comprende un segundo dominio ¹⁰F_n3 que es un dominio ¹⁰F_n3 que se une específicamente a una proteína diana distinta de la seroalbúmina.

En una realización preferida, el segundo dominio ¹⁰F_n3 se une específicamente a PCSK9.

Por consiguiente, en una realización, el segundo dominio ¹⁰F_n3 comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 168 o 261 o difiere de la misma en a lo sumo 1, 1-2, 1-5, 1-10 o 1-20 aminoácidos, por ejemplo, delecciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas).

Los dominios ¹⁰F_n3 adicionales adecuados que se unen a PCSK9 se desvelan en, por ejemplo, el documento WO2011/130354, cuyos contenidos se han incorporado como referencia en el presente documento.

En una realización, el segundo dominio ¹⁰F_n3 tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 168 o 261.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona una Adnectina de unión en tándem a seroalbúmina-PCSK9 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 168 o 261, así como Adnectinas en tándem de seroalbúmina-PCSK9 con secuencias de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a ella o difiere de la misma en a lo sumo 1, 1-2, 1-5, 1-10 o 1-20 aminoácidos, por ejemplo, delecciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas), en donde la Adnectina en tándem retiene la unión a PCSK9 y seroalbúmina.

En una realización, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican una Adnectina de unión en tándem a seroalbúmina-PCSK9 que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 172, así como secuencias de ácido nucleico al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a ella, en donde la adnectina de unión en tándem a seroalbúmina-PCSK9 codificada retiene la unión a PCSK9 y seroalbúmina. En algunas realizaciones, las sustituciones de nucleótidos no alteran la secuencia de aminoácidos traducida resultante (es decir, mutaciones silenciosas).

En un aspecto, las Adnectinas en tándem basadas en la unión a seroalbúmina (por ejemplo, la Adnectina en tándem PCSK9-PKE2) descritas en el presente documento, se unen a seroalbúmina humana con una K_D de menos de 3 μM, 2,5 μM, 2 μM, 1,5 μM, 1 μM, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, 100 pM, 50 pM o 10 pM. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, de 0,1 nM a 100 nM, de 0,1 nM a 1 μM, de 0,5 nM a 50 nM, de 0,5 nM a 100 nM, de 0,5 nM a 1 μM, de 1 nM a 50 nM, de 1 nM a 100 nM o de 1 nM a 1 μM.

En determinadas realizaciones, las Adnectinas en tándem basadas en la unión a seroalbúmina (por ejemplo, la Adnectina en tándem PCSK9-PKE2) descritas en el presente documento también pueden unirse a la seroalbúmina de uno o más de macaco cynomolgus, macaco rhesus, de rata o ratón.

En determinadas realizaciones, las Adnectinas en tándem basadas en la unión a seroalbúmina (por ejemplo, la Adnectina en tándem PCSK9-PKE2) descritas en el presente documento se unen a la seroalbúmina de macaco rhesus (RhSA) o la seroalbúmina de macaco cynomolgus (CySA) con una K_D inferior a 3 μM, 2,5 μM, 2 μM, 1,5 μM, 1 μM, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM o 100 pM. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, de 0,1 nM a 100 nM, de 0,1 nM a 1 μM, de 0,5 nM a 50 nM, de 0,5 nM a 100 nM, de 0,5 nM a 1 μM, de 1 nM a 50 nM, de 1 nM a 100 nM o de 1 nM a 1 μM.

En determinadas realizaciones, las Adnectinas en tándem basadas en la unión a seroalbúmina (por ejemplo, la Adnectina en tándem PCSK9-PKE2) descritas en el presente documento se unen a la seroalbúmina de macaco cynomolgus (RhSA), seroalbúmina de macaco cynomolgus (CySA) y seroalbúmina de ratón (MSA) con una K_D de menos de 3 μ M, 2,5 μ M, 2 μ M, 1,5 μ M, 1 μ M, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM o 100 pM. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, de 0,1 nM a 100 nM, de 0,1 nM a 1 μ M, de 0,5 nM a 50 nM, de 0,5 nM a 100 nM, de 0,5 nM a 1 μ M, de 1 nM a 50 nM, de 1 nM a 100 nM o de 1 nM a 1 μ M.

En determinadas realizaciones, las Adnectinas en tándem basadas en la unión a seroalbúmina (por ejemplo, la Adnectina en tándem PCSK9-PKE2) descritas en el presente documento se unen a la seroalbúmina de macaco cynomolgus (RhSA), seroalbúmina de macaco cynomolgus (CySA), seroalbúmina de ratón (MSA) y seroalbúmina de rata (RSA) con una K_D de menos de 3 μ M, 2,5 μ M, 2 μ M, 1,5 μ M, 1 μ M, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM o 100 pM. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, de 0,1 nM a 100 nM, de 0,1 nM a 1 μ M, de 0,5 nM a 50 nM, de 0,5 nM a 100 nM, de 0,5 nM a 1 μ M, de 1 nM a 50 nM, de 1 nM a 100 nM o de 1 nM a 1 μ M.

En determinadas realizaciones, las adnectinas en tándem basadas en la unión a seroalbúmina (por ejemplo, Adnectina en tándem PCSK9-PKE2) descritas en el presente documento se unen a seroalbúmina en un intervalo de pH de 5,5 a 7,4.

En determinadas realizaciones, las Adnectinas en tándem basadas en la unión a seroalbúmina (por ejemplo, la Adnectina en tándem PCSK9-PKE2) descritas en el presente documento se unen al dominio I-II de la seroalbúmina humana.

En determinadas realizaciones, las adnectinas en tándem basadas en la unión a seroalbúmina (por ejemplo, Adnectina en tándem PCSK9-PKE2) descritas en el presente documento tienen una semivida en suero en presencia de seroalbúmina humana, seroalbúmina de macaco cynomolgus, seroalbúmina de macaco rhesus, seroalbúmina de ratón y/o seroalbúmina de rata de al menos 1 hora, 2 horas, 5 horas, 10 horas, 20 horas, 30 horas, 40 horas, 50 horas, 60 horas, 70 horas, 80 horas, 90 horas, 100 horas, 150 horas, 200 horas o al menos aproximadamente 300 horas. En determinadas realizaciones, las adnectinas en tándem basadas en la unión a seroalbúmina (por ejemplo, Adnectina en tándem PCSK9-PKE2) descritas en el presente documento tienen una semivida en suero en presencia de seroalbúmina humana, seroalbúmina de macaco cynomolgus, seroalbúmina de macaco rhesus, seroalbúmina de ratón y/o seroalbúmina de rata de 1-300 horas, tal como 1-250 horas, 1-200 horas, 1-150 horas, 1-100 horas, 1-90 horas, 1-80 horas, 1-70 horas, 1-60 horas, 1-50 horas, 1-40 horas, 1-30 horas, 1-20 horas, 1-10 horas, 1-5 horas, 5-300 horas, 10-300 horas, 20-300 horas, 30-300 horas, 40-300 horas, 50-300 horas, 60-300 horas, 70-300 horas, 80-300 horas, 90-300 horas, 100-300 horas, 150-300 horas, 200-300 horas, 250-300 horas, 5-250 horas, 10-200 horas, 50-150 horas, u 80-120 horas.

En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la adnectina asociada en la adnectina en tándem basada de seroalbúmina (por ejemplo, adnectina PCSK9 en el caso de una adnectina en tándem PCSK9-PKE2) aumenta en relación a la semivida en suero de la adnectina asociada cuando no está conjugada con la Adnectina de unión a seroalbúmina. En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la adnectina en tándem basada en seroalbúmina es al menos 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500, 1800, 1900, 2000, 2500, o 3000 % más larga en relación con la semivida en suero de la Adnectina asociada cuando no está fusionada a la Adnectina de unión a seroalbúmina. En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la adnectina en tándem basada en seroalbúmina es del 20-3000 %, tal como del 40-3000 %, del 60-3000 %, del 80-3000 %, del 100-3000 %, del 120-3000 %, del 150-3000 %, del 180-3000 %, del 200-3000 %, del 400-3000 %, del 600-3000 %, del 800-3000 %, del 1000-3000 %, del 1200-3000 %, del 1500-3000 %, del 1800-3000 %, del 1900-3000 %, del 2000-3000 %, del 2500-3000 %, del 20-2500 %, del 20-2000 %, del 20-1900 %, del 20-1800 %, del 20-1500 %, del 20-1200 %, del 20-1000 %, del 20-800 %, del 20-600 %, del 20-400 %, del 20-200 %, del 20-180 %, del 20-150 %, del 20-120 %, del 20-100 %, del 20-80 %, del 20-60 %, del 20-40 %, del 50-2500 %, del 100-2000 %, del 150-1500 %, del 200-1000 %, del 400-800 % o 500-700 % más larga con respecto a la semivida en suero de la Adnectina asociada cuando no está fusionada a la Adnectina de unión a seroalbúmina. En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la adnectina en tándem basada en seroalbúmina es al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 10 veces, 12 veces, 13 veces, 15 veces, 17 veces, 20 veces, 22 veces, 25 veces, 27 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces o 50 veces mayor que la semivida en suero de la adnectina asociada cuando no está fusionada a la adnectina de unión a seroalbúmina. En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la adnectina en tándem basada en seroalbúmina es de 1,5-50 veces, tal como de 1,5-40 veces, de 1,5-35 veces, de 1,5-30 veces, de 1,5-27 veces, de 1,5-25 veces, de 1,5-22 veces, de 1,5-20 veces, de 1,5-17 veces, de 1,5-15 veces, de 1,5-13 veces, de 1,5-12 veces, de 1,5-10 veces, de 1,5-9 veces, de 1,5-8 veces, de 1,5-7 veces, de 1,5-6 veces, de 1,5-5 veces, de 1,5-4,5 veces, de 1,5-4 veces, de 1,5-3,5 veces, de 1,5-3 veces, de 1,5-2,5 veces, de 1,5-2 veces, de 2-50 veces, de 2,5-50 veces, de 3-50 veces, de 3,5-50 veces, de 4-50 veces, de 4,5-50 veces, de 5-50 veces, de 6-50 veces, de 7-50 veces, de 8-50 veces, de 10-50 veces, de 12-50 veces, de 13-50 veces, de 15-50 veces, de 17-50 veces, de 20-50 veces, de 22-50 veces, de 25-50 veces, de 27-50 veces, de 30-50 veces, de 40-50 veces, de 2-40 veces, de 5-35 veces, de 10-20 veces o de 10-15 veces mayor que la semivida en suero de la adnectina asociada cuando no está

fusionada a la adnectina de unión a seroalbúmina. En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la adnectina en tándem basada en seroalbúmina es de al menos 2 horas, 2,5 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 15 horas, 20 horas, 25 horas, 30 horas, 35 horas, 40 horas, 50 horas, 60 horas, 70 horas, 80 horas, 90 horas, 100 horas, 110 horas, 120 horas, 130 horas, 135 horas, 140 horas, 150 horas, 160 horas, o 200 horas. En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la adnectina en tándem basada en seroalbúmina es de 2-200 horas, 2,5-200 horas, 3-200 horas, 4-200 horas, 5-200 horas, 6-200 horas, 7-200 horas, 8-200 horas, 9-200 horas, 10-200 horas, 15-200 horas, 20-200 horas, 25-200 horas, 30-200 horas, 35-200 horas, 40-200 horas, 50-200 horas, 60-200 horas, 70-200 horas, 80-200 horas, 90-200 horas, 100-200 horas, 125-200 horas, 150-200 horas, 175-200 horas, 190-200 horas, 2-190 horas, 2-175 horas, 2-150 horas, 2-125 horas, 2-100 horas, 2-90 horas, 2-80 horas, 2-70 horas, 2-60 horas, 2-50 horas, 2-40 horas, 2-35 horas, 2-30 horas, 2-25 horas, 2-20 horas, 2-15 horas, 2-10 horas, 2-9 horas, 2-8 horas, 2-7 horas, 2-6 horas, 2-5 horas, 2-4 horas, 2-3 horas, 5-175 horas, 10-150 horas, 15-125 horas, 20-100 horas, 25-75 horas, o 30-60 horas.

E. Conjugados de adnectinas de unión a seroalbúmina

Determinados aspectos de la presente invención proporcionan conjugados que comprenden una adnectina de unión a seroalbúmina y al menos una fracción adicional (por ejemplo, una fracción terapéutica). La fracción adicional puede ser útil para cualquier diagnóstico, imagen o fin terapéutico.

En algunas realizaciones, la adnectina de unión a seroalbúmina se fusiona a una segunda fracción que es una pequeña molécula orgánica, un ácido nucleico, un péptido o una proteína. En algunas realizaciones, la adnectina de unión a seroalbúmina se fusiona con una fracción terapéutica que se dirige a receptores, ligandos de receptores, proteínas de la cubierta viral, proteínas del sistema inmunitario, hormonas, enzimas, antígenos o proteínas de señalización celular. La fusión puede formarse mediante la unión de la segunda fracción a cualquiera de los extremos de la adnectina de unión a seroalbúmina, es decir, las disposiciones adnectina de unión a seroalbúmina-molécula terapéutica o molécula en suero-adnectina de unión a seroalbúmina.

En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la fracción fusionada con la Adnectina de unión a seroalbúmina aumenta en relación con la semivida en suero de la fracción cuando no está conjugada con la adnectina de unión a seroalbúmina. En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la fusión de Adnectina de unión a seroalbúmina es al menos 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500, 1800, 1900, 2000, 2500, o 3000 % más larga en relación con la semivida en suero de la fracción cuando no está fusionada a la Adnectina de unión a seroalbúmina. En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la adnectina de unión a seroalbúmina es del 20-3000 %, tal como del 40-3000 %, del 60-3000 %, del 80-3000 %, del 100-3000 %, del 120-3000 %, del 150-3000 %, del 180-3000 %, del 200-3000 %, del 400-3000 %, del 600-3000 %, del 800-3000 %, del 1000-3000 %, del 1200-3000 %, del 1500-3000 %, del 1800-3000 %, del 1900-3000 %, del 2000-3000 %, del 2500-3000 %, del 20-2500 %, del 20-2000 %, del 20-1900 %, del 20-1800 %, del 20-1500 %, del 20-1200 %, del 20-1000 %, del 20-800 %, del 20-600 %, del 20-400 %, del 20-200 %, del 20-180 %, del 20-150 %, del 20-120 %, del 20-100 %, del 20-80 %, del 20-60 %, del 20-40 %, del 50-2500 %, del 100-2000 %, del 150-1500 %, del 200-1000 %, del 400-800 % o 500-700 % más larga con respecto a la semivida en suero de la fracción cuando no está fusionada a la Adnectina de unión a seroalbúmina. En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la fusión de adnectina PKE2 es al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6fold, 7 veces, 8 veces, 10 veces, 12 veces, 13 veces, 15 veces, 17 veces, 20 veces, 22 veces, 25 veces, 27 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces o 50 veces mayor que la semivida en suero de la fracción cuando no está fusionada a la adnectina de unión a seroalbúmina. En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la fusión de adnectina PKE2 es de 1,5-50 veces, tal como de 1,5-40 veces, de 1,5-35 veces, de 1,5-30 veces, de 1,5-27 veces, de 1,5-25 veces, de 1,5-22 veces, de 1,5-20 veces, de 1,5-17 veces, de 1,5-15 veces, de 1,5-13 veces, de 1,5-12 veces, de 1,5-10 veces, de 1,5-9 veces, de 1,5-8 veces, de 1,5-7 veces, de 1,5-6 veces, de 1,5-5 veces, de 1,5-4,5 veces, de 1,5-4 veces, de 1,5-3,5 veces, de 1,5-3 veces, de 1,5-2,5 veces, de 1,5-2 veces, de 2-50 veces, de 2,5-50 veces, de 3-50 veces, de 3,5-50 veces, de 4-50 veces, de 4,5-50 veces, de 5-50 veces, de 6-50 veces, de 7-50 veces, de 8-50 veces, de 10-50 veces, de 12-50 veces, de 13-50 veces, de 15-50 veces, de 17-50 veces, de 20-50 veces, de 22-50 veces, de 25-50 veces, de 27-50 veces, de 30-50 veces, de 40-50 veces, de 2-40 veces, de 5-35 veces, de 10-20 veces o de 10-15 veces mayor que la semivida en suero de la fracción cuando no está fusionada a la adnectina de unión a seroalbúmina. En algunas realizaciones, la semivida en suero de la adnectina de unión a seroalbúmina es al menos 2 veces, 2,5 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 15 horas, 20 horas, 25 horas, 30 horas, 35 horas, 40 horas, 50 horas, 60 horas, 70 horas, 80 horas, 90 horas, 100 horas, 110 horas, 120 horas, 130 horas, 135 horas, 140 horas, 150 horas, 160 horas, o 200 horas. En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la adnectina de unión a seroalbúmina es de 2-200 horas, 2,5-200 horas, 3-200 horas, 4-200 horas, 5-200 horas, 6-200 horas, 7-200 horas, 8-200 horas, 9-200 horas, 10-200 horas, 15-200 horas, 20-200 horas, 25-200 horas, 30-200 horas, 35-200 horas, 40-200 horas, 50-200 horas, 60-200 horas, 70-200 horas, 80-200 horas, 90-200 horas, 100-200 horas, 125-200 horas, 150-200 horas, 175-200 horas, 190-200 horas, 2-190 horas, 2-175 horas, 2-150 horas, 2-125 horas, 2-100 horas, 2-90 horas, 2-80 horas, 2-70 horas, 2-60 horas, 2-50 horas, 2-40 horas, 2-35 horas, 2-30 horas, 2-25 horas, 2-20 horas, 2-15 horas, 2-10 horas, 2-9 horas, 2-8 horas, 2-7 horas, 2-6 horas, 2-5 horas, 2-4 horas, 2-3 horas, 5-175 horas, 10-150 horas, 15-125 horas, 20-100 horas, 25-75 horas, o 30-60 horas.

En determinadas realizaciones, las proteínas de fusión de adnectina de unión a seroalbúmina se unen a HSA con una K_D de menos de 3 μ M, 2,5 μ M, 2 μ M, 1,5 μ M, 1 μ M, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, 100 pM, 50 pM o 10 pM. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, de 0,1 nM a 100 nM, de 0,1 nM a 1 μ M, de 0,5 nM a 50 nM, de 0,5 nM a 100 nM, de 0,5 nM a 1 μ M, de 1 nM a 50 nM, de 1 nM a 100 nM o de 1 nM a 1 μ M.

En algunas realizaciones, una fracción terapéutica puede unirse directa o indirectamente a una adnectina de unión a seroalbúmina a través de un enlazador polimérico, como se describe en el presente documento. Se pueden usar enlazadores poliméricos para variar de manera óptima la distancia entre cada componente de la fusión para crear una fusión de proteínas con una o más de las siguientes características: 1) impedimento estérico reducido o aumentado de unión de uno o más dominios de proteínas cuando se unen a una proteína de interés, 2) mayor estabilidad o solubilidad de la proteína, 3) disminución de la agregación de la proteína y 4) mayor avidez o afinidad global de la proteína.

En algunas realizaciones, las fusiones descritas en el presente documento están vinculadas a la adnectina de unión a seroalbúmina a través de un enlazador polipeptídico que tiene un sitio de proteasa que es escindible mediante una proteasa en la sangre o el tejido diana. Dichas realizaciones pueden usarse para liberar una proteína terapéutica para una mejor administración o propiedades terapéuticas o una producción más eficaz.

Se pueden introducir enlazadores o espaciadores adicionales en el extremo C de un dominio ^{10} F_n3 entre el dominio ^{10} F_n3 y el enlazador polipeptídico.

En algunas realizaciones, una fracción terapéutica está unida a una adnectina de unión a seroalbúmina a través de un polímero biocompatible tal como un azúcar polimérico. El azúcar polimérico puede incluir un sitio de escisión enzimática que es escindible mediante una enzima en la sangre o en el tejido diana. Dichas realizaciones pueden usarse para liberar proteínas terapéuticas para una mejor administración o propiedades terapéuticas o una producción más eficaz.

Las moléculas de fusión de adnectina de unión a seroalbúmina descritas en el presente documento son útiles para aumentar la semivida de una fracción terapéutica mediante la creación de una fusión entre la fracción terapéutica y la adnectina de unión a seroalbúmina. Dichas moléculas de fusión pueden usarse para tratar afecciones que responden a la actividad biológica de la fracción terapéutica contenida en la fusión. La presente invención contempla el uso de las moléculas de fusión del F_n3 de unión a seroalbúmina en enfermedades causadas por la desregulación de cualquiera de las siguientes proteínas o moléculas.

En realizaciones ilustrativas, la fracción terapéutica que está unida (ya sea C-terminal o N-terminal) a la adnectina de unión a seroalbúmina es VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3, Her-1, Her-2, Her-3, EGF-I, EGF-2, EGF-3, Alpha3, cMet, ICOS, CD40L, LFA-I, c-Met, ICOS, LFA-I, IL-6, B7.1, W1.2, OX40, IL-1 b, TACI, IgE, BAFF o BLyS, TPO-R, CD19, CD20, CD22, CD33, CD28, IL-1-R1, TNF-alfa, TRAIL-R1, Receptor 1 del complemento, FGFa, Osteopontina, Vitronectina, Efrina A1-A5, Efrina B1-B3, alfa-2-macroglobulina, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CXCL16, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, PDGF, TGFb, GMCSF, SCF, p40 (IL12/IL23), IL1b, IL1a, IL1ra, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12, IL15, IL23, Fas, FasL, ligando Flt3, 41BB, ACE, ACE-2, KGF, FGF-7, SCF, Netrina 1, 2, IFNa,b,g, Caspasa-2,3,7,8,10, ADAM S1,S5,8,9,15,TS1,TS5; Adiponectina, ALCAM, ALK-I, APRIL, Anexina V, angiogenina, amfiroregulina, Angiopoietina-1,2,4, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1, B7-H2, B7-H3, Bcl-2, BACE-I, BAK, BCAM, BDNF, bNGF, bECGF, BMP2,3,4,5,6,7,8; CRP, Cadherina 6, 8, 11; Catepsina A,B,C,D,E,L,S,V,X; CD1 1a/IFA-1, LFA-3, GP2b3a, receptor de GH, proteína RSV F, IL-23 (p40, p19), IL-12, CD80, CD86, CD28, CTLA-4, alfa4-beta1, alfa4-beta7, TNF/limfotoxina, IgE, CD3, CD20, IL-6, IL-6R, BLYS/BAFF, IL-2R, HER2, EGFR, CD33, CD52, digoxina, Rho (D), varicela, Hepatitis, CMV, Tétanos, Vaccinia, Antisuero, Botulinum, Trail-RI, Trail-R2, cMet, familia de TNF-R, tal como LA NGF-R, CD27, CD30, CD40, CD95, Receptor de limfotoxina a/b, Wsl-I, TL1A/TNFSF15, BAFF, BAFF-R/TNFRSF13C, TRAIL R2/TNFRSF10B, TRAIL R2/TNFRSF10B, Fas/TNFRSF6 CD27/TNFRSF7, DR3/TNFRSF25, HVEM/TNFRSF14, TROY/TNFRSF19, ligando CD40/TNFSF5, BCMA/TNFRSF17, CD30/TNFRSF8, LIGHT/TNFSF14, 4-1BB/TNFRSF9, CD40/TNFRSF5, GITR/[Gamma]TNFRSF 18, Osteoprotegerina/TNFRSF1 IB, RANK/TNFRSF1 IA, TRAIL R3/TNFRSF10C, TRAIL/TNFSF10, TRANCE/RANK L/TNFSF11, ligando 4-1BB/TNFSF9, TWEAK/TNFSF12, ligando CD40/TNFSF5, ligando de Fas/TNFSF6, RELT/TNFRSF19L, APRIL/TNFSF13, DcR3/TNFRSF6B, TNF RI/TNFRSFIA, TRAIL R1/TNFRSF10A, TRAIL R4/TNFRSF10D, ligando CD30/TNFSF8, ligando GITR/TNFSF18, TNFSF18, TACI/TNFRSF13B, NGF R/TNFRSF16, ligando OX40/TNFSF4, TRAIL R2/TNFRSF10B, TRAIL R3/TNFRSF10C, TWEAK R/TNFRSF12, BAFF/BLyS/TNFSF13, DR6/TNFRSF21, TNF-alfa/TNFSF1 A, Pro-TNF-alfa/TNFSFIA, Limfotoxina beta R/TNFRSF3, Limfotoxina beta R (LTbR)/Fc Quimera, TNF RI/TNFRSFIA, TNF-beta/TNFSF1B, PGRP-S, TNF RI/TNFRSFIA, TNF RII/TNFRSFIB, EDA-A2, TNF-alfa/TNFSFIA, EDAR, XEDAR, TNF RI/TNFRSFIA.

En realizaciones ilustrativas, la fracción terapéutica que está unida (ya sea C-terminal o N-terminal) a la Adnectina de unión a seroalbúmina es cualquiera de las siguientes proteínas o proteínas que se unen a la misma: 4EBP1, 14-3-3 zeta, 53BP1, 2B4/SLAMF4, CCL21/6CKine, 4-1BB/TNFRSF9, 8D6A, Ligando 4-1BB/TNFSF9, 8-oxo-dG, 4-Amino-1,8-naftalimida, A2B5, Aminopeptidasa LRAP/ERAP2, A33, Aminopeptidasa N/ANPEP, Aag, Aminopeptidasa

P2/XPNPEP2, ABCG2, Aminopeptidasa P1/XPNPEP1, ACE, Aminopeptidasa PILS/ARTS1, ACE-2, Amnionless, Actina, amfiregulina, beta-actina, AMPK alfa 1/2, Activina AB, AMPK alfa 1, Activina AB, AMPK alfa 2, Activina B, AMPK beta 1, Activina C, AMPK beta 2, Activina RIA/ALK-2, Andr geno R/NR3C4, Activina RIB/ALK-4, angiogenina, Activina RIIA, Angiopoyetina-1, Activina RIIIB, Angiopoyetina-2, ADAMS, Angiopoyetina-3, ADAM9, Angiopoyetina-4, 5 ADAM10, angiopoyetina-tipo 1, ADAM12, angiopoyetina-tipo 2, ADAM15, angiopoyetina-tipo 3, TACE/ADAM17, angiopoyetina-tipo 4, ADAM19, Angiopoyetina-tipo 7/CDT6, ADAM33, Angiostatina, ADAMTS4, Anexina A1/Anexina I, ADAMTS5, Anexina A7, ADAMTS1, Anexina A10, ADAMTSL-1/Punctina, Anexina V, Adiponectina/Acrp30, ANP, AEBSF, Sitio de AP, Aggrecan, APAF-I, Agrin, APC, AgRP, APE, AGTR-2, APJ, AIF, APLP-I, Akt, APLP-2, Akt1, Apolipoproteína AI, Akt2, Apolipoproteína B, Akt3, APP, Seroalbúmina, APRIL/TNFSF13, ALCAM, ARC, ALK-I, 10 Artemin, ALK-7, Arilsulfatasa AJARSA, Fosfatasa alcalina, ASAH2/N-acilesfingosina Amidohidrolasa-2, alfa 2u-Globulina, ASC, alfa-1-glucoprote na  cida, ASGR1, alfa-fetoprote na, ASK1, ALS, ATM, ATRIP Ameloblastico, AMICA/JAML, Aurora A, AMIGO, Aurora B, AMIG02, Axin-1, AMIG03, Axl, Aminoacilasa/ACY1, Azurocidina/CAP37/HBP, Aminopeptidasa A/ENPEP, B4GALT1, BIM, B7-1/CD80, 6-Biotina-17-NAD, B7-2/CD86, BLAME/SLAMF8, B7-H1/PD-L1, CXCL13/BLC/BCA-1, B7-H2, BLIMP1, B7-H3, BIK, B7-H4, BMI-I, BACE-I, BACE-2, BMP-1/PCP, BACE-2, BMP-2, Bad, BMP-3, BAFF/TNFSF13B, BMP-3b/GDF-10, BAFF R/TNFRSF 13C, BMP-4, Bag-1, 15 BMP-5, BAK, BMP-6, BAMBI/NMA, BMP-7, BARD 1, BMP-8, Bax, BMP-9, BCAM, BMP-10, Bcl-10, BMP-15/GDF-9B, Bcl-2, BMPR-IA/ALK-3, Proteína A1 relacionada con Bcl-2, BMPR-IB/ALK-6, Bcl-w, BMPR-II, Bcl-x, BNIP3L, Bcl-xL, BOC, BCMA/TNFRSF17, BOK, BDNF, BPDE, Benzamida, Brachyury, Cadena beta común, B-Raf, beta IG-H3, CXCL14/BRAX, Betacelulina, BRCA1, beta-Defensina 2, BRCA2, BID, BTLA, Biglicano, Bub-1, Proteína Asesina tipo 20 Bik, c-jun, CD90/Thyl, c-Rel, CD94, CCL6/C10, CD97, Clq R1/CD93, CD151, ClqTNF1, CD160, ClqTNF4, CD163, ClqTNF5, CD164, componente C1r del complemento, CD200, componente C1s del complemento, CD200, R1, componente C2 del complemento, CD229/SLAMF3, componente C3a del complemento, CD23/Fc  psilon R11, componente C3d del complemento, CD2F-10/SLAMF9, componente C5a del complemento, CD5L, Cadherina-4/R-Cadherina, CD69, Cadherina-6, CDC2, Cadherina-8, CDC25A, Cadherina-11, CDC25B, Cadherina-12, CDCP1, 25 Cadherina-13, CDO, Cadherina-17, CDX4, E-Cadherina, CEACAM-1/CD66a, N-Cadherina, CEACAM-6, P-Cadherina, Cerberus 1, VE-Cadherina, CFTR, Calbindina D, cGMP, Calcineurina A, Chem R23, Calcineurina B, Chemerina, Calreticulina-2, Paquetes de muestra de quimiocinas, CaM cinasa II, Quitinasa 3-tipo 1, cAMP, Quitotriosidasa/CHIT1, Cannabinoide R1, Chk1, Cannabinoide R2/CB2/CNR2, Chk2, CAR/NR113, CHL-1/I1CAM-2, Anhidrasa carbònica I, Colina acetiltransferasa/CbAT, Anhidrasa carbònica II, Condrolactina, Anhidrasa carbònica III, 30 Cordina, Anhidrasa carbònica IV, Cordina-tipo 1, Anhidrasa carbònica VA, Cordina-tipo 2, Anhidrasa carbònica VB, CINC-I, Anhidrasa carbònica VI, CINC-2, Anhidrasa carbònica VII, CINC-3, Anhidrasa carbònica VIII, Claspin, Anhidrasa carbònica IX, Claudina-6, Anhidrasa carbònica X, CLC, Anhidrasa carbònica XII, CLEC-I, Anhidrasa carbònica XIII, CLEC-2, Anhidrasa carbònica XIV, CLECSF 13/CLEC4F, Carboximetil lisina, CLECSF8, Carboxipeptidasa A1/CPA1, CLF-I, Carboxipeptidasa A2, CL-P1/COLEC12, Carboxipeptidasa A4, Clusterina, 35 Carboxipeptidasa B1, Clusterina-tipo 1, Carboxipeptidasa E/CPE, CMG-2, Carboxipeptidasa X1, CMV UL146, Cardiotrofina-1, CMV UL147, Carnosina Dipeptidasa 1, CNP, Caronte, CNTF, CART, CNTF R alfa, Caspasa, Factor de coagulación II/Trombina, Caspasa-1, Factor de coagulación III/Factor tisular, Caspasa-2, Factor de coagulación VII, Caspasa-3, Factor de coagulación X, Caspasa-4, Factor de coagulación XI, Caspasa-6, Factor de coagulación XIV/Proteína C, Caspasa-7, COCO, Caspasa-8, Cohesina, Caspasa-9, Colágeno I, Caspasa-10, Colágeno II, 40 Caspasa-12, Colágeno IV, Caspasa-13, Cadena gamma común/gamma IL-2 R, Inhibidores de péptidos caspasa, COMP/Trombospondina-5, Catalasa, Componente C1rLP del complemento, beta-catenina, Componente C1qA del complemento, Cathepsina 1, Componente C1qC del complemento, Cathepsina 3, Factor D del complemento, Cathepsina 6, Factor I del complemento, Cathepsina A, Complemento MASP3, Cathepsina B, Conexina 43, Cathepsina C/DPPII, Contactina-1, Cathepsina D, Contactina-2/TAG1, Cathepsina E, Contactina-4, Cathepsina F, Contactina-5, Cathepsina H, 45 Corina, Cathepsina L, Cornulina, Cathepsina O, CORS26/ClqTNF,3, Cathepsina S, Células madre corticales de rata, Cathepsina V, Cortisol, Cathepsina XITJ?, COUP-TF I/NR2F1, CBP, COUP-TF II/NR2F2, CCI, COX-I, CCK-A R, COX-2, CCL28, CRACC/SLAMF7, CCR1, Prote na C reactiva, CCR2, Creatina cinasa, Muscle/CKMM, CCR3, Creatinina, CCR4, CREB, CCR5, CREG, CCR6, CRELD1, CCR7, CRELD2, CCR8, CRHBP, CCR9, CRHR-I, CCR10, CRIM1, CD155/PVR, Cripto, CD2, CRISP-2, CD3, CRISP-3, CD4, Crossveinless-2, CD4+/45RA-, CRTAM, CD4+/45RO, 50 CRTH-2, CD4+/CD62L-/CD44, CRY1, CD4+/CD62L+/CD44, Cryptic, CD5, CSB/ERCC6, CD6, CCL27/CTACK, CD8, CT-GF/CCN2, CD8+/45RA-, CTLA-4, CD8+/45RO-, Cubilina, CD9, CX3CR1, CD14, CXADR, CD27/TNFRSF7, CXCL16, ligando CD27/TNFSF7, CXCR3, CD28, CXCR4, CD30/TNFRSF8, CXCR5, ligando CD30/TNFSF8, CXCR6, CD31/PECAM-1, Ciclofilina A, CD34, Cyr61/CCN1, CD36/SR-B3, Cistatina A, CD38, Cistatina B, CD40/TNFRSF5, Cistatina C, ligando CD40/TNFSF5, Cistatina D, CD43, Cistatina E/M, CD44, Cistatina F, CD45, 55 Cistatina H, CD46, Cistatina H2, CD47, Cistatina S, CD48/SLAMF2, Cistatina SA, CD55/DAF, Cistatina SN, CD58/IFA-3, Citocromo c, CD59, Apocitocromo c, CD68, Holocitocromo c, CD72, Citoqueratina 8, CD74, Citoqueratina 14, CD83, Citoqueratina 19, CD84/SLAMF5, Citonina, D6, DISP1, DAN, Dkk-1, DANCE, Dkk-2, DARPP-32, Dkk-3, DAX1/NR0B1, Dkk-4, DCC, DLEC, DCIR/CLEC4A, DLL1, DCAR, DLL4, DcR3/TNFRSF6B, d-Luciferina, DC-SIGN, ADN ligasa IV, DC-SIGNR/CD299, ADN polimerasa beta, DcTRAIL R1/TNFRSF23, DNAM-I, DcTRAIL R2/TNFRSF22, DNA-PKcs, DDR1, DNER, DDR2, Dopa descarboxilasa/DDC, DEC-205, DPCR-I, 60 Decapentapl jica, DPP6, Decorina, DPP A4, Dectina-1/CLEC7A, DPPA5/ESG1, Dectina-2/CLEC6A, DPPII/QPP/DPP7, DEP-1/CD148, DPPIV/CD26, Desert Hedgehog, DR3/TNFRSF25, Desmina, DR6/TNFRSF21, Desmogle na-1, DSCAM, Desmogle na-2, DSCAM-L1, Desmogle na-3, DSPG3, Dishevelled-1, Dtk, Dishevelled-3, Diamina, EAR2/NR2F6, EphA5, ECE-I, EphA6, ECE-2, EphA7, ECF-L/CHI3L3, EphA8, ECM-I, EphB1, Ecotina, EphB2, EDA, EphB3, EDA-A2, EphB4, EDAR, EphB6, EDG-I, Efrina, EDG-5, Efrina-A1, EDG-8, Efrina-A2, eEF-2, 65 Efrina-A3, EGF, Efrina-A4, EGF R, Efrina-A5, EGR1, Efrina-B, EG-VEGF/PK1, Efrina-B1, eIF2 alfa, Efrina-B2, eIF4E,

Efrina-B3, Elk-1, Epigen, EMAP-II, Epimorfina/Sintaxina 2, EMMPRIN/CD147, Epiregulina, CXCL5/ENA, EPR-1/receptor Xa, Endocan, ErbB2, Endogлина/CD105, ErbB3, Endoglucano, ErbB4, Endonucleasa III, ERCC1, Endonucleasa IV, ERCC3, Endonucleasa V, ERK1/ERK2, Endonucleasa VIII, ERK1, Endorepentina/Perlecan, ERK2, Endostatina, ERK3, Endotelina-1, ERK5/BMK1, Engrailed-2, ERR alfa/NR3B1, EN-RAGE, ERR beta/NR3B2, Enteropetidasa/Enterocinasa, ERR gamma/NR3B3, CCL1 1/Eotaxina, Eritropoyetina, CCL24/Eotaxina-2, Eritropoyetina R, CCL26/Eotaxina-3, ESAM, EpCAM/TROP-1, ER alfa/NR3A1, EPCR, ER beta/NR3A2, Eph, Exonucleasa III, EphA1, Exostosa-tipo 2/EXTL2, EphA2, Exostosa-tipo 3/EXTL3, EphA3, FABP1, FGF-BP, FABP2, FGF R1-4, FABP3, FGF R1, FABP4, FGF R2, FABP5, FGF R3, FABP7, FGF R4, FABP9, FGF R5, Factor B del complemento, Fgr, FADD, FHR5, FAM3A, Fibronectina, FAM3B, Ficolina-2, FAM3C, Ficolina-3, FAM3D, FITC, Proteína de activación de fibroblastos alfa/FAP, FKBP38, Fas/TNFRSF6, Flap, ligando de Fas/TNFRSF6, FLIP, FATP1, FLRG, FATP4, FLRT1, FATP5, FLRT2, Fc gamma R1/CD64, FLRT3, Fc gamma RIIB/CD32b, Flt-3, Fc gamma RIIC/CD32c, Ligando Flt-3, Fc gamma RIIA/CD32a, Follistatina, Fc gamma RIIB/CD16, Follistatina-tipo 1, FcRH1/IRTA5, FosB/GOS3, FcRH2/IRTA4, FoxD3, FcRH4/IRTA1, FoxJ1, FcRH5/IRTA2, FoxP3, Receptor Fc -tipo 3/CD16-2, Fpg, FEN-I, FPR1, Fetuina A, FPRL1, Fetuina B, FPRL2, FGF ácido, CX3CL1/Fractalcina, FGF básico, Frizzled-1, FGF-3, Frizzled-2, FGF-4, Frizzled-3, FGF-5, Frizzled-4, FGF-6, Frizzled-5, FGF-8, Frizzled-6, FGF-9, Frizzled-7, FGF-IO, Frizzled-8, FGF-11, Frizzled-9, FGF-12, Frk, FGF-13, sFRP-1, FGF-16, sFRP-2, FGF-17, sFRP-3, FGF-19, sFRP-4, FGF-20, Furina, FGF-21, FXR/NR1H4, FGF-22, Fyn, FGF-23, G9a/EHMT2, GFR alfa-3/GDNF R alfa-3, GABA-A-R alfa 1, GFR alfa-4/GDNF R alfa-4, GABA-A-R alfa 2, GTR/TNFRSF18, GABA-A-R alfa 4, ligando GTR/TNFRSF18, GABA-A-R alfa 5, GLI-I, GABA-A-R alfa 6, GLI-2, GABA-A-R beta 1, GLP/EHMT1, GABA-A-R beta 2, GLP-I R, GABA-A-R beta 3, Glucagón, GABA-A-R gamma 2, Glucosamina (N-acetil)-6-Sulfatasa/GNS, GABA-B-R2, GluR1, GAD1/GAD67, el documento GluR2/3, GAD2/GAD65, GluR2, GADD45 alfa, GluR3, GADD45 beta, Glut1, GADD45 gamma, Glut2, Galectina-1, Glut3, Galectina-2, Glut4, Galectina-3, Glut5, Galectina-3 BP, Glutaredoxina 1, Galectina-4, Glicina R, Galectina-7, Glicoforina A, Galectina-8, Glipicano 2, Galectina-9, Glipicano 3, GalNAc4S-6ST, Glipicano 5, GAP-43, Glipicano 6, GAPDH, GM-CSF, Gas1, GM-CSF R alfa, Gas6, GMF-beta, GASP-1/WFIKKRNP, gpl30, GASP-2/WFIKKRNP, Glucógeno fosforilasa BB/GPBB, GATA-I, GPR15, GATA-2, GPR39, GATA-3, GPVI, GATA-4, GR/NR3C1, GATA-5, Gr-1/ly-6G, GATA-6, Granulicina, GBL, Granzima A, GCNF/NR6A1, Granzima B, CXCL6/GCP-2, Granzima D, G-CSF, Granzima G, G-CSF R, Granzima H, GDF-I, GRASP, GDF-3, GRB2, GDF-5, Gremlin, GDF-6, GRO, GDF-7, CXCL1/GRO alfa, GDF-8, CXCL2/GRO beta, GDF-9, CXCL3/GRO gamma, GDF-11, Hormona de crecimiento, GDF-15, Hormona de crecimiento R, GDNF, GRP75/HSPA9B, GFAP, GSK-3 alfa/beta, GFI-I, GSK-3 alfa, GFR alfa-1/GDNF R alfa-1, GSK-3 beta, GFR alfa-2/GDNF R alfa-2, EZFIT, H2AX, Histidina, H60, HM74A, HAI-I, HMGA2, HAI-2, HMGB1, HAI-2A, TCF-2/HNF-1 beta, HAI-2B, HNF-3 beta/FoxA2, HAND1, HNF-4 alfa/NR2A1, HAPLN1, HNF-4 gamma/NR2A2, Proteasa tipo tripsina de las vías respiratorias/HAT, HO-1/HMOX1/HSP32, HB-EGF, HO-2/HMOX2, CCL 14a/HCC-1, HPRG, CCL14b/HCC-3, Hrk, CCL16/HCC-4, HRP-I, alfa HCG, HS6ST2, Hck, HSD-I, HCR/CRAM-A/B, HSD-2, HDGF, HSP 10/EPF, Hemoglobina, HSP27, Hepasocina, HSP60, HES-1, HSP70, HES-4, HSP90, HGF, HTRA/Proteasa Do, Activador HGF, HTRA1/PRSS11, HGF R, HTRA2/0 ml, HIF-I alfa, HVEM/TNFRSF14, HIF-2 alfa, Hialuronano, HIN-1/Secretoglobulina 3A1, 4-Hidroxinonenal, Hip, CCL1/I-309/TCA-3, IL-IO, cIAP (pan), IL-IO R alfa, cIAP-1/HIAP-2, IL-10 R beta, cIAP-2/HIAP-1, IL-11, IBSP/Sialoproteína II, EL-11 R alfa, ICAM-1/CD54, IL-12, ICAM-2/CD102, IL-12/IL-23 p40, ICAM-3/CD50, IL-12 R beta 1, ICAM-5, IL-12 R beta 2, ICAT, IL-13, ICOS, IL-13 R alfa 1, Iduronato 2-Sulfatasa/EOS, IL-13 R alfa 2, EFN, IL-15, IFN-alfa, IL-15 R alfa, IFN-alfa 1, IL-16, IFN-alfa 2, IL-17, IFN-alfa 4b, IL-17 R, IFN-alfa A, IL-17 RC, IFN-alfa B2, IL-17 RD, IFN-alfa C, IL-17B, IFN-alfa D, IL-17B R, IFN-alfa F, IL-17C, IFN-alfa G, IL-17D, IFN-alfa H2, IL-17E, IFN-alfa I, IL-17F, IFN-alfa J1, IL-18/IL-1F4, IFN-alfa K, IL-18 BP, IFN-alfa WA, IL-18 BPc, IFN-alfa/beta R1, IL-18 BPd, IFN-alfa/beta R2, IL-18 R alfa/IL-1 R5, IFN-beta, IL-18 R beta/IL-1 R7, IFN-gamma, IL-19, IFN-gamma R1, IL-20, IFN-gamma R2, IL-20 R alfa, IFN-omega, IL-20 R beta, IgE, IL-21, IGFBP-I, IL-21 R, IGFBP-2, IL-22, IGFBP-3, IL-22 R, IGFBP-4, IL-22BP, IGFBP-5, IL-23, IGFBP-6, IL-23 R, IGFBP-L1, IL-24, IGFBP-rp1/IGFBP-7, IL-26/AK155, IGFBP-rPIO, IL-27, IGF-I, EL-28A, IGF-I R, IL-28B, IGF-II, IL-29/EFN-lambda 1, IGF-II R, IL-31, IgG, EL-31 RA, IgM, IL-32 alfa, IGSF2, IL-33, IGSF4A/SynCAM, ILT2/CD85J, IGSF4B, ILT3/CD85k, IGSF8, ILT4/CD85d, IgY, ILT5/CD85a, Ikb-beta, ILT6/CD85e, IKK alfa, Indian Hedgehog, IKK epsilon, INSRR, EKK gamma, Insulina, IL-1 alfa/IL-1F1, Insulina R/CD220, IL-1 beta/IL-1F2, Proinsulina, IL-1ra/IL-1F3, Insulinina/EDE, IL-1F5/FIL1 delta, Integrina alfa 2/CD49b, IL-1F6/FIL1 epsilon, Integrina alfa 3/CD49c, IL-1F7/FIL1 zeta, Integrina alfa 3 beta 1/VLA-3, IL-1F8/FIL1 eta, Integrina alfa 4/CD49d, IL-1F9/IL-1 H1, Integrina alfa 5/CD49e, IL-1F10/IL-1HY2, Integrina alfa 5 beta 1, IL-I RI, Integrina alfa 6/CD49f, IL-I RII, Integrina alfa 7, IL-I R3/IL-1 R AcP, Integrina alfa 9, IL-I R4/ST2, Integrina alfa E/CD103, IL-I R6/IL-1 R rp2, Integrina alfa L/CD1 la, IL-I R8, Integrina alfa L beta 2, IL-I R9, Integrina alfa M/CD1 lb, IL-2, Integrina alfa M beta 2, IL-2 R alfa, Integrina alfa V/CD51, IL-2 R beta, Integrina alfa V beta 5, IL-3, Integrina alfa V beta 3, IL-3 R alfa, Integrina alfa V beta 6, IL-3 R beta, Integrina alfa XJCD1 Ic, IL-4, Integrina beta 1/CD29, IL-4 R, Integrina beta 2/CD18, IL-5, Integrina beta 3/CD61, IL-5 R alfa, Integrina beta 5, IL-6, Integrina beta 6, IL-6 R, Integrina beta 7, IL-7, CXCL10/EP-10/CRG-2, IL-7 R alfa/CD127, IRAKI, CXCR1/IL-8 RA, IRAK4, CXCR2/IL-8 RB, ERS-I, CXCL8/IL-8, Islet-I, IL-9, CXCL1 1/I-TAC, IL-9 R, Jagged 1, JAM-4/IGSF5, Jagged 2, JNK, JAM-A, JNK1/JNK2, JAM-B/VE-JAM, JNK1, JAM-C, JNK2, Cininógeno, Calicreína 3/PSA, Cininostatina, Calicreína 4, KER/CD158, Calicreína 5, KER2D1, Calicreína 6/Neuroquina, KIR2DL3, Calicreína 7, KIR2DL4/CD158d, Calicreína 8/Neuroquina, KIR2DS4, Calicreína 9, KIR3DL1, Calicreína en plasma/KLKB1, KER3DL2, Calicreína 10, Kirrel2, Calicreína 11, KLF4, Calicreína 12, KLF5, Calicreína 13, KLF6, Calicreína 14, Klotho, Calicreína 15, Klotho beta, KC, KOR, Keap1, Kremen-1, Kel1, Kremen-2, KGF/FGF-7, LAG-3, LINGO-2, LAIR1, Lipina 2, LAIR2, Lipocalina-1, Laminina alfa 4, Lipocalina-2/NGAL, Laminina gamma 1,5-Lipoxigenasa, Laminina, LXR alfa/NR1H3, Laminina S, LXR beta/NR1H2, Laminina-1, Livina, Laminina-5, LEX, LAMP, LMIR1/CD300A, Langerina, LMIR2/CD300c, LAR, LMIR3/CD300LF, Latexina, LMIR5/CD300LB, Layilina, LMIR6/CD300LE, LBP, LMO2, LDL R,

LOX-1/SR-E1, LECT2, LRH-1/NR5A2, LEDGF, LRIG1, Lefty, LRIG3, Lefty-1, LRP-I, Lefty-A, LRP-6, Legumaina, LSECTin/CLEC4G, Leptina, Lumicano, Leptina R, CXCL15/lungkine, Leucotrieno B4, XCL1/linfotactina, Leucotrieno B4 R1, Limfotoxina, LEF, Limfotoxina beta/TNFSF3, LIF R alfa, Limfotoxina beta R/TNFSF3, LIGHT/TNFSF14, Lyn, Limitina, Lyp, LIMPII/SR-B2, Homólogo 2 de Lisil oxidasa, LIN-28, LYVE-I, LINGO-I, alfa 2-macroglobulina, CXCL9/MIG, MAD2L1, Mimecan, MadCAM-1, Mindina, MafB, Mineralocorticoide R/NR3C2, MafF, Isoforma LD78 beta de CCL3L1/MIP-1 alfa, MafG, CCL3/MIP-1 alfa, MafK, CCL4L1/IAG-1, MAG/Siglec-4-a, CCL4/MIP-1 beta, MANF, CCL15/MEP-1 delta, MAP2, CCL9/10/MIP-1 gamma, MAPK, MIP-2, Marapsina/Pancreasina, CCL19/MIP-3 beta, MARCKS, CCL20/MIP-3 alfa, MARCO, MIP-I, Mash1, MIP-II, Matrilina-2, MIP-III, Matrilina-3, MIS/AMH, Matrilina-4, MIS RII, Matriptasa/ST14, MIXL1, MBL, MKK3/MKK6, MBL-2, MKK3, Melanocortina 3R/MC3R, MKK4, MCAM/CD146, MKK6, MCK-2, MKK7, Mcl-I, MKP-3, MCP-6, MLH-I, CCL2/MCP-1, MLK4 alfa, MCP-11, MMP, CCL8/MCP-2, MMP-1, CCL7/MCP-3/MARC, MMP-2, CCL13/MCP-4, MMP-3, CCL12/MCP-5, MMP-7, M-CSF, MMP-8, M-CSF R, MMP-9, MCV-tipo II, MMP-IO, MD-I, MMP-II, MD-2, MMP-12, CCL22/MDC, MMP-13, MDL-1/CLEC5A, MMP-14, MDM2, MMP-15, MEA-I, MMP-16/MT3-MMP, MEK1/MEK2, MMP-24/MT5-MMP, MEK1, MMP-25/MT6-MMP, MEK2, MMP-26, Melusina, MMR, MEPE, MOG, Meprina alfa, CCL23/MPIF-1, Meprina beta, M-Ras/R-Ras3, Mer, Mrel 1, Mesotelina, MRP1 Meteorina, MSK1/MSK2, Metionina aminopeptidasa 1, MSK1, Metionina aminopeptidasa, MSK2, Metionina aminopeptidasa 2, MSP, MFG-E8, MSP R/Ron, MFRP, Mug, MgcRacGAP, MULT-I, MGL2, Musashi-1, MGMT, Musashi-2, MIA, MuSK, MICA, MutY ADN Glucosilasa, MICB, MyD88, MICL/CLEC12A, Mieloperoxidasa, beta 2 Microglobulina, Miocardina, Midcina, Miocilina, MIF, Mioglobina, NAIP NGFI-B gamma/NR4A3, Nanog, NgR2/NgRH1, CXCL7/NAP-2, NgR3/NgRH2, Nbsl, Nidogeno-1/Entactina, NCAM-1/CD56, Nidogeno-2, NCAM-L1, Óxido nítrico, Nectina-1, Nitrotirosina, Nectina-2/CD1 12, NKG2A, Nectina-3, NKG2C, Nectina-4, NKG2D, Neogenina, NKp30, Neprilisina/CDIO, NKp44, Neprilisina-2/MMEL1/MMEL2, NKp46/NCR1, Nestina, NKp80/KLRF1, NETO2, NKX2.5, Netrina-1, NMDA R, Subunidad NR1, Netrina-2, NMDA R, Subunidad NR2A, Netrina-4, NMDA R, Subunidad NR2B, Netrina-Gla, NMDA R, Subunidad NR2C, Netrina-G2a, N-Me-6,7-diOH-TIQ, Neuregulina-1/NRG1, Nodal, Neuregulina-3/NRG3, Noggin, Neuritina, Receptor Nogo, NeuroD1, Nogo-A, Neurofascina, NOMO, Neurogenina-1, Nope, Neurogenina-2, Norrin, Neurogenina-3, eNOS, Neurolisina, iNOS, Neurofina II, nNOS, Neuropilina-1, Notch-1, Neuropilina-2, Notch-2, Neuropoyetina, Notch-3, Neurotrimina, Notch-4, Neurturina, NOV/CCN3, NFAM1, NRAGE, NF-H, NrCAM, NFkB1, NRL, NFkB2, NT-3, NF-L, NT-4, NF-M, NTB-A/SLAMF6, NG2/MCSP, NTH1, NGF R/TNFSF16, Nucleostemina, beta-NGF, Nurr-1/NR4A2, NGFI-B alfa/NR4A1, OAS2, Orexina B, OBCAM, OSCAR, OCAM, OSF-2/Periostina, OCIL/CLEC2d, Oncostatina M/OSM, OCILRP2/CLEC21, OSM R beta, Oct-3/4, Osteoactivina/GPNMB, OGG1, Osteoadherina, Olig 1, 2, 3, Osteocalcina, Olig1, Osteocrina, Olig2, Osteopontina, Olig3, Osteoprotegerina/TNFSF1 IB, Marcador 01 de Oligodendrocitos, Otx2, Marcador 04 de Oligodendrocitos, OV-6, OMgp, OX40/TNFSF4, Opticina, ligando OX40/TNFSF4, Orexina A, OAS2, Orexina B, OBCAM, OSCAR, OCAM, OSF-2/Periostina, OCIL/CLEC2d, Oncostatina M/OSM, OCILRP2/CLEC2i, OSM R beta, Oct-3/4, Osteoactivina/GPNMB, OGG1, Osteoadherina, Olig 1,2, 3, Osteocalcina, Olig1, Osteocrina, Olig2, Osteopontina, Olig3, Osteoprotegerina/TNFSF1 IB, Marcador 01 de Oligodendrocitos, Otx2, Marcador 04 de Oligodendrocitos, OV-6, OMgp, OX40/TNFSF4, Opticina, ligando OX40/TNFSF4, Orexina A, RACK1, Ret, Rad1, REV-ERB alfa/NR1D1, Rad17, REV-ERB beta/NR1D2, Rad51, Rex-1, Rae-1, RGM-A, Rae-1 alfa, RGM-B, Rae-1 beta, RGM-C, Rae-1 delta, Rheb, Rae-1 épsilon, Proteína ribosómica S6, Rae-1 gamma, RIP1, Raf-1, ROBO1, RAGE, ROBO2, Ra1A/Ra1B, ROB03, Ra1A, ROBO4, Ra1B, ROR/NR1F1-3 (pan), RANK/TNFSF1 1A, ROR alfa/NR1F1, CCL5/RANTES, ROR gamma/NR1F3, Rap1A/B, Receptor 1 huérano tipo RTK/ROR1, RAR alfa/NR1B1, Receptor 2 huérano tipo RTK/ROR2, RAR beta/NR1B2, RP105, RAR gamma/NR1 B3, RP A2, Ras, RSK (pan), RBP4, RSK1/RSK2, RECK, RSK1, Reg 2/PAP, RSK2, Reg I, RSK3, Reg II, RSK4, Reg III, R-Espondina 1, Reg Ila, R-Espondina 2, Reg IV, R-Espondina 3, Relaxina-1, RUNX1/CBFA2, Relaxina-2, RUNX2/CBFA1, Relaxina-3, RUNX3/CBFA3, RELM alfa, RXR alfa/NR2B1, RELM beta, RXR beta/NR2B2, RELT/TNFSF19L, RXR gamma/NR2B3, Resistina, SIOOA10, SLITRK5, S100A8, SLPI, S100A9, SMAC/Diablo, S100B, Smad1, S100P, Smad2, SALL1, Smad3, delta-Sarcoglicano, Smad4, Sca-1/ly6, Smad5, SCD-I, Smad7, SCF, Smad8, SCF R/c-kit, SMC1, SCGF, Alfa actina de músculo liso, SCL/Tall, SMUG1, SCP3/SYCP3, Snail, CXCL12/SDF-1, Intercambiador 1 de calcio y sodio, SDNSF/MCFD2, Soggy-1, alfa-Secretasa, Sonic Hedgehog, gamma-Secretasa, S o CS1, beta-Secretasa, S o CS3, E-selectina, Sortilina, L-selectina, SOST, P-Selectina, SOX1, Semaforina 3A, SOX2, Semaforina 3C, SOX3, Semaforina 3E, SOX7, Semaforina 3F, SOX9, Semaforina 6A, SOX10, VE-Estafina 6B, SOX 17, Semaforina 6C, SOX21 Semaforina 6D, SPARC, Semaforina 7 A, SPARC-tipo 1, Separasa, SP-D, Serina/Treonina Fosfatasa Sustrato I, Espinesina, Serpina A1, F-Espondina, Serpina A3, SR-AI/MSR, Serpina A4/Kallistatin, Src, Serpina A5/Inhibidor de la proteína C, SREC-I/SR-F1, Serpina A8/Angiotensinógeno, SREC-II, Serpina B5, SSEA-I, Serpina C1/Antitrombina-III, SSEA-3, Serpina D1/Cofactor de heparina II, SSEA-4, Serpina E1/PAI-1, ST7/IRP12, Serpina E2, Estabilina-1, Serpina F1, Estabilina-2, Serpina F2, Estaniocalcina 1, Serpina G1/Inhibidor de C1, Estaniocalcina 2, Serpina 12, STAT1, Amiloide sérico A1, STAT2, SF-1/NR5A1, STAT3, SGK, STAT4, SHBG, STAT5a/b, SHIP, STAT5a, SHP/NR0B2, STAT5b, SHP-I, STATE, SHP-2, VE-Estafina, SIGIRR, Stella/Dppa3, Siglec-2/CD22, STRO-I, Siglec-3/CD33, Sustancia P, Siglec-5, Sulfamidasa/SGSH, Siglec-6, Factor 1 de modificación de sulfatasa/SUMF1, Siglec-7, Factor 2 de modificación de sulfatasa/SUMF2, Siglec-9, SUMO1, Siglec-10, SUMO2/3/4, Siglec-11, SUMO3, Siglec-F, Superóxido dismutasa, SIGNR1/CD209, Superóxido Dismutasa-I/Cu[0099]-Zn SOD, SIGNR4, Superóxido dismutasa-2/Mn-SOD, SIRP beta 1, Superóxido dismutasa-3/EC-SOD, SKI, Survivina, SLAM/CD150, Sinapsina I, Transposasa bella durmiente, Syndecan-I/CD 138, Slit3, Syndecan-2, SLITRK1, Syndecan-3, SLITRK2, Syndecan-4, SLITRK4, TACI/TNFSF13B, TMEFF 1/Tomoregulina-1, TAO2, TMEFF2, TAPP1, TNF-alfa/TNFSF IA, CCL17/TARC, TNF-beta/TNFSF1B, Tau, TNF R1/TNFSFIA, TC21/R-Ras2, TNF RII/TNFSF1B, TCAM-I, TOR, TCCR/WSX-1, TP-I, TC-PTP, TP63/TP73L, TDG, TR, CCL25/TECK, TR alfa/NR1A1, Tenascina C, TR beta 1/NR1A2, Tenascina R, TR2/NR2C1, TER-119, TR4/NR2C2,

TERT, TRA-1-85, Testicano 1/SPOCK1, TRADD, Testicano 2/SPOCK2, TRAF-1, Testicano 3/SPOCK3, TRAF-2, TFPI, TRAF-3, TFPI-2, TRAF-4, TGF-alfa, TRAF-6, TGF-beta, TRAIL/TNFSF10, TGF-beta 1, TRAIL R1/TNFSF10A, LAP (TGF-beta 1), TRAIL R2/TNFSF10B, TGF latente beta 1, TRAIL R3/TNFSF10C, TGF-beta 1,2, TRAIL R4/TNFSF10D, TGF-beta 2, TRANCE/TNFSF1 1, TGF-beta 3, Tfr (Transferrina R), TGF-beta 5, ApoTransferrina, TGF latente beta por 1, Holo-Transferrina, TGF latente beta bp2, Trappin-2/Elafina, TGF latente beta bp4, TREM-1, TGF-beta R1/ALK-5, TREM-2, TGF-beta R11, TREM-3, TGF-beta RIIb, TREML1/TLT-1, TGF-beta RIII, TRF-I, Termolisina, TRF-2, Tioredoxina-1, Ectoenzima de degradación de TRH/TNFSF12, Tioredoxina-2, TRIMS, Tioredoxina-80, Tripeptidil-peptidasa I, Tioredoxina-tipo 5/TRP14, TrkA, THOP1, TrkB, Trombomodulina/CD141, TrkC, Trombopoyetina, TROP-2, Trombopoyetina, Troponina I Péptido 3, Trombospondina-1, Troponina T, Trombospondina-2, TROY/TNFSF 19, Trombospondina-4, Tripsina 1, Timopoyetina, Tripsina 2/PRSS2, Quimiocina-1 del timo, Tripsina 3/PRSS3, Tie-1, Triptasa-5/Prss32, Tie-2, Triptasa alfa/TPS1, TIM-I/KIM-I/HAVCR, Triptasa beta -1/MCPT-7, TIM-2, Triptasa beta -2/TPSB2, TIM-3, Triptasa épsilon/BSSP-4, TIM-4, Triptasa gamma-1/TPSG1, TIM-5, Triptófano Hidroxilasa, TIM-6, TSC22, TIMP-I, TSG, TIMP-2, TSG-6, TIMP-3, TSK, TIMP-4, TSLP, TL1A/TNFSF15, TSLP R, TLR1, TSP50, TLR2, beta-III Tubulina, TLR3, TWEAK/TNFSF12, TLR4, TWEAK R/TNFSF12, TLR5, Tyk2, TLR6, Fosfo-Tirosina, TLR9, Tirosina hidroxilasa, TLX/NR2E1, Tirosina fosfatasa Sustrato I, Ubiquitina, UNC5H3, Ugi, UNC5H4, UGRP1, UNG, ULBP-I, uPA, ULBP-2, uPAR, ULBP-3, URB, UNC5H1, UVDE, UNC5H2, Vaniloide R1, VEGF R, VASA, VEGF R1/Flt-1, Vasohibina, VEGF R2/KDR/Flk-1, VASORINA, VEGF R3/FU-4, Vasostatina, Versicano, Vav-1, VG5Q, VCAM-1, VHR, VDR/NR111, Vimentina, VEGF, Vitronectina, VEGF-B, VLDLR, VEGF-C, vWF-A2, VEGF-D, Sinucleína-alfa, Ku70, WASP, Wnt-7b, WIF-I, Wnt-8a, WISP-1/CCN4, Wnt-8b, WNK1, Wnt-9a, Wnt-1, Wnt-9b, Wnt-3a, Wnt-10a, Wnt-4, Wnt-10b, Wnt-5a, Wnt-11, Wnt-5b, wvNS3, Wnt7a, XCR1, XPE/DDB1, XEDAR, XPE/DDB2, Xg, XPF, XIAP, XPG, XPA, XPV, XPD, XRCC1, Yes, YY1, EphA4.

Numerosos canales de iones humanos son dianas de particular interés. Los ejemplos no limitantes incluyen la subunidad B del receptor 3 de 5-hidroxitriptamina, precursor del receptor 3 de 5-hidroxitriptamina, subunidad C del receptor 3 de 5-hidroxitriptamina, proteína AAD 14, precursor de la subunidad alfa de la proteína receptora de acetilcolina, precursor de la subunidad beta de la proteína receptora de acetilcolina, precursor de la subunidad delta de la proteína receptora de acetilcolina, precursor de la subunidad epsilon de la proteína receptora de acetilcolina, Variante de empalme b del canal iónico 3 de detección de ácido, Variante de empalme c del canal iónico 3 de detección de ácido, canal iónico 4 de detección de ácido, ADP-ribosa pirofosfatasa, precursor mitocondrial, Canal de calcio dependiente de voltaje alfa 1 A, Canal 1 de catión sensible a amilorida, Canal 2 de catión sensible a amilorida neuronal, Canal 4 de catión sensible a amilorida neuronal, isoforma 2, Canal de sodio sensible a amilorida, Subunidad alfa del canal de sodio sensible a amilorida, Subunidad beta del canal de sodio sensible a amilorida, Subunidad delta del canal de sodio sensible a amilorida, Subunidad gamma del canal de sodio sensible a amilorida, Anexina A7, Proteína tipo apical, Canal 1 del rectificador interno de potasio sensible al ATP, Canal 10 del rectificador interno de potasio sensible al ATP, Canal 11 del rectificador interno de potasio sensible al ATP, Canal 14 del rectificador interno de potasio sensible al ATP, Canal 15 del rectificador interno de potasio sensible al ATP, Canal 8 del rectificador interno de potasio sensible al ATP, Subunidad alfa 12.2 del canal de calcio, Subunidad alfa 12.2 del canal de calcio, Subunidad alfa IE del canal de calcio, variante de empalme delta 19 delta 40 delta 46, Subunidad 1 alfa del canal de potasio activada por calcio, Subunidad 1 beta del canal de potasio activada por calcio, Subunidad 2 beta del canal de potasio activada por calcio, Subunidad 3 beta del canal de potasio activada por calcio, Canal 1 de cloro dependiente de calcio, Canal catiónico TRPM4B, CDNA FLJ90453 fis, clon NT2RP3001542, muy similar a 6 que contiene el dominio de tetramerización del canal de potasio, CDNA FLJ90663 fis, clon PLACE 1005031, muy similar a la proteína 5 del canal intracelular de cloro, Subunidad beta del canal de cationes regulada por CGMP, Proteína del canal de cloro, Proteína 2 del canal de cloro, Proteína 3 del canal de cloro, Proteína 4 del canal de cloro, Proteína 5 del canal de cloro, Proteína 6 del canal de cloro, Proteína CIC-Ka del canal de cloro, Proteína CIC-Kb del canal de cloro, Proteína del canal de cloro, músculo esquelético, Canal 6 intracelular de cloro, Proteína 3 del canal intracelular de cloro, Proteína 4 del canal intracelular de cloro, Proteína 5 del canal intracelular de cloro, proteína CHRNA3, proteína Clcn3e, proteína CLCNKB, proteína CNGA4, Cullina -5, Canal de potasio regulado por GMP cíclico, Canal 4 de cationes regulado por nucleótidos cíclicos, Canal alfa 3 de cationes regulado por nucleótidos cíclicos, Canal beta 3 de cationes regulado por nucleótidos cíclicos, Canal olfativo regulado por nucleótidos cíclicos, Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, Cadena pesada del citocromo B-245, Tipo L sensible a la dihidropiridina, precursor de las subunidades alfa-2/delta del canal de calcio, Precursor del regulador 3 de transporte de iones que contiene el dominio FXYD, Precursor del regulador 5 de transporte de iones que contiene el dominio FXYD, Precursor del regulador 6 de transporte de iones que contiene el dominio FXYD, regulador 7 de transporte de iones que contiene el dominio FXYD, Precursor del regulador 8 de transporte de iones que contiene el dominio FXYD, Canal 1 del rectificador interno de potasio activado por la proteína G, Canal 2 del rectificador interno de potasio activado por la proteína G, Canal 3 del rectificador interno de potasio activado por la proteína G, Canal 4 del rectificador interno de potasio activado por la proteína G, Precursor de la subunidad alfa-1 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, Precursor de la subunidad alfa-2 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, Precursor de la subunidad alfa-3 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, Precursor de la subunidad alfa-4 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, Precursor de la subunidad alfa-5 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, Precursor de la subunidad alfa-6 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, Precursor de la subunidad beta-1 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, Precursor de la subunidad beta-2 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, Precursor de la subunidad beta-3 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, Precursor de la subunidad delta del receptor de ácido

gamma-aminobutírico, Precursor de la subunidad épsilon del receptor de ácido gamma-aminobutírico, Precursor de la subunidad gamma-1 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, Precursor de la subunidad gamma-3 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, Precursor de la subunidad pi del receptor de ácido gamma-aminobutírico, Precursor de la subunidad rho-1 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, Precursor de la subunidad rho-2 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, Precursor de la subunidad theta del receptor de ácido gamma-aminobutírico, Receptor de kainato GluR6, Precursor del receptor 1 de glutamato, Precursor del receptor 2 de glutamato, Precursor del receptor 3 de glutamato, Precursor del receptor 4 de glutamato, Receptor 7 de glutamato, Receptor B de glutamato, Precursor de la subunidad delta-1 del receptor de glutamato, Precursor 1 del receptor de glutamato ionotrópico de kainato, Precursor 2 del receptor de glutamato ionotrópico de kainato, Precursor 3 del receptor de glutamato ionotrópico de kainato, Precursor 4 del receptor de glutamato ionotrópico de kainato, Precursor 5 del receptor de glutamato ionotrópico de kainato, Precursor de la subunidad 3A del receptor de glutamato [NMDA], Precursor de la subunidad 3B del receptor de glutamato [NMDA], Precursor de la subunidad épsilon 1 del receptor de glutamato [NMDA], Precursor de la subunidad épsilon 2 del receptor de glutamato [NMDA], Precursor de la subunidad épsilon 4 del receptor de glutamato [NMDA], Precursor de la subunidad zeta 1 del receptor de glutamato [NMDA], Precursor de la cadena alfa-1 del receptor de glicina, Precursor de la cadena alfa-2 del receptor de glicina, Precursor de la cadena alfa-3 del receptor de glicina, Precursor de la cadena beta del receptor de glicina, Subunidad 1 del complejo ribonucleoproteína H/ACA, Subunidad beta del receptor épsilon de inmunoglobulina de alta afinidad, Proteína teórica DKFZp31310334, Proteína teórica DKFZp761M1724, Proteína teórica FLJ12242, Proteína teórica FLJ14389, Proteína teórica FLJ14798, Proteína teórica FLJ14995, Proteína teórica FLJ16180, Proteína teórica FLJ16802, Proteína teórica FLJ32069, Proteína teórica FLJ37401, Proteína teórica FLJ38750, Proteína teórica FLJ40162, Proteína teórica FLJ41415, Proteína teórica FLJ90576, Proteína teórica FLJ90590, Proteína teórica FLJ90622, Proteína teórica KCTD15, Proteína teórica MGC15619, Receptor de tipo 1 de inositol 1,4,5-trisfosfato, Receptor de tipo 2 de inositol 1,4,5-trisfosfato, Receptor de tipo 3 de inositol 1,4,5-trisfosfato, Proteína 4 del canal de potasio activado por calcio de conductividad intermedia, Canal 13 del rectificador interno de potasio, Canal 16 del rectificador interno de potasio, Canal 4 del rectificador interno de potasio, Regulador Kir2.2v del canal negativo del rectificador interno de K(+), Subunidad KA2a del receptor de kainato, proteína KCNH5, proteína KCTD 17, proteína KCTD2, Proteína 1 transmembrana asociada a queratinocitos, Proteína 4 que interactúa con el canal de Kv, Melastatina 1, Proteína de membrana MLC1, Proteína MGC 15619, Mucolipina-1, Mucolipina-2, Mucolipina-3, Proteína 4 asociada a la resistencia a múltiples fármacos, Precursor de la subunidad 2C del receptor de N-metil-D-aspartato, Homólogo 1 de NADPH oxidasa, Nav1.5, Precursor de la subunidad alfa-10 de la proteína del receptor neuronal de acetilcolina, Precursor de la subunidad alfa-2 de la proteína del receptor neuronal de acetilcolina, Precursor de la subunidad alfa-3 de la proteína del receptor neuronal de acetilcolina, Precursor de la subunidad alfa-4 de la proteína del receptor neuronal de acetilcolina, Precursor de la subunidad alfa-5 de la proteína del receptor neuronal de acetilcolina, Precursor de la subunidad alfa-6 de la proteína del receptor neuronal de acetilcolina, Precursor de la subunidad alfa-7 de la proteína del receptor neuronal de acetilcolina, Precursor de la subunidad alfa-9 de la proteína del receptor neuronal de acetilcolina, Precursor de la subunidad beta-2 de la proteína del receptor neuronal de acetilcolina, Precursor de la subunidad beta-3 de la proteína del receptor neuronal de acetilcolina, Precursor de la subunidad beta-4 de la proteína del receptor neuronal de acetilcolina, Subunidad alfa 2D del canal de calcio dependiente de voltaje neuronal, Purinorreceptor 1 P2X, Purinorreceptor 2 P2X, Purinorreceptor 3 P2X, Purinorreceptor 4 P2X, Purinorreceptor 5 P2X, Purinorreceptor 6 P2X, Purinorreceptor 7 P2X, Canal TALK-Ib de potasio pancreático, Canal TALK-Ic de potasio pancreático, Canal TALK-Id de potasio pancreático, Precursor de Phospholemman, Plasmolipina, Proteína relacionada con la enfermedad renal poliquística 2, Proteína 1 tipo enfermedad renal poliquística 2, Proteína 2 tipo enfermedad renal poliquística 2, Precursor de la proteína relacionada con la enfermedad renal poliquística y el receptor de la gelatina del huevo, Policistina-2, Regulador del canal de potasio, Miembro 1 de la subfamilia K del canal de potasio, Miembro 10 de la subfamilia K del canal de potasio, Miembro 12 de la subfamilia K del canal de potasio, Miembro 13 de la subfamilia K del canal de potasio, Miembro 15 de la subfamilia K del canal de potasio, Miembro 16 de la subfamilia K del canal de potasio, Miembro 17 de la subfamilia K del canal de potasio, Miembro 2 de la subfamilia K del canal de potasio, Miembro 3 de la subfamilia K del canal de potasio, Miembro 4 de la subfamilia K del canal de potasio, Miembro 5 de la subfamilia K del canal de potasio, Miembro 6 de la subfamilia K del canal de potasio, Miembro 7 de la subfamilia K del canal de potasio, Miembro 9 de la subfamilia K del canal de potasio, Proteína 3 que contiene el dominio de tetramerización del canal de potasio, Proteína 12 que contiene el dominio de tetramerización del canal de potasio, Proteína 14 que contiene el dominio de tetramerización del canal de potasio, Proteína 2 que contiene el dominio de tetramerización del canal de potasio, Proteína 4 que contiene el dominio de tetramerización del canal de potasio, Proteína 5 que contiene el dominio de tetramerización del canal de potasio, Proteína 10 que contiene el dominio de tetramerización del canal de potasio, Proteína 13 que contiene el dominio de tetramerización del canal de potasio, Proteína 1 que contiene el dominio de tetramerización del canal de potasio, Miembro 1 de la subfamilia A del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 2 de la subfamilia A del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 4 de la subfamilia A del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 5 de la subfamilia A del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 6 de la subfamilia A del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 1 de la subfamilia B del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 2 de la subfamilia B del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 1 de la subfamilia C del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 3 de la subfamilia C del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 4 de la subfamilia C del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 1 de la subfamilia D del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 2 de la subfamilia D del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 1 de la subfamilia E del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 2 de la subfamilia E del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 3 de la

subfamilia E del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 4 de la subfamilia E del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 1 de la subfamilia F del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 1 de la subfamilia G del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 2 de la subfamilia G del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 3 de la subfamilia G del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 4 de la subfamilia G del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 1 de la subfamilia H del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 2 de la subfamilia H del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 3 de la subfamilia H del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 4 de la subfamilia H del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 5 de la subfamilia H del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 6 de la subfamilia H del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 7 de la subfamilia H del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 8 de la subfamilia H del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 1 de la subfamilia KQT del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 2 de la subfamilia KQT del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 3 de la subfamilia KQT del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 4 de la subfamilia KQT del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 5 de la subfamilia KQT del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 1 de la subfamilia S del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 2 de la subfamilia S del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 3 de la subfamilia S del canal de potasio regulado por voltaje, Miembro 2 de la subfamilia V del canal de potasio regulado por voltaje, Isoforma 2 del miembro 7 de la subfamilia H del canal de potasio regulado por voltaje, Canal 1 regulado por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización de potasio/sodio, Canal 2 regulado por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización de potasio/sodio, Canal 3 regulado por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización de potasio/sodio, Canal 4 regulado por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización de potasio/sodio, Homólogo de la subunidad TOM40 del receptor de importación mitocondrial probable, Receptor purinérgico P2X5, isoforma A, Supuestos 4 canales de iones regulados por voltaje, Supuesta proteína 7 del canal de cloro, Supuesto receptor de kainato GluR6, Supuesta variante 1 de la proteína CATSPER2 del canal iónico, Supuesta variante 2 de la proteína CATSPER2 del canal iónico, Supuesta variante 3 de la proteína CATSPER2 del canal iónico, Supuesto regulador de la variante 1 de la proteína de canales de potasio, Supuesta tirosina-proteína fosfatasa TPTE, Receptor 1 de rianodina, Receptor 2 de rianodina, Receptor 3 de rianodina, Proteína 1 de unión a SH3 KBP1, Canal 1 del posible receptor transitorio corto, Canal 4 del posible receptor transitorio corto, Canal 5 del posible receptor transitorio corto, Canal 6 del posible receptor transitorio corto, Canal 7 del posible receptor transitorio corto, Proteína 1 del canal de potasio activado por calcio de conductividad pequeña, Proteína 2 del canal de potasio activado por calcio de conductividad pequeña, isoforma b, Proteína 3 del canal de potasio activado por calcio de conductividad pequeña, isoforma b, Canal SK2 de potasio activado por calcio de conductividad pequeña, Canal SK3 de potasio activado por calcio de conductividad pequeña, Canal de sodio, Precursor de la subunidad beta-1 del canal de sodio, Subunidad alfa de la proteína de tipo II del canal de sodio, Subunidad alfa de la proteína de tipo III del canal de sodio, Subunidad alfa de la proteína de tipo IV del canal de sodio, Subunidad alfa de la proteína de tipo IX del canal de sodio, Subunidad alfa de la proteína de tipo V del canal de sodio, Subunidad alfa de la proteína de tipo VII del canal de sodio, Subunidad alfa de la proteína de tipo VIII del canal de sodio, Subunidad alfa de la proteína de tipo X del canal de sodio, Subunidad alfa de la proteína de tipo XI del canal de sodio, Canal de potasio sensible a ATP activado por sodio y cloro, Cadena gamma de la ATPasa que transporta sodio/potasio, Canal 1 de catión asociado a esperma, Canal 2 de catión asociado a esperma, isoforma 4, Sintaxina-1B1, Miembro 1 de la subfamilia A del canal de cationes del receptor de potencial transitorio, Miembro 2 de la subfamilia M del canal de cationes del receptor de potencial transitorio, Miembro 3 de la subfamilia M del canal de cationes del receptor de potencial transitorio, Miembro 6 de la subfamilia M del canal de cationes del receptor de potencial transitorio, Miembro 7 de la subfamilia M del canal de cationes del receptor de potencial transitorio, Miembro 1 de la subfamilia V del canal de cationes del receptor de potencial transitorio, Miembro 2 de la subfamilia V del canal de cationes del receptor de potencial transitorio, Miembro 3 de la subfamilia V del canal de cationes del receptor de potencial transitorio, Miembro 4 de la subfamilia V del canal de cationes del receptor de potencial transitorio, Miembro 5 de la subfamilia V del canal de cationes del receptor de potencial transitorio, Miembro 6 de la subfamilia V del canal de cationes del receptor de potencial transitorio, Variante epsilon de empalme del canal 4 del receptor de potencial transitorio, Variante zeta de empalme del canal 4 del receptor de potencial transitorio, Variante gamma de empalme del canal 7 del receptor de potencial transitorio, Factor de necrosis tumoral, Proteína 1 inducida por alfa, endotelial, Proteína 2 del canal de calcio de dos poros, proteína VDAC4, Canal Kv3.2b de potasio regulado por voltaje, Subunidad beta1B del canal de sodio regulado por voltaje, Canal aniónico dependiente de voltaje, Canal 2 aniónico dependiente de voltaje, Proteína 1 del canal selectivo de aniones dependiente de voltaje, Proteína 2 del canal selectivo de aniones dependiente de voltaje, Proteína 3 del canal selectivo de aniones dependiente de voltaje, Subunidad gamma-1 del canal de calcio dependiente de voltaje, Subunidad gamma-2 del canal de calcio dependiente de voltaje, Subunidad gamma-3 del canal de calcio dependiente de voltaje, Subunidad gamma-4 del canal de calcio dependiente de voltaje, Subunidad gamma-5 del canal de calcio dependiente de voltaje, Subunidad gamma-6 del canal de calcio dependiente de voltaje, Subunidad gamma-7 del canal de calcio dependiente de voltaje, Subunidad gamma-8 del canal de calcio dependiente de voltaje, Subunidad alfa-1C del canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, Subunidad alfa-ID del canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, Subunidad alfa-IS del canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, Subunidad beta-1 del canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, Subunidad beta-2 del canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, Subunidad beta-3 del canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, Subunidad beta-4 del canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, Subunidad alfa-1B del canal de calcio tipo N dependiente de voltaje, Subunidad alfa-1A del canal de calcio tipo P/Q dependiente de voltaje, Subunidad alfa-IE del canal de calcio tipo R dependiente de voltaje, Subunidad alfa-1G del canal de calcio tipo T dependiente de voltaje, Subunidad alfa-1H del canal de calcio tipo T dependiente de voltaje, Subunidad alfa-1I del canal de calcio tipo T dependiente de voltaje, Subunidad alfa-1 del canal de calcio tipo L dependiente de voltaje,

Subunidad beta-1 del canal de potasio regulado por voltaje, Subunidad beta-2 del canal de potasio regulado por voltaje, Subunidad beta-3 del canal de potasio regulado por voltaje, Canal KCNA7 de potasio regulado por voltaje. La familia Nav1.x de canales de sodio humano regulados por voltaje también es una diana particularmente prometedora. Esta familia incluye, por ejemplo, los canales Nav1.6 y Nav1.8.

- 5 En determinadas realizaciones, la proteína terapéutica puede ser un receptor acoplado a proteína G (GPCR). Los ejemplos de GPCR incluyen, pero sin limitación, receptores tipo Rodopsina de Clase A, tales como muscarínico de tipo 1 de acetilcolina de vertebrados, muscarínico de tipo 2 de acetilcolina de vertebrados, muscarínico de tipo 3 de acetilcolina de vertebrados, muscarínico de tipo 4 de acetilcolina de vertebrados; Adrenorreceptores (adrenorreceptores alfa tipo 1, adrenorreceptores alfa tipo 2, Adrenorreceptores beta tipo 1, Adrenorreceptores beta tipo 2, Adrenorreceptores beta tipo 3, Dopamina de vertebrados tipo 1, Dopamina de vertebrados tipo 2, Dopamina de vertebrados tipo 3, Dopamina de vertebrados tipo 4, Histamina tipo 1, Histamina tipo 2, Histamina tipo 3, Histamina tipo 4, Serotonina tipo 1, Serotonina tipo 2, Serotonina tipo 3, Serotonina tipo 4, Serotonina tipo 5, Serotonina tipo 6, Serotonina tipo 7, Serotonina tipo 8, otros tipos de serotonina, Amina traza, Angiotensina tipo 1, Angiotensina tipo 2, Bombesina, Bradiquininas, Anafilotoxina C5a, Fmet-leu-phe, Similar a APJ, Interleucina-8 tipo A, Interleucina-8 tipo B, otros tipos de Interleucina-8, Quimiocina C-C de tipo 1 a tipo 11 y otros tipos, Quimiocina C-X-C (tipos 2 a 6 y otros), Quimiocina C-X3-C, Colecistocina CCK, CCK tipo A, CCK tipo B, otras CCK, Endotelina, Melanocortina (hormona estimuladora de melanocitos, hormona adrenocorticotrópica, hormona melanocortina), Antígeno Duffy, Péptido liberador de prolactina (GPR10), Neuropéptido Y (tipo 1 a 7), Neuropéptido Y, otro neuropéptido Y, Neurotensina, Opiode (tipo D, K, M, X), Somatostatina (tipo 1 a 5), Taquicinina (Sustancia P (NK1), Sustancia K (NK2), Neuromedina K (NK3), Taquicinina tipo 1, Taquicinina tipo 2, Vasopresina/vasotocina (tipo 1 a 2), Vasotocina, Oxitocina/mesotocina, Conopresina, Similar a galanina, Similar a proteinasa activada, Orexina y neuropéptidos FF.QRFP, Similar a receptores de quimiocinas, Similar a neuromedina U (Neuromedina U, PRXamida), proteína hormonal (hormona estimulante del folículo, hormona coriogonadotrópica lutropina, Tirotropina, Gonadotropina tipo I, Gonadotropina tipo II), (Rod)opsina, Rodopsina de vertebrados (tipos 1-5), Rodopsina de vertebrados tipo 5, Rodopsina de artrópodos, Rodopsina de artrópodos tipo 1, Rodopsina de artrópodos tipo 2, Rodopsina de artrópodos tipo 3, Rodopsina de moluscos, Rodopsina Olfativa (Olfativa II fam 1 a 13), Prostaglandina (prostaglandina E2 subtipo EP1, Prostaglandina E2/D2 subtipo EP2, Prostaglandina E2 subtipo EP3, Prostaglandina E2 subtipo EP4, Prostaglandina F2-alfa, Prostaciclina, Tromboxano, Adenosina tipo 1 a 3, Purinorreceptores, Purinorreceptor P2RY1-4,6,1 1 GPR91, Purinorreceptor P2RY5,8,9,10 GPR35,92,174, Purinorreceptor P2RY12-14 GPR87 (UDP-Glucosa), Cannabinoides, Factor activador de plaquetas, Hormona liberadora de gonadotropina, Hormona liberadora de gonadotropina tipo I, Hormona liberadora de gonadotropina tipo II, Similar la hormona adipocinética, Corazonina, Hormona liberadora de tirotropina y secretagogo, Hormona liberadora de tirotropina, Secretagogo de la hormona de crecimiento, Similar a secretagogo de la hormona de crecimiento, Hormona desencadenante de ecdisis (ETHR), Melatonina, Lisosfingolípido y LPA (EDG), Esfingosina 1-fosfato Edg-1, Ácido lisofosfatídico Edg-2, Esfingosina 1-fosfato Edg-3, Ácido lisofosfatídico Edg-4, Esfingosina 1-fosfato Edg-5, Esfingosina 1-fosfato Edg-6, Ácido lisofosfatídico Edg-7, Esfingosina 1-fosfato Edg-8, Receptor de otro leucotrieno B4 Edg, Receptor BLT1 de leucotrieno B4, Receptor BLT2 de leucotrieno B4, Clase A huérfana/otro, Supuestos neurotransmisores, SREB, Protooncogen Mas y relativo a Mas (MRG), Similar a GPR45, Cisteinil leucotrieno, Receptor de ácido biliar acoplado a proteína G, Receptor de ácidos grasos libres (GP40, GP41, GP43), Similar a Secretina clase B, Calcitonina, Factor de liberación de corticotrofina, Péptido inhibidor gástrico, Glucagón, Hormona liberadora de hormona de crecimiento, Hormona paratiroidea, PACAP, Secretina, Polipéptido intestinal vasoactivo, Latrofilina, Latrofilina tipo 1, Latrofilina tipo 2, Latrofilina tipo 3, Receptores ETL, Inhibidor de la angiogénesis específica de cerebro (BAI), Proteínas de tipo methuselah (MTH), Cadherina EGF LAG (CELSR), Receptor acoplado a proteína G muy grande, Glutamato metabotrópico de clase C/Feromona, Glutamato metabotrópico de grupo I a III, Similar a sensor de calcio, Sensor de calcio extracelular, Feromona, otros sensores de calcio similares, Supuestos receptores de feromonas, GABA-B, GABA-B subtipo 1, GABA-B subtipo 2, similar a GABA-B, GPRC5 huérfano, GPCR6 huérfano, Novia de la proteína sevenless (BOSS), Receptores del gusto (T1R), Feromona fúngica de clase D, Similar al factor A de la feromona fúngica (STE2.STE3), Similar a la feromona fúngica B (BAR,BBR,RCB,PRA), Receptores de cAMP de clase E, Proteínas de albinismo ocular, familia de Frizzled/Smoothed, frizzled de grupo A (Fz 1&2&4&5&7-9), frizzled de grupo B (Fz 3 & 6), frizzled de grupo C (otro), Receptores vomeronasales, Quimiorreceptores de nematodos, Receptores de olor de insectos, y opsinas de archaea/bacterias/hongos de clase Z.
- 55 En determinadas realizaciones, las fusiones de Fn3 de unión a seroalbúmina descritas en el presente documento pueden comprender cualquiera de los siguientes polipéptidos activos: BOTOX, Myobloc, Neurobloc, Dysport (u otros serotipos de neurotoxinas botulínicas), algluscosidasa alfa, daptomicina, YH-16, coriogonadotropina alfa, filgrastim, cetorelix, interleucina-2, aldesleucina, teceleucina, denileucina difitox, interferón alfa-n3 (inyección), interferón alfa-n1, DL-8234, interferón, Suntory (gamma-la), interferón gamma, timosina alfa 1, tasonermina, DigiFab, ViperaTab, EchiTab, CroFab, nesiritida, abatacept, alefacept, Rebif, eptoterminalfa, teriparatida (osteoporosis), calcitonina inyectable (enfermedad ósea), calcitonina (nasal, osteoporosis), etanorcept, glutámero de hemoglobina 250 (bovino), drotrecogina alfa, collagenasa, carperitida, factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (gel tópico, cicatrización de heridas), DWP-401, darbepoetina alfa, epoetina omega, epoetina beta, epoetina alfa, desirudina, lepirudina, bivalirudina, nonacog alfa, Mononina, eptacog alfa (activado), Factor VIII+VWF recombinante, Recombinate, Factor VIII recombinante, Factor VIII (recombinante), Alfanato, octocog alfa, Factor VIII, palifermina, Indicina, tenecteplasa, alteplasa, pamiteplasa, reteplasa, nateplasa, monteplasa, folitropina alfa, rFSH, hpFSH,

micafungina, pegfilgrastim, lenograstim, nartograstim, sermorelin, glucagón, exenatida, pramlintida, imiglucerasa, galsulfasa, Leucotropina, molgramostim, acetato de triptorelina, histrelina (implante subcutáneo, Hydron), deslorelina, histrelina, nafarelina, depósito de liberación sostenida de leuprolide (ATRIGEL), implante de leuprolide (DUROS), goserelina, somatropina, Eutropina, Programa KP-102, somatropina, somatropina, mecasermina (falta de crecimiento), enfuvirtida, Org-33408, insulina glargina, insulina glulisina, insulina (inhalaada), insulina lispro, insulina detemir, insulina (bucal, RapidMist), rinfabato de mecasermina, anakinra, celmoleucina, inyección de 99 mTc-apcitida, mielóido, Betaseron, acetato de glatiramer, Gepon, sargramostim, oprelvekina, interferones alfa procedentes de leucocitos humanos, Bilive, insulina (recombinante), insulina humana recombinante, insulina aspart, mecasermina, Roferon-A, interferón-alfa 2, Alfaferona, interferón alfacon-1, interferón alfa, hormona luteinizante humana recombinante Avonex, dornasa alfa, trafermin, ziconotida, taltirelina, diboterminalfa, atosiban, becaplermina, eptifibatida, Zemaira, CTC-111, Shanvac-B, Vacuna HPV (cuadivalente), NOV-002, octreotida, lanreotida, aneastim, agalsidasa beta, agalsidasa alfa, laronidasa, acetato de cobre Prezatide (gel tópico), rasburicasa, ranibizumab, Actimmune, PEG-Intrón, Tricomín, inyección desensibilizante de alergia de ácaro del polvo doméstico recombinante, hormona paratiroidea humana recombinante (PTH) 1-84 (sc, osteoporosis), epoetina delta, antitrombina transgénica III, Granditropin, Vitrase, insulina recombinante, interferón alfa (pastilla oral), GEM-2 IS, vapreotida, idursulfasa, omapatrilat, seroalbúmina recombinante, certolizumab pegol, glucarpidasa, inhibidor de la C1 esterasa humana recombinante (angioedema), lanoteplasa, hormona de crecimiento humano recombinante, enfuvirtida (inyección sin aguja, Biojector 2000), VGV-I, interferón (alfa), lucinactant, aviptadil (inhalaado, enfermedad pulmonar), icatibant, ecallantide, omigánan, Aurograb, acetato de pexigánan, ADI-PEG-20, LDI-200, degarelix, besudotox de cintredequina, Favld, MDX-1379, ISAtx-247, liraglutida, teriparatida (osteoporosis), tifacogin, AA-4500, Loción de liposoma T4N5, catumaxomab, DWP-413, ART-123, Crisalina, desmoteplasa, amedioplasa, corifolitropina alfa, TH-9507, teduglutida, Diamyd, DWP-412, hormona del crecimiento (inyección de liberación sostenida), G-CSF recombinante, insulina (inhalaada, AIR), insulina (inhalaada, Technosphere), insulina (inhalaada, AERx), RGN-303, DiaPep277, interferón beta (infección vírica por hepatitis C (HCV)), interferón alfa-n3 (oral), belatacept, parches de insulina transdérmicos, AMG-531, MBP-8298, Xerecept, opebacan, AIDSVAX, GV-1001, LymphoScan, ranpirnasa, Lipoxysan, lusupultida, MP52 (vehículo de beta fosfato tricálcico, regeneración ósea), vacuna contra el melanoma, sipuleucel-T, CTP-37, Insegia, vitespen, trombina humana (congelada, hemorragia quirúrgica), trombina, TransMID, alfimeprasa, Puricase, terlipresina (intravenosa, síndrome hepatorenal), EUR-1008M, FGF-I recombinante (inyectable, enfermedad vascular), BDM-E, rotigaptida, ETC-216, P-113, MBI-594AN, duramicina (inhalaada, fibrosis quística), SCV-07, OPI-45, Endostatina, Angiostatina, ABT-510, Concentrado de inhibidor de Bowman Birk, XMP-629, 99 mTc-Hynic-Anexina V, kahalalida F, CTCE-9908, Teverelix (liberación extendida), ozarelix, romidepsina, BAY-50-4798, interleucina-4, PRX-321, Pepscan, ibotadekin, rh lactoferrina, TRU-015, IL-21, ATN-161, cilengitida, Albuferon, Biphasix, IRX-2, interferón omega, PCK-3145, CAP-232, pasireotide, huN901-DM1, vacuna inmunoterapéutica para el cáncer de ovario, SB-249553, Oncovax-CL, OncoVax-P, BLP-25, CerVax-16, vacuna contra el melanoma peptídico de múltiples epítomos (MART-I, gp100, tirosinasa), nemifitida, rAAT (inhalaado), rAAT (dermatológica), CGRP (inhalaado, asma), pegsunercept, timosina beta -4, plitidepsina, RTP-200, ramoplanina, GRASPA, OBI-I, AC-100, calcitonina de salmón (oral, eligen), calcitonina (oral, osteoporosis), examorelina, capromorelin, Cardeva, velafermin, 131I-TM-601, KK-220, TP-10, ularitide, depelestat, hematide, Crisalina (tópico), rNAPc2, Factor VIII recombinante (liposomal PEGilado), bFGF, Variante de estafilocinasa recombinante PEGilada, V-10153, SonoLysis Prolyse, NeuroVax, CZEN-002, terapia de la neogénesis de células de los islotes, rGLP-1, BIM-51077, LY-548806, exenatida (liberación controlada, Medisorb), AVE-0010, GA-GCB, avorelina, AOD-9604, acetato de linaclotida, CETI-I, Hemospan, VAL (inyectable), insulina de acción rápida (inyectable, Viadel), insulina intranasal, insulina (inhalaada), insulina (oral, eligen), metionil leptina humana recombinante, pitrakinra (inyección subcutánea, eccema), pitrakinra (polvo seco inhalaado, asma), Multikine, RG-1068, MM-093, NBI-6024, AT-001, PI-0824, Org-39141, Cpn10 (enfermedades autoinmunitarias/inflamación), talactoferrina (tópica), rEV-131 (oftálmico), rEV-131 (enfermedad respiratoria), insulina humana recombinante oral (diabetes), RPI-78M, oprelvekin (oral), CYT-99007 CTLA4-Ig, DTY-001, valategrast, interferón alfa-n3 (tópico), IRX-3, RDP-58, Tauferon, lipasa estimulada por sales biliares, Merispase, fosfatasa alcalina, EP-2104R, Melanotan-II, bremelanotide, ATL-104, microplasma humana recombinante, AX-200, SEMAX, ACV-I, Xen-2174, CJC-1008, dinorfina A, SI-6603, LAB GHRH, AER-002, BGC-728, vacuna contra la malaria (virosoas, PeviPRO), ALTU-135, vacuna contra el parvovirus B 19, vacuna contra la gripe (neuraminidasa recombinante), vacuna contra la malaria/HBV, vacuna contra el ántrax, Vacc-5q, Vacc-4x, Vacuna contra el VIH (oral), Vacuna contra HPV, toxoide Tat, YSPSL, CHS-13340, crema liposomal PTH (1-34) (Novasome), Ostabolin-C, análogo de PTH (tópico, psoriasis), MBRI-93.02, Vacuna MTB72F (tuberculosis), Vacuna MVA-Ag85 (tuberculosis), FAR-404, BA-210, vacuna recombinante contra la peste F1V, AG-702, OxSODro1, rBetV1, vacuna dirigida a los alérgenos Der-p1/Der-p2/Der-p7 (alergia a los ácaros del polvo), antígeno peptídico PR1 (leucemia), vacuna mutante ras, vacuna lipopeptídica HPV-16 E7, vacuna laberintica (adenocarcinoma), vacuna contra CML, vacuna contra el péptido WT1 (cáncer), IDD-5, CDX-110, Pentrys, Norelin, CytoFab, P-9808, VT-111, icrocaptide, telbermina (dermatológica, úlcera del pie diabético), rupintrivir, reticulosa, rGRF, P1A, alfa-galactosidasa A, ACE-011, ALTU-140, CGX-1160, vacuna terapéutica angiotensina, D-4F, ETC-642, APP-018, rhMBL, SCV-07 (oral, tuberculosis), DRF-7295, ABT-828, inmunotoxina específica de ErbB2 (anticáncer), DT388IL-3, TST-10088, PRO-1762, Combotox, péptidos de unión al receptor de gastrina/coleistocinina-B, 1 1 1ln-hEGF, AE-37, trastuzumab-DMI, antagonista G, IL-12 (recombinante), PM-02734, IMP-321, rhIGF-BP3, BLX-883, CUV-1647 (tópico), radioinmunoterapéuticos basados en L-19 (cáncer), Re-188-P-2045, AMG-386, vacuna DC/I540/KLH (cáncer), VX-001, AVE-9633, AC-9301, vacuna NY-ESO-I (péptidos), péptidos NA17.A2, vacuna contra el melanoma (antígeno pulsado terapéutico), vacuna contra el cáncer de próstata, CBP-501, lactoferrina humana recombinante (ojo seco), FX-06, AP-214, WAP-8294A2 (inyectable), ACP-HIP, SUN-11031, péptido YY [3-36] (obesidad, intranasal), FGLL,

atacept, BR3-Fc, BN-003, BA-058, hormona paratiroidea humana 1-34 (nasal, osteoporosis), F-18-CCR1, AT-1001 (enfermedad celiaca/diabetes), JPD-003, crema liposomal PTH(7-34) (Novasome), duramicina (oftálmica, ojo seco), CAB-2, CTCE-0214, eritropoyetina glicoPEGilada, EPO-Fc, CNTO-528, AMG-114, JR-013, Factor XIII, aminocandina, PN-951, 716155, SUN-E7001, TH-0318, BAY-73-7977, teverelix (liberación extendida), EP-51216, hGH (liberación controlada, Biosphere), OGP-I, sifuvirtida, TV-4710, ALG-889, Org-41259, rh-CCIO, F-991, timopentina (enfermedades pulmonares), r(m)CRP, insulina hepatoselectiva, subalin, proteína de fusión L 19-IL-2, elafin, NMK-150, ALTU-139, EN-122004, rhTPO, agonista del receptor de trombopoyetina (trastornos trombocitopénicos), AL-108, AL-208, antagonistas del factor de crecimiento nervioso (dolor), SLV-317, CGX-1007, INNO-105, teriparatida oral (eligen), GEM-OS1, AC-162352, PRX-302, vacuna de fusión LFn-p24 (Therapore), EP-1043, vacuna pediátrica de *S. pneumoniae*, vacuna contra la malaria, vacuna contra la *Neisseria meningitidis* Grupo B, vacuna estreptocócica neonatal del grupo B, vacuna contra el ántrax, vacuna HCV (gpE1 + gpE2 + MF-59), tratamiento de otitis media, vacuna HCV (antígeno del núcleo + ISCOMATRIX), hPTH (1-34) (transdérmica, ViaDerm), 768974, SYN-101, PGN-0052, aviscumina, BIM-23190, vacuna contra la tuberculosis, péptido tirosinasa multipeptido, vacuna contra el cáncer, enkastim, APC-8024, G1-5005, ACC-OO1, TTS-CD3, TNF de direccionamiento vascular (tumores sólidos), desmopresina (liberación controlada bucal), oncept, TP-9201.

Modificaciones adicionales

En determinadas realizaciones, los aglutinantes de seroalbúmina y sus fusiones pueden comprender además modificaciones postraduccionales. Las modificaciones postraduccionales de la proteína a modo de ejemplo incluye fosforilación, acetilación, metilación, ADP-ribosilación, ubiquitinación, glucosilación, carbonilación, sumoilación, biotilación o adición de una cadena lateral polipeptídica o de un grupo hidrófobo. Como resultado, los aglutinantes de seroalbúmina modificada y sus fusiones pueden contener elementos que no son aminoácidos, tales como lípidos, poli- o monosacárido y fosfatos. Una forma preferida de glucosilación es la sialilación, que conjuga una o más fracciones de ácido siálico con el polipéptido. Las fracciones de ácido siálico mejoran la solubilidad y la semivida en suero, al tiempo que también reducen la posible inmunogenicidad de la proteína. Véase, por ejemplo, Raju et al. *Biochemistry*. 31 de julio de 2001; 40(30):8868-76. Los efectos de dichos elementos no aminoácidos en la funcionalidad de los aglutinantes de seroalbúmina o sus fusiones pueden probarse para determinar su capacidad para unirse a una seroalbúmina particular (por ejemplo, HSA o RhSA) y/o el papel funcional conferido por una fracción específica no ¹⁰Fn3 en el contexto de una fusión.

F. Tecnología de fusión ácido nucleico-proteína

En un aspecto, la solicitud proporciona proteínas de armazón basadas en fibronectina que comprenden un dominio de tipo III de fibronectina que se une a HSA. Una forma de crear y probar rápidamente dominios Fn3 con propiedades de unión específicas es la tecnología de fusión de ácido nucleico-proteína de Adnexus, una compañía de Bristol-Myers Squibb. Dicha tecnología de expresión y marcado *in vitro*, denominada PROfusion, que explota las fusiones de ácido nucleico-proteína (fusiones de ARN y proteína-ADN) puede usarse para identificar nuevos polipéptidos y motivos de aminoácidos que son importantes para la unión a proteínas. La tecnología de fusión de ácido nucleico-proteína es una tecnología que acopla covalentemente una proteína a su información genética codificante. Para una descripción detallada de la tecnología de fusión ARN-proteína y los métodos de selección de la biblioteca de proteínas de armazón basados en fibronectina, véase Szostak et al., las Patentes de los Estados Unidos n.º: 6.258.558; 6.261.804; 6.214.553; 6.281.344; 6.207.446; 6.518.018; las publicaciones PCT N.º WO00/34784; WO01/64942; WO02/032925; y Roberts y Szostak, *Proc Natl. Acad. Sci.* 94: 12297-12302, 1997.

G. Realizaciones de vectores y polinucleótidos

También se incluyen en la presente divulgación las secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de las proteínas descritas en el presente documento. Como apreciarán los expertos en la técnica, debido a la degeneración de la tercera base, casi todos los aminoácidos pueden representarse por más de un codón triplete en una secuencia de nucleótidos codificante. Además, los cambios menores en el par de bases pueden dar como resultado una sustitución conservadora en la secuencia de aminoácidos codificada, pero no se espera que alteren sustancialmente la actividad biológica del producto génico. Por tanto, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína descrita en el presente documento puede modificarse ligeramente en secuencia y aún así codificar su producto génico respectivo. Determinados ácidos nucleicos a modo de ejemplo que codifican los aglutinantes de seroalbúmina y sus fusiones descritas en el presente documento incluyen ácidos nucleicos que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 126-151. La invención también abarca secuencias de ácido nucleico que son al menos el 50 %, tal como al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idénticas a las SEQ ID NO: 126-151, y preferentemente codifican una proteína que se une a la seroalbúmina, y para los ácidos nucleicos que codifican una adnectina PCSK9-PKE2 en tándem, que preferentemente se une a la seroalbúmina y PCSK9. En algunas realizaciones, las sustituciones de nucleótidos se introducen para no alterar la secuencia de aminoácidos traducida resultante.

Los ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las diversas proteínas o polipéptidos desvelados en el presente documento pueden sintetizarse químicamente. El uso del codón se puede seleccionar para mejorar la expresión en

una célula. Dicho uso de codón dependerá del tipo de célula seleccionada. Se han desarrollado patrones de uso de codones especializados para *E. coli* y otras bacterias, así como células de mamíferos, células vegetales, células de levadura o células de insectos. Véanse, por ejemplo: Mayfield et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 100(2):438-42; Sinclair et al. *Protein Expr Purif*. 2002 (1):96-105; Connell ND. *Curr Opin Biotechnol*. 2001 (5):446-9; Makrides et al. *Microbiol. Rev.* 1996 60(3):512-38; y Sharp et al. *Yeast*. 1991 7(7):657-78.

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

Las proteínas y proteínas de fusión descritas en el presente documento pueden producirse como una proteína de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que se reconoce y procesa (es decir, escindida por una señal peptidasa) por la célula hospedadora. Para las células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan una secuencia de señal nativa, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, 1 pp o líderes de enterotoxina II estable al calor. Para la secreción de levadura, la secuencia de señal nativa puede sustituirse por, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, un líder de factor (incluidos los líderes de factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o el líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en la publicación PCT n.º WO 90/13646). En la expresión en células de mamífero, se encuentran disponibles secuencias de señales de mamíferos así como líderes secretorios virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN para dichas regiones precursoras puede ligarse en el marco de lectura al ADN que codifica la proteína.

Los vectores de expresión utilizados en células hospedadoras eucariotas (por ejemplo, levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles a partir de las regiones 5' y, ocasionalmente 3', no traducidas de ADN o ADNc eucariota o vírico. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo multivalente. Un componente útil de terminación de la transcripción es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase la publicación PCT n.º WO 94/11026 y el vector de expresión desvelado en el presente documento.

El ADN recombinante también puede incluir cualquier tipo de secuencia de marcador proteico que pueda ser útil para purificar la proteína. Los ejemplos de marcadores de proteínas incluyen, pero sin limitación, un marcador de histidina, un marcador FLAG, un marcador myc, un marcador HA o un marcador GST. Los vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con huéspedes celulares de bacterias, hongos, levaduras y mamíferos se pueden encontrar en *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, (Elsevier, Nueva York, 1985).

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

Las células hospedadoras adecuadas incluyen procariotas, levaduras, células de mamífero o células bacterianas. Las bacterias adecuadas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo, *E. coli* o *Bacillus* spp. La levadura, preferentemente de la especie *Saccharomyces*, tal como *S. cerevisiae*, también puede usarse para la producción de polipéptidos. También se pueden emplear diversos sistemas de cultivo de células de mamíferos o insectos para expresar proteínas recombinantes. Luckow y Summers revisan los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos, (*Bio/Technology*, 6:47, 1988). En algún caso, se deseará producir proteínas en células de vertebrados, tal como para glucosilación, y la propagación de células de vertebrados en cultivos (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamíferos adecuadas incluyen células endoteliales, células de riñón de mono COS-7, CV-1, células L, C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionarias humanas, HeLa, 293, 293T y líneas celulares BHK. Para muchas solicitudes, el pequeño tamaño de los multimémeros de proteínas descritos en el presente documento convertiría a *E. coli* en el método preferido para la expresión.

H. Producción de proteínas

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos en el presente documento para la producción de proteínas y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las células hospedadoras usadas para producir las proteínas de armazón basadas en fibronectina o sus fusiones pueden cultivarse en varios medios. Los medios comercialmente disponibles tales como de F10 de Ham (Sigma), medio mínimo esencial ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma), medio Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), (Sigma)) son adecuados para el cultivo de las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; el documento WO90/03430; el documento WO87/00195; o la patente de Estados Unidos n.º Re. 30.985 pueden usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se pueden incluir cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que conocerían los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tal como la temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la materia.

Las proteínas de armazón basadas en fibronectina desveladas en el presente documento o sus fusiones también pueden producirse usando sistemas de traducción libres de células. Para dichos propósitos, los ácidos nucleicos que codifican la proteína de armazón basada en fibronectina deben modificarse para permitir la transcripción *in vitro* para producir ARNm y para permitir la traducción libre de células del ARNm en el sistema particular libre de células que se utiliza (eucariótico, como un sistema de traducción sin células de mamíferos o levadura, o procariótico, como un sistema de traducción sin células bacterianas).

Las proteínas de armazón basadas en fibronectina o sus fusiones también se pueden producir por síntesis química (por ejemplo, mediante métodos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Las modificaciones a la proteína de armazón basada en fibronectina también pueden producirse por síntesis química.

Las proteínas de armazón basadas en fibronectina desveladas en el presente documento o sus fusiones pueden purificarse mediante métodos de aislamiento/purificación para proteínas generalmente conocidos en el campo de la química de proteínas. Los ejemplos no limitantes incluyen extracción, recristalización, desestabilización salina (por ejemplo, con sulfato de amonio o sulfato de sodio), centrifugación, diálisis, ultrafiltración, cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de fase normal, cromatografía de fase inversa, filtración en gel, cromatografía de permeación en gel, cromatografía de afinidad, electroforesis, distribución a contracorriente o cualquier combinación de estas. Después de la purificación, las proteínas de armazón basadas en fibronectina pueden intercambiarse en diferentes tampones y/o concentrarse por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, filtración y diálisis.

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

I. Obtención de imágenes, diagnóstico y otras aplicaciones

Las fusiones de ¹⁰F_n3 de unión a seroalbúmina proporcionadas en el presente documento se pueden usar para tratar varias enfermedades y trastornos, basándose en la identidad de la molécula heterogénea fusionada al dominio ¹⁰F_n3 de unión a seroalbúmina. Las solicitudes para las fusiones ¹⁰F_n3 de unión a seroalbúmina pueden determinarse por el experto en la materia basándose en los conocimientos de la técnica y la información proporcionada en el presente documento. Los usos para diversas proteínas de fusión de ¹⁰F_n3 de unión a seroalbúmina se describen en detalle en el presente documento. Las fusiones de ¹⁰F_n3 de unión a seroalbúmina pueden administrarse a cualquier sujeto o paciente mamífero, incluidos organismos tanto humanos como no humanos.

Los aglutinantes de seroalbúmina y las moléculas de fusión descritas en el presente documento pueden marcarse de manera detectable y usarse para contactar con las células que expresan, por ejemplo, una proteína unida por la molécula de fusión para aplicaciones de imagen o de diagnóstico. Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugarse una proteína con la fracción detectable, incluidos los métodos descritos por Hunter, et al., Nature 144:945 (1962); David, et al., Biochemistry 13:1014 (1974); Pain, et al., J. Immunol. Meth. 40:219 (1981); y Nygren, J. Histochem. y Cytochem. 30:407 (1982).

En determinadas realizaciones, los aglutinantes de seroalbúmina y las moléculas de fusión descritas en el presente documento están además unidas a un marcador que puede detectarse (por ejemplo, el marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático). El marcador puede ser un agente radioactivo, tal como: metales pesados radiactivos tales como quelatos de hierro, quelatos radioactivos de gadolinio o manganeso, emisores de positrones de oxígeno, nitrógeno, hierro, carbono o galio, ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{132}I , o ^{99}Tc . En determinadas realizaciones, los marcadores pueden ser un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Se puede usar un aglutinante de seroalbúmina o una molécula de fusión fijada a dicha fracción como agente de formación de imágenes y se administra en una cantidad eficaz para el uso diagnóstico en un mamífero como un ser humano y luego se detecta la localización y acumulación del agente de formación de imágenes. La localización y acumulación del agente de imagen puede detectarse por medio de gammagrafía de radio, imágenes de resonancia magnética nuclear, tomografía computarizada o tomografía por emisión de positrones. Como será evidente para el experto en la técnica, la cantidad de radioisótopo a administrar depende del radioisótopo. Los expertos en la técnica pueden formular fácilmente la cantidad de agente de imagen para administrar basándose en la actividad específica y la energía de un radionúclido dado utilizado como la fracción activa.

Los aglutinantes de seroalbúmina y las moléculas de fusión también son útiles como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, las proteínas se inmovilizan sobre un soporte adecuado, como una resina o papel de filtro Sephadex, usando métodos bien conocidos en la técnica. Las proteínas pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)).

J. Caracterización biofísica y bioquímica

La unión de una adnectina de unión a seroalbúmina descrita en el presente documento a la seroalbúmina (por ejemplo, HSA) puede evaluarse en términos de constantes de equilibrio (por ejemplo, de disociación, K_D) y en términos de constantes cinéticas (por ejemplo, constante de asociación, k_{on} y constante de disociación, k_{off}). Una adnectina de unión a seroalbúmina (por ejemplo, una Adnectina en tándem o adnectina-mono-PKE2) generalmente se unirá a una molécula diana con una K_D de menos de 500 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 200 pM o 100 pM, aunque se pueden tolerar valores de K_D más altos cuando la k_{off} es suficientemente bajo o la k_{on} , es suficientemente alta.

Ensayos *in vitro* para la afinidad de unión

Una adnectina PKE2 que se une a seroalbúmina (por ejemplo, HSA) puede identificarse mediante diversos ensayos *in vitro*. En determinadas realizaciones, los ensayos son ensayos de alto rendimiento que permiten la detección simultánea de múltiples adnectinas candidatas.

Ensayos a modo de ejemplo para determinar la afinidad de unión de una adnectina a su diana incluyen, pero sin limitación, métodos en fase de solución tal como el ensayo de exclusión cinética (KinExA) (Blake et al., JBC 1996; 271:27677-85; Drake et al., Anal Biochem 2004; 328:35-43), resonancia de plasmón superficial (SPR) con el sistema Biacore (Uppsala, Suecia) (Welford et al., Opt. Quant. Elect 1991; 23:1; Morton y Myszka, Methods in Enzymology 1998; 295:268) y ensayos de fluorescencia de resolución homogénea de tiempo (HTRF) (Newton et al., J Biomol Screen 2008; 13:674-82; Patel et al., Assay Drug Dev Technol 2008; 6:55-68).

En determinadas realizaciones, las interacciones biomoleculares pueden monitorizarse en tiempo real con el sistema Biacore, que usa SPR para detectar cambios en el ángulo de resonancia de la luz en la superficie de una película delgada de oro sobre un soporte de vidrio debido a cambios en el índice de refracción de la superficie hasta 300 nm de distancia. El análisis Biacore (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2) genera constantes de velocidad de asociación, constantes de velocidad de disociación, constantes de equilibrio de disociación y constantes de afinidad. La afinidad de unión se obtiene mediante la evaluación de las constantes de velocidad de asociación y disociación utilizando un sistema de resonancia de plasmón de superficie Biacore (Biacore, Inc.). Se activa un chip biosensor para el acoplamiento covalente de la diana. La diana se diluye luego y se inyecta sobre el chip para obtener una señal en unidades de respuesta de material inmovilizado. Dado que la señal en unidades de resonancia (UR) es proporcional a la masa de material inmovilizado, esto representa un intervalo de densidades diana inmovilizadas en la matriz. Los datos de asociación y disociación se ajustan simultáneamente en un análisis global para resolver la expresión de velocidad neta para una interacción bimolecular 1:1, produciendo los mejores valores de ajuste para k_{on} , k_{off} y R_{max} (respuesta máxima a la saturación). Las constantes de equilibrio de disociación para la unión, las K_D , se calculan a partir de las mediciones de SPR como k_{off}/k_{on} .

Debe entenderse que los ensayos descritos anteriormente en el presente documento son a modo de ejemplo, y que cualquier método conocido en la técnica para determinar la afinidad de unión entre proteínas (por ejemplo, transferencia basada en fluorescencia (FRET), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y ensayos de unión competitiva (por ejemplo, radioinmunoensayos) se pueden usar para evaluar las afinidades de unión de las

Adnectinas PKE2 descritas en el presente documento.

En determinadas realizaciones, la temperatura de fusión (T_f) de la adnectina de unión a seroalbúmina descrita en el presente documento, de las proteínas de fusión que la comprenden, es al menos 50 °C, tal como al menos 51 °C, al menos 52 °C, al menos 53 °C, al menos 54 °C, al menos 55 °C, al menos 56 °C, al menos 57 °C, al menos 58 °C, al menos 59 °C, al menos 60 °C, al menos 61 °C, al menos 62 °C, al menos 63 °C, al menos 64 °C, al menos 65 °C, al menos 66 °C, al menos 67 °C, al menos 68 °C, al menos 69 °C, al menos 70 °C, al menos 71 °C, al menos 72 °C, al menos 73 °C, al menos 74 °C o al menos 75 °C, cuando se mide utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC) o fluorescencia térmica de barrido (TSF), por ejemplo, tal como se describe en los Ejemplos. En determinadas realizaciones, la temperatura de fusión (T_f) de la adnectina de unión a seroalbúmina descrita en el presente documento, o proteínas de fusión que la comprenden, es 50-75 °C, tal como 51-75 °C, 52-75 °C, 53-75 °C, 54-75 °C, 55-75 °C, 56-75 °C, 57-75 °C, 58-75 °C, 59-75 °C, 60-75 °C, 61-75 °C, 62-75 °C, 63-75 °C, 64-75 °C, 65-75 °C, 66-75 °C, 67-75 °C, 68-75 °C, 69-75 °C, 70-75 °C, 50-74 °C, 50-73 °C, 50-72 °C, 50-71 °C, 50-70 °C, 50-69 °C, 50-68 °C, 50-67 °C, 50-66 °C, 50-65 °C, 50-64 °C, 50-63 °C, 50-62 °C, 50-61 °C, 50-60 °C, 50-59 °C, 50-58 °C, 50-57 °C, 50-56 °C, 50-55 °C, 51-74 °C, 52-73 °C, 53-71 °C, 54-70 °C, o 55-65 °C, cuando se mide utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC) o fluorescencia térmica de barrido (TSF), por ejemplo, tal como se describe en los Ejemplos.

K. Usos Terapéuticos In Vivo

En el presente documento se proporcionan proteínas de armazón basadas en fibronectina que son útiles en el tratamiento de trastornos. En el caso de proteínas de fusión que comprenden una adnectina de unión a seroalbúmina, las enfermedades o trastornos que se pueden tratar estarán dictados por la especificidad de unión de la fracción, por ejemplo, una segunda adnectina, que está unida a la Adnectina. Como se describe en el presente documento, las proteínas de armazón basadas en fibronectina pueden diseñarse para unirse a cualquier diana de interés. En una realización, la diana es PCSK9. Las proteínas de armazón basadas en fibronectina que se unen a PCSK9 y las proteínas de fusión que las comprenden se pueden usar para tratar aterosclerosis, hipercolesterolemia y otras enfermedades relacionadas con el colesterol.

La solicitud también describe métodos para administrar las proteínas de armazón basadas en fibronectina a un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, las proteínas de armazón basadas en fibronectina son farmacéuticamente aceptables para un mamífero, en particular, un ser humano. Una composición "farmacéuticamente aceptable" se refiere a una composición que se administra a un animal sin consecuencias médicas adversas significativas. Los ejemplos de composiciones farmacéuticamente aceptables incluyen composiciones que comprenden dominios $^{10}\text{Fn3}$ que carecen del dominio de unión a integrina (RGD) y composiciones que están esencialmente libres de endotoxinas o pirógenos o tienen niveles muy bajos de endotoxinas o pirógenos.

L. Formulaciones y administración

La presente solicitud describe métodos para administrar una fracción terapéutica fusionada a un dominio $^{10}\text{Fn3}$ de unión a seroalbúmina, en donde la semivida de la fracción terapéutica se prolonga cuando se fusiona al dominio $^{10}\text{Fn3}$ de unión a seroalbúmina. Las técnicas y dosis para la administración de las construcciones de fusión variarán dependiendo del tipo de fracción terapéutica fusionada con el dominio $^{10}\text{Fn3}$ de unión a seroalbúmina y la afección específica que se está tratando, pero el experto en la materia puede determinarla fácilmente. En general, las agencias reguladoras requieren que un reactivo de proteína para ser utilizado como un agente terapéutico se formule para tener niveles aceptablemente bajos de pirógenos. Por consiguiente, las formulaciones terapéuticas generalmente se distinguirán de otras formulaciones en que están sustancialmente libres de pirógenos, o al menos no contienen más de niveles aceptables de pirógenos según lo determine la agencia reguladora apropiada (por ejemplo, la FDA). En determinadas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas de los dominios $^{10}\text{Fn3}$ de unión a seroalbúmina y sus moléculas de fusión comprenden, por ejemplo, ácido succínico 1-20 mM, sorbitol al 2-10 % y glicina al 1-10 % a pH 4,0-7,0. En una realización ilustrativa, las formulaciones farmacéuticas de los dominios $^{10}\text{Fn3}$ de unión a seroalbúmina y sus moléculas de fusión comprenden, por ejemplo, ácido succínico 10 mM, sorbitol al 8 % y glicina al 5 % a pH 6,0.

En algunas realizaciones, los dominios $^{10}\text{Fn3}$ de unión a seroalbúmina y sus fusiones son farmacéuticamente aceptables para un mamífero, en particular, un ser humano. Un polipéptido "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un polipéptido que se administra a un animal sin consecuencias médicas adversas significativas. Los ejemplos de dominio $^{10}\text{Fn3}$ de unión a seroalbúmina farmacéuticamente aceptable y sus fusiones incluyen dominios $^{10}\text{Fn3}$ que carecen del dominio de unión a integrina (RGD) y composiciones de dominios $^{10}\text{Fn3}$ de unión a seroalbúmina o fusiones de dominio $^{10}\text{Fn3}$ de unión a seroalbúmina que están esencialmente libres de endotoxina o tienen niveles de endotoxina muy bajos.

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en forma de dosis unitaria. La administración puede ser parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea), oral o tópica, como ejemplos no limitantes. La composición puede estar en forma de una píldora,

comprimido, cápsula, líquido, o comprimido de liberación sostenida para administración oral; un líquido para administración intravenosa, subcutánea o parenteral; o un gel, loción, ungüento, crema, o un polímero u otro vehículo de liberación sostenida para administración local.

- 5 Se encuentran métodos bien conocidos en la técnica para hacer formulaciones, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20ª ed., ed. A. R. Gennaro A R., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pa.). Las formulaciones para administración parenteral pueden, por ejemplo, contener excipientes, agua estéril, solución salina, polialquilen glicoles tales como polietilén glicol, aceites de origen vegetal o naftalenos hidrogenados. Se pueden usar polímeros de lactida biocompatibles y biodegradables, copolímeros de lactida/glicolida o
- 10 copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno para controlar la liberación de los compuestos. Las formulaciones de nanopartículas (por ejemplo, nanopartículas biodegradables, nanopartículas de lípidos sólidos, liposomas) se pueden usar para controlar la biodistribución de los compuestos. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas. La concentración del compuesto en la formulación varía dependiendo de varios
- 15 factores, incluida la dosis del fármaco a administrar y la ruta de administración.

El polipéptido puede administrarse opcionalmente como una sal farmacéuticamente aceptable, tal como sales de adición de ácido no tóxico o complejos metálicos que se usan comúnmente en la industria farmacéutica. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen ácidos orgánicos tales como ácidos acético, láctico, pamoico, maleico, cítrico, málico, ascórbico, succínico, benzoico, palmítico, subérico, salicílico, tartárico, metanosulfónico, toluensulfónicos o trifluoroacéticos o similares; ácidos poliméricos tales como ácido tánico, carboximetilcelulosa o similares; y ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, o similares. Los complejos metálicos incluyen zinc, hierro y similares. En un ejemplo, el polipéptido se formula en presencia de acetato de sodio para aumentar la estabilidad térmica.

25 Las formulaciones para su uso oral incluyen comprimidos que contienen el(los) principio(s) activo(s) en una mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o rellenos inertes (por ejemplo, sacarosa y sorbitol), agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de zinc, ácido esteárico, sílices, aceites vegetales hidrogenados o talco).

30 Las formulaciones para su uso oral también se pueden proporcionar como comprimidos masticables, o como cápsulas de gelatina dura en donde el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, o como cápsulas de gelatina blanda en donde el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso.

35 Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a una dosis que produce los efectos terapéuticos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del trastorno a tratar, y un experto en la técnica puede determinarlo utilizando técnicas conocidas. En general, los dominios ¹⁰Fn3 de unión a la seroalbúmina o la fusión de dominios ¹⁰Fn3 de unión a seroalbúmina se administran de aproximadamente 0,01 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg por día, preferentemente de 0,01 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg por día, lo más preferentemente 0,1 mg/kg a

40 aproximadamente 20 mg/kg por día. El polipéptido se puede administrar diariamente (por ejemplo, una vez, dos veces, tres veces o cuatro veces al día) o con menos frecuencia (por ejemplo, una vez cada dos días, una o dos veces por semana, una vez cada dos semanas o mensualmente). Además, tal como se conoce en la materia, los ajustes por edad y peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la interacción del fármaco y la gravedad de la enfermedad pueden ser necesarios, y será comprobable con

45 experimentación rutinaria por los expertos en la técnica.

La divulgación anterior describe en general la presente divulgación, que se ejemplifica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Estos ejemplos específicos se describen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de esta divulgación. Aunque los objetivos, términos y valores específicos se han empleado en el presente documento, dichos objetivos, términos y valores también se entenderán como a modo de ejemplo y no limitativos para el alcance de esta divulgación.

Ejemplos

55 **Producción de proteínas de alto rendimiento (HTPP)**

Los aglutinantes seleccionados clonados en el vector PET9d cadena arriba de un marcador HIS₆ y transformados en células BL21 DE3 plyS de *E. coli* se inocularon en 5 ml de medio LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina en un formato de 24 pocillos y se cultivaron a 37 °C durante la noche. Se prepararon nuevos cultivos de medio LB de 5 ml

60 (50 µg/ml de kanamicina) para la expresión inducible por aspiración de 200 µl del cultivo durante la noche y se dispensaron en el pocillo apropiado. Los cultivos se cultivaron a 37 °C hasta A₆₀₀ 0,6-0,9. Después de la inducción con isopropil-β-tiogalactósido (IPTG) 1 mM, el cultivo se expresó durante 6 horas a 30 °C y se recogió mediante centrifugación durante 10 minutos a 2750 g a 4 °C.

65 Los sedimentos celulares (en formato de 24 pocillos) se lisaron mediante resuspensión en 450 µl de tampón de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 0,5 M, 1x Complete™ Protease Inhibitor Cocktail-EDTA free (Roche), PMSF 1 mM, CHAPS

10 mM, imidazol 40 mM, lisozima 1 mg/ml, DNasa 30 µg/ml, aprotonina 2 µg/ml, pH 8,0) y se agitó a temperatura ambiente durante 1-3 horas. Los lisados se eliminaron y se volvieron a colocar en un formato de 96 pocillos mediante transferencia a un Unifiltro Whatman GF/D de 96 pocillos equipado con una placa de captura de 96 pocillos, 1,2 ml y se filtró mediante presión positiva. Los lisados eliminados se transfirieron a una placa de quelantes de níquel o cobalto de 96 pocillos que se había equilibrado con un tampón de equilibrio (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 40 mM, pH 8,0) y se incubaron durante 5 min. El material no unido se eliminó mediante presión positiva. La resina se lavó dos veces con 0,3 ml/pocillo con tampón de lavado n.º 1 (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 0,5 M, CHAPS 5 mM, imidazol 40 mM, pH 8,0). Cada lavado se eliminó mediante presión positiva. Antes de la elución, cada pocillo se lavó con 50 µl de tampón de elución (PBS + EDTA 20 mM), se incubó durante 5 minutos, y este lavado se descartó mediante presión positiva. La proteína se eluyó mediante la aplicación de 100 µl adicionales de tampón de elución a cada pocillo. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, la(s) placa(s) se centrifugaron durante 5 minutos a 200 g y la proteína eluida se recogió en placas de captura de 96 pocillos que contenían 5 µl de MgCl₂ 0,5 M añadidos al fondo de la placa de captura de elución antes de la elución. La proteína eluida se cuantificó utilizando un ensayo de proteína total con el dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre como el estándar de proteína.

Expresión y purificación a media escala de aglutinantes de proteínas de armazón basados en fibronectina insolubles

Para la expresión de clones insolubles, el clon o los clones, seguidos del marcador HIS₆, se clonan en un vector pET9d (EMD Bioscience, San Diego, CA) y se expresan en células HMS174 de E. coli. Se utilizan 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 cloranfenicol. El cultivo se cultiva a 37 °C hasta A₆₀₀ 0,6-1,0. Después de la inducción con isopropil-β-tiogalactósido (IPTG) 1 mM, el cultivo se cultiva durante 4 horas a 30 °C y se recoge mediante centrifugación durante 30 minutos a > 10.000 g a 4 °C. Los sedimentos celulares se congelan a -80 °C. El sedimento celular se resuspende en 25 ml de tampón de lisis (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 0,5 M, 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail-EDTA free (Roche), PMSF 1 mM, pH 7,4) utilizando un homogeneizador ULTRA-TURRAX® (IKA works) en hielo. La lisis celular se logra mediante homogenización a alta presión (> 18.000 psi) utilizando un MICROFLUIDIZADOR® Modelo M-1 10S (Microfluidics). La fracción insoluble se separa mediante centrifugación durante 30 minutos a 23.300 g a 4 °C. El sedimento insoluble recuperado de la centrifugación del lisado se lava con fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 mM, pH 7,4. El sedimento se resolubiliza en clorhidrato de guanidina 6,0 M en fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 mM, pH 7,4 con sonicación seguida de incubación a 37 grados durante 1-2 horas. El sedimento resolubilizado se filtra a 0,45 µm y se carga en una columna Histrap equilibrada con el fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 M/guanidina 6,0 M a pH 7,4. Tras la carga, la columna se lava 25 VC adicionales con el mismo tampón. La proteína unida se eluye con imidazol 50 mM en fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 mM/guan-HCl 6,0 M, pH 7,4. La proteína purificada se repliega mediante diálisis frente a acetato de sodio 50 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5.

Expresión y purificación a media escala de aglutinantes de proteínas de armazón basados en fibronectina solubles

Para la expresión de clones solubles, el clon o los clones, seguidos del marcador HIS₆, se clonaron en un vector pET9d (EMD Bioscience, San Diego, CA) y se expresaron en células HMS174 de E. coli. Se utilizaron 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 cloranfenicol. El cultivo se cultivó a 37 °C hasta A₆₀₀ 0,6-1,0. Después de la inducción con isopropil-β-tiogalactósido (IPTG) 1 mM, el cultivo se cultivó durante 4 horas a 30 °C y se recogió mediante centrifugación durante 30 minutos a > 10.000 g a 4 °C. Los sedimentos celulares se congelaron a -80 °C. El sedimento celular se resuspendió en 25 ml de tampón de lisis (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 0,5 M, 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail-EDTA free (Roche), PMSF 1 mM, pH 7,4) utilizando un homogeneizador ULTRATURRAX® (IKA works) en hielo. La lisis celular se logró mediante homogenización a alta presión (> 18.000 psi) utilizando un MICROFLUIDIZADOR® Modelo M-1 10S (Microfluidics). La fracción soluble se separó mediante centrifugación durante 30 minutos a 23.300 g a 4 °C. El sobrenadante se aclaró a través de un filtro de 0,45 µm. El lisado clarificado se cargó en una columna Histrap (GE) previamente equilibrada con fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 M, pH 7,4. La columna se lavó luego con 25 volúmenes de columna del mismo tampón, seguidos de 20 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 M/imidazol 25 mM, pH 7,4 y luego 35 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 M/imidazol 40 mM, pH 7,4. La proteína se eluyó con 15 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 M/imidazol 500 mM, pH 7,4, las fracciones se agruparon basándose en la absorbancia a A₂₈₀ y se dializaron frente a PBS 1x, Tris 50 mM, NaCl 150 mM; pH 8,5 o NaOAc 50 mM; NaCl 150 mM; pH 4,5. Cualquier precipitado se eliminó mediante filtración a 0,22 µm.

Ejemplo 1: Selección de aglutinantes basados en bucles del sur originales (bucles CD) de unión a la seroalbúmina

Con el fin de mejorar las adnectinas de unión a la seroalbúmina (SABA) de primera generación basadas en el polo norte que no se unieron a la seroalbúmina de ratón y rata, no tenían una alta afinidad por las seroalbúminas de todas las especies, y no siempre fueron compatibles en una plataforma multivalente basada en ¹⁰F_n3, las adnectinas de unión a la seroalbúmina del polo sur (Adnectinas PKE2) de segunda generación con secuencias de bucle CD

modificadas se seleccionaron como se describe a continuación.

Las bibliotecas de polipéptidos aglutinantes basados en bucles CD que comprenden un dominio ¹⁰Fn3 modificado se seleccionaron utilizando la presentación de ARNm (Xu et al., Chem Biol 2002; 9:933-42) para determinar la capacidad de unirse a la seroalbúmina humana (HSA). Los aglutinantes de bucles CD se diseñaron con longitudes de bucle CD variables de hasta +7 aminoácidos y el resto de la secuencia de ¹⁰Fn3 se mantuvo de forma silvestre. La unión a la diana se controló mediante qPCR y las poblaciones se clonaron y expresaron en E. coli cuando se observó una señal de unión específica.

Ejemplo 2: Identificación de aglutinantes de bucles CD capaces de unirse a HSA y que reaccionan de forma cruzada con Rh-SA y MSA

Se usó un formato ELISA de unión directa para identificar los aglutinantes de bucles CD que se generaron en el Ejemplo 1 y que se unieron a HSA y reaccionaron de forma cruzada con la seroalbúmina de macaco rhesus (Rh-SA) y/o la seroalbúmina murina (MSA). Las placas de ELISA MaxiSorp™ se recubrieron con 10 µg/ml de HSA, Rh-SA o MSA y los aglutinantes de bucles CD purificados se probaron a 1 µM. Las adnectinas unidas se detectaron a través de un AcM antihistidina conjugado con HRP (R&D Systems) y los reactivos de detección de TMB (BD Biosciences). Los resultados de ELISA se confirmaron utilizando Biacore como se describe a continuación. Los aglutinantes de bucles CD identificados en el experimento ELISA como reacción cruzada con Rh-SA y/o MSA (> 2X tratamiento base) se analizaron mediante SEC para la agregación con el fin de demostrar que la unión se debía a una especie monomérica, como se espera de una proteína estable, bien plegada. La estabilidad de la proteína se confirmó mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC) como se describe a continuación.

Uno de los clones identificados, en el presente documento denominado 2270_C01, tenía la siguiente secuencia de aminoácidos:

MASTSGVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGWQVQMYSDWGPLYIYKEF
TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SIN YRTEGDKPSQH HHHHHH
(2270_C01; SEQ ID NO: 23)

El bucle CD está subrayado. Los bucles AB, BC, DE, EF y FG tienen secuencias idénticas al dominio ¹⁰Fn3 humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). La cromatografía de exclusión por tamaño y los análisis de DSC se realizaron en 2270_C01 de mediana escala para confirmar la monomericidad y determinar la estabilidad térmica.

La cromatografía de exclusión de tamaño estándar (SEC) se realizó en 2270_C01, resultante del proceso de mediana escala. La SEC del material a mediana escala se realizó utilizando un Superdex 200 10/30 o en una columna Superdex 75 10/30 (GE Healthcare) en un sistema de HPLC Agilent 1100 o 1200 con detección de UV a A₂₁₄ nm y A₂₈₀ nm y con detección de fluorescencia (excitación = 280 nm, emisión = 350 nm). Se empleó un tampón de sulfato de sodio 100 mM, fosfato de sodio 150 mM, pH 6,8 a un caudal apropiado de la columna de SEC. Se usaron patrones de filtración en gel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) para la calibración del peso molecular. Como se muestra en la Tabla 2, 2270_C01 fue principalmente monomérico (98 % de monómero).

Se realizaron análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las adnectinas de mediana escala para determinar sus respectivas T_f. Se exploró una solución de 0,5 mg/ml en un calorímetro de barrido diferencial VP-capilar (GE Microcal) mediante el incremento de la temperatura de 15 °C a 110 °C a una velocidad de 1 grado por minuto a una presión de 70 p.s.i. Los datos se analizaron frente a una ejecución de control del tampón apropiado utilizando el mejor ajuste utilizando el programa Origin (OriginLab Corp). Como se muestra en la Tabla 2, 2270_C01 tenía una T_f de 64 °C.

Para determinar la cinética de la unión a seroalbúmina humana, de macaco rhesus y de ratón, así como si se mantuvo la unión a pH tanto fisiológicos como endosómicos, las seroalbúminas respectivas se inmovilizaron en un chip Biacore CM5 a una densidad superficial de ~1200RU utilizando el acoplamiento estándar NHS/EDC. Se aplicó un intervalo de concentración (0,25 nM - 5 µM) de 2270_C01 en tampones HBS-P+ (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, tensioactivo P-20 al 0,05 % v/v) o acetato (acetato de sodio 0,02 mM, pH 5,5, NaCl 0,15M, 0,05 % v/v de tensioactivo P-20) que se ejecuta a las albúminas inmovilizadas. Las mediciones cinéticas se llevaron a cabo utilizando una asociación de 3 minutos y una fase de disociación de 6 a 10 minutos. Los rastros cinéticos de los sensogramas restados de referencia se ajustaron a un modelo de unión 1:1 utilizando el programa Biaevaluation. Como se muestra en la Tabla 1, 2270_C01 se unió con afinidad equivalente a pH neutro y bajo a cada especie de albúmina, sin embargo, la afinidad por la albúmina de ratón fue aproximadamente 10 veces más débil que la de la unión a la albúmina humana o de macaco rhesus.

Tabla 1: 2270_C01 se une a MuSA con tasas de asociación ligeramente más rápidas y tasas de disociación significativamente más rápidas, en comparación con HuSA y RhSA a pH 7,4 y 5,5

Tampón	Unión a	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	Rmax (RU)
HBS-P, pH 7,4	HuSA	6,59E+04	3,68E-04	5,58	121,6
	RhSA	8,27E+04	5,77E-04	6,98	103,3
	MuSA	1,34E+05	9,09E-03	67,67	77,64
Acetato, pH 5,5	HuSA	1,02E+05	8,98E-04	8,82	111,9
	RhSA	5,96E+04	1,05E-03	17,55	85,5
	MuSA	7,59E+04	1,46E-02	~ 192,4	57,91

Para mejorar las propiedades de 2270_C01, es decir, la inmunogenicidad predicha *in silico*, la secuencia de 2270_C01 se sometió a optimización mediante visualización de ARNm. Las Adnectinas resultantes de esta optimización se denominan en el presente documento Adnectinas PKE2.

Ejemplo 3: Generación de adnectinas de progenie 2270_C01 con bucle CD adicional modificado: Adnectinas PKE2

La secuencia de 2270_C01 se sometió a optimización mediante visualización de ARNm utilizando bibliotecas diseñadas a medida para reducir el potencial de inmunogenicidad, y se analizó la unión a las seroalbúminas humanas y de ratón durante el

proceso de visualización de ARNm para obtener moléculas de progenie de inmunogenicidad más bajas que retuvieran la unión a albúmina de especies cruzadas. Las secuencias resultantes se evaluaron para determinar la inmunogenicidad pronosticada *in silico* y solo los clones que tenían una puntuación de inmunogenicidad *in silico* inferior al corte predeterminado avanzaron hacia la producción de proteínas mediante HTPP. Las Adnectinas resultantes se purificaron mediante HTPP y se seleccionaron mediante ELISA de unión directa y SEC-HPLC como se describió anteriormente.

De las 308 adnectinas PKE2 obtenidas en la selección de la progenie 2270_C01 y analizadas, las 25 siguientes fueron las moléculas con mejor rendimiento en términos de inmunogenicidad predicha *in silico*, monomericidad según lo determinado mediante la SEC y la unión a seroalbúmina de varias especies según lo determinado mediante ELISA de unión directa. Las determinaciones de afinidad de los principales candidatos se analizaron mediante SPR como se describe anteriormente.

SEQ ID	Adnectinas PKE2	Secuencia (con el bucle CD subrayado)
24	2629_A09	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDLGPLYIYTE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTSGESPASSKPI SIN YRTEIDKPSQHH HHHH
25	2629_A11	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGRHVHIYSDWGPMYIYTE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTSGESPASSKPI SIN YRTEIDKPSQHH HHHH
26	2629_C10	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSVLGPLYIYTE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTSGESPASSKPI SIN YRTEIDKPSQHH HHHH
27	2629_D09	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGREVQMYSDLGPLYVYSE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTSGESPASSKPI SIN YRTEIDKPSQHH HHHH
28	2629_E05	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGREVQKFSDWGPLYIYTE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTSGESPASSKPI SIN YRTEIDKPSQHH HHHH
29	2629_E06	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTSGESPASSKPI SIN YRTEIDKPSQHH HHHH
30	2629_F04	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGREVHQYSDWGPMYIYNE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTSGESPASSKPI SIN YRTEIDKPSQHH HHHH
31	2629_H01	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWDAPAVTVXYRITYGREVHKNSDWGTLIYITE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTSGEXPASSKPI SIN YRTEIDKXSQHH HHHH
32	2629_H06	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYAE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTSGESPASSKPI SIN YRTEIDKPSQHH HHHH

(continuación)

SEQ ID	Adnectinas PKE2	Secuencia (con el bucle CD subrayado)
33	2629_H07	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGREVHLYSDWGPMYIYTE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYITIVYAVTSGGESPASSKPI SIN YRTEIDKPSQHH HHHH
34	2630_A02	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGRHVQMYSDGLPLYIFSE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYITIVYAVTSGGESPASSKPI SIN YRTEIDKPSQHH HHHH
35	2630_A11	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGREVHMYSDFGPMYIYTE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYITIVYAVTSGGESPASSKPI SIN YRTEIDKPSQHH HHHH
36	2630_D02	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDWGPLYIYNE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYITIVYAVTSGGESPASSKPI SIN YRTEIDKPSQHH HHHH
37	2630_D10	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGREVQMYSDGLPLYIYNE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYITIVYAVTSGGESPASSKPI SIN YRTEIDKPSQHH HHHH
38	2630_F04	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGREVQMYSDGLPLYIYTE FTVPGSKSTATISGLKPGVGTYITIVYAVTSGGESPASSKPI SIN YRTEIDKPSQHH HHHH
39	2630_G03	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDGLPLYIYNE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYITIVYAVTSGGESPASSKPI SIN YRTEIDKPSQHH HHHH
40	2630_G10	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGREVQIYSDWGPLYIYNE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYITIVYAVTSGGESPASSKPI SIN YRTEIDKPSQHH HHHH
41	2630_H03	MGVSDVPRDLEVVAATXTSLLSWDAPAVTVXYRITYGREVQKYSDWGPLYIYQE FTVPGSXSTATISGLKPGVDYITIVYAVTSGGESPASSKPI SIN YRTEIDKXSQHH HHHH

(continuación)

SEQ ID	Adnectinas PKE2	Secuencia (con el bucle CD subrayado)
42	2631_B04	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLLISWDPAVTVRYRITYGRHVHLYSEFGPMYIYNE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIITVYAVTGSGESPASSKPIISINYRTEIDKPSQHH HHHH
43	2631_E03	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLLISWDPAVTVRYRITYGRDVHMYSDWGPMYIYQE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIITVYAVTGSGESPASSKPIISINYRTEIDKPSQHH HHHH
44	2631_G01	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLLISWDPAVTVRYRITYGRHVQIYSDWGPLYIYNE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIITVYAVTGSGESPASSKPIISINYRTEIDKPSQHH HHHH
45	2631_G03	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLLISWDPAVTVRYRITYGRYVQLYSDWGPMYIYTE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIITVYAVTGSGESPASSKPIISINYRTEIDKPSQHH HHHH
46	2631_H09	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLLISWDPAVTVRYRITYGRQVQVFSDLGPLYIYNE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIITVYAVTGSGESPASSKPIISINYRTEIDKPSQHH HHHH
47	2632_G01	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLLISWDPAVTVRYRITYGRQVQIYSDWGPLYIYNE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIITVYAVTGSGESPASSKPIISINYRTEIDKPSQHH HHHH
48	4079_A04	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLLISWDPAVTVRYRITYGRQVQMYSDWGPLYIAE FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIITVYAVTGSGESPASSKPIISINYRTEIDKPSQHH HHHH

Ejemplo 4: Propiedades biofísicas de las adnectinas PKE2

La cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) se realizó como se describió anteriormente en dos de las Adnectinas PKE2, 2629_E06 y 2630_D02, identificadas en la selección como bien comportadas en el Ejemplo 3. Como se muestra en la Tabla 2, ambas moléculas PKE2 eran en su mayoría monoméricas.

Se realizaron análisis de Calorimetría Diferencial de Escaneo (DSC) de las dos Adnectinas PKE2 para determinar sus T_f respectivas como se describió anteriormente. Como se muestra en la Tabla 2, 2629_E06 y 2630_D02 tenían T_f de 56 y 57 °C, respectivamente.

Tabla 2

Adnectina PKE2	Bucle de unión	SEC (% de monómero)	T_f (°C)
2270_C01	CD	98 %	64
2629_E06	CD	> 95 %	56
2630_D02	CD	> 95 %	57

Ejemplo 5: Caracterización de la unión de las adnectinas PKE2 a la seroalbúmina de varias especies

La cinética de la unión a las seroalbúminas por 2629_E06 y 2630_D02, así como la de una adnectina de unión a seroalbúmina basada en el polo norte de primera generación, 1318_H04, se determinó como se describió anteriormente. Además, la unión a la albúmina se llevó a cabo en diversas condiciones de pH que van desde pH 5,5 a pH 7,4. Ni 2629_E06 ni 2630_D02 mostraron una unión dependiente del pH a la seroalbúmina humana, de macaco rhesus o de ratón, lo que sugiere que mantendrían la unión en el endosoma. Como se muestra en la Tabla 3, 1318_H04 tenía menor afinidad por la seroalbúmina humana, de macaco cynomolgus y de macaco rhesus en relación con 2629_E06 y 2630_D02, y además no se unió a la seroalbúmina de ratón o rata. Además, 1318_H04 mostró una afinidad 10 veces más débil por la seroalbúmina de macaco rhesus en relación con la seroalbúmina humana, mientras que las adnectinas PKE2 para diferentes especies de albúmina fueron relativamente equivalentes.

Ambas adnectinas PKE2, 2629_E06 y 2630_D02, mostraron una afinidad sustancialmente mayor para todas las seroalbúminas analizadas en relación con 1318_H04, tal como se ha tratado anteriormente, con una K_D para seroalbúmina humano, de macaco cynomolgus, de macaco cynomolgus, de macaco rhesus y de ratón en el intervalo nanomolar bajo. 2629_E06 también mostró una K_D para la seroalbúmina de rata en el intervalo nanomolar bajo, y 2630_D02 exhibió una K_D para la seroalbúmina de rata de 200 nM.

Tabla 3

Adnectina	Ligando	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	R_{max} (UR)
SABA 1318_H04 basada en polo norte	HSA (n = 4)	1.10E+04	1.58E-03	156 ± 72	87,0
	cynoSA (n = 3)	7.15E+03	2.53E-02	4170 ± 2530°	76,2
	RhSA	7.04E+03	2.64E-02	4220 ± 2110°	84,0
	MSA		sin unión significativa		
	SA de rata		sin unión significativa		
Adnectina PKE2 2629_E06	HSA (n = 5)	6.10E+04	1.85E-04	3,2 ± 1,6	112,7
	cynoSA (n = 3)	7.37E+04	2.29E-04	4,2 ± 1,5	106,8
	RhSA (n = 4)	7.39E+04	2.40E-04	4,4 ± 1,8	99,4
	MSA (n = 2)	2.19E+05	5.31E-04	2,4 ± 0,4	105,4
	SA de rata (n = 2)	9.97E+04	1.26E-03	12,8 ± 2,2	89,5

(continuación)

Adnectina	Ligando	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	Rmax (UR)
Adnectina PKE2 2630_D02	HSA (n = 4)	1.67E+05	1.62E-04	1,0 ± 0,4	123,2
	cynoSA (n = 3)	2.08E+05	3.35E-04	1,6 ± 0,7	113,1
	RhSA (n = 3)	2.07E+05	3.62E-04	1,8 ± 0,8	107,4
	MSA	6.78E+05	9.20E-03	14,0	99,2
	SA de rata	1.50E+05	2.99E-02	200	89,3

Ejemplo 6: Competencia de adnectinas PKE2 con hFcRn para unión a HSA

5 Dado que la inhibición de la unión de HSA al receptor hFcRn evitaría el reciclado de HSA a través de hFcRn y reduciría la larga semivida de HSA, lo que reduciría potencialmente la magnitud de la mejora farmacocinética, el nivel de competencia con hFcRn para la unión a HSA se probó para las adnectinas PKE2 utilizando una selección alfa competitiva, que se muestra en la Figura 1. Las adnectinas se diluyeron en serie en un tampón de ensayo (acetato 50 mM/NaCl 150 mM/Tween-20 al 0,1 %, pH 5,5 + antiespumante-204 al 0,005 %) para obtener el intervalo de concentración de ensayo final deseado. Se preparó una mezcla maestra de proteínas y perlas alfascreen en un tampón de ensayo para obtener concentraciones de ensayo finales de hFcRn-GST (BMS) 6,5 nM, seroalbúmina humana biotinilada 30 nM (Abcam) y 5 µg/ml de perlas donadora de estreptavidina Alphascreen y perlas aceptoras de glutatión AlphaLISA (Perkin Elemer). Se añadieron 10 µl/pocillo de adnectina diluida en serie, seguido de 10 µl/pocillo de proteínas + solución de perlas a una placa de ensayo de pequeño volumen de 384 pocillos (Greiner Bio-one). Las esferas alfascreen y todas las transferencias a la placa de ensayo se protegieron de la luz ambiente. La placa de ensayo se selló con un sello de lámina adhesiva y se incubó durante 2-2,5 h con agitación a temperatura ambiente. La placa se leyó en un lector Synergy 4 (Biotek) con excitación a 570 nm y emisión a 680 nm. La señal promedio de los pocillos de control sin Adnectina se estableció como inhibición del 0 % y el porcentaje de inhibición de la interacción FcRn-HSA se calculó con relación a esa señal; la señal de fondo promedio de los pozos de control sin HSA biotinilada se restó de todos los puntos de datos.

La Tabla 4 y la Figura 2 muestran los resultados de la selección. De forma destacable, 1318_H04 compitió más fuertemente con hFcRn por la unión a HSA que la adnectina original de segunda generación 2270_C01 y las Adnectinas PKE2 2629_E06 y 2630_D02, lo que sugiere que las adnectinas PKE2 pueden proporcionar una mejora mejorada de PK en relación con 1318_H04.

Además, los dominios en HSA unidos por 1318_H04, 2629_E06 y 2630_D02 se determinaron por SPR. Como se muestra en la Tabla 4, la Adnectina 1318_H04 se unió al dominio I de HSA, y 2270_C01, 2629_E06, y 2630_D02 se unieron al dominio I-II de HSA pero no al dominio I solo, lo que sugiere que 1318_H04 y las adnectinas PKE2 se unen a epítomos distintos en HSA. Ninguna de las Adnectinas en la Tabla 4 se unió al dominio III de HSA, cuyo dominio es un sitio de interacción importante de HSA con FcRn.

Tabla 4

Adnectina	CI50 (nM) de la competencia hFcRn:HSA	Dominio de unión a HuSA de SPR
1318_H04	8,0	I
2270_C01	37,0	I-II
2629_E06	*	I-II
2630_D02	28,7	I-II
HuSA	2d41	
Dominio III de HuSA	>10 µM	

* la respuesta a la dosis no saturó hasta 2 µM, aunque el porcentaje de inhibición (es decir, la inhibición de la unión de hFcRn a HSA) fue de aproximadamente el 80 %

Ejemplo 7: Semivida en vivo de las adnectinas PKE2 candidatas

Las Adnectinas PKE2 2629_E06 y 2630_D02 se prepararon, se purificaron y se eliminó la endotoxina. Se inyectaron

ratones de tipo silvestre (n = 3/grupo) con 2629_E06 o 2630_D02 a 1 mg/kg en la vena de la cola, y se determinó la concentración en muestras de sangre a intervalos posteriores a la inyección utilizando un ensayo cuantitativo basado en ELISA que se desarrolló para detectar la adnectina en muestras de plasma. Específicamente, los niveles de fármaco de adnectina se midieron en plasma de ratón utilizando la plataforma de tecnología Mesoscale o los ELISA colorimétricos estándar. 2629_E06 y 2630_D02 se capturaron a través de un AcM anti-His (BMS) y se detectaron usando un anti-suero de conejo dirigido contra el armazón de adnectina en combinación con un AcP conjugado de HRP de cabra anti-conejo. Como alternativa, se detectaron a través de albúmina específica de la especie unida a la Adnectina y un AcP secundario específico de la especie anti-albúmina marcado con sulfo. Los parámetros farmacocinéticos de cada adnectina se determinaron utilizando modelos no compartimentales con el programa Phoenix WinNonlin.

Los perfiles farmacocinéticos de 2629_E06 y 2630_D02 se compararon como se muestra en la Figura 3 y la Tabla 5. La semivida de 2629_E06 en plasma de ratones fue de 33 a 41 horas, mientras que la semivida de 2630_D02 fue de 35 a 39 horas.

Tabla 5.

Adnectina	T1/2 (h)	Cl_obs (ml/h/kg)	Vz_obs (ml/kg)	AUCall (h*nmol/l)	MRTINF_pred (h)
2629_E06	36,5 ± 3,9	6,0	318	13150	45,8
2630_D02	37,6 ± 2,4	4,5	243	17318	51,2

Ejemplo 8: Inmunogenicidad de las adnectinas PKE2

La predicción *in silico* de la unión de HLA se evaluó utilizando el programa Epimatrix (Epivax). Se muestra una comparación de las puntuaciones en la Tabla 6. Las Adnectinas PKE2 2629_E06 y 2630_D09 mostraron puntuaciones *in silico* reducidas en relación con 2270_C01. De manera adicional, la proliferación *in vitro* de linfocitos T CD4+ en respuesta a 1318_H04, 2270_C01 y las adnectinas PKE2 se evaluó como una evaluación *ex vivo* de la potencial inmunogenicidad humana. El método de gradiente de densidad Ficoll se usó para aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre completa obtenida de 40 donantes independientes que eran MHC Clase II adaptados a la población general. Las células de cada donante se almacenaron en N2 líquido después del aislamiento y se descongelaron antes de usar. Las células de cada donante se marcaron con el colorante fluorescente carboxifluoresceína éster succinimidílico (CFSE) y se incubaron con las adnectinas de interés durante 7 días a 37 °C. Los linfocitos T se marcaron con un anticuerpo anti CD4 y la proliferación se evaluó mediante citometría de flujo utilizando el programa de análisis BD FACS Canto y FlowJo. La antigenicidad de una proteína se calculó como el porcentaje de donantes que mostró un aumento significativo en la proliferación de CD4+.

Las comparaciones de 2270_C01 original y sus dos progenies 2629_E06 o 2630_D02 revelaron que la molécula original tenía mayor antigenicidad (Figura 4 y Tabla 6), lo que sugiere que las dos adnectinas PKE2 de progenie muestran un potencial de inmunogenicidad reducido respecto a la molécula original.

Tabla 6.

<u>Adnectinas</u>	<u>Porcentaje de antigenicidad</u>	<u>Presentación de la respuesta (promedio de respuestas posteriores)</u>	<u>Índice de respuesta</u>	<u>Puntuación de epimatriz del bucle CD</u>	<u>Secuencia de bucle CD</u>
1381_H04	0,08	5,23	0,39		
2270_C01	0,73	6,82	4,95	1,71	WQVQMYS DWGPLYIK
2629_E06	0,16	4,04	0,64	-5,63	REVQKYS DLGPLYIQ
2630_D02	0,26	4,16	1,10	-5,98	REVQKYS DWGPLYIN

Ejemplo 9: Efectos de los mutantes de cisteína individuales de las adnectinas PKE2 en la unión a la albúmina

Se incorporaron restos de cisteína individuales en sitios distintos de los restos de unión a HSA de las Adnectinas PKE-2 para permitir la conjugación química a moléculas terapéuticas de interés mediante la química de maleimida estándar. Fue importante mantener la unión a la seroalbúmina (y, por lo tanto, el aumento de la PK) en el contexto de una mutación de cisteína, por lo tanto, se probaron los efectos de estas mutaciones en la unión a la seroalbúmina de varias especies, utilizando la molécula 2629_E06 como base para la mutación. La tasa de disociación (k_{off}) de cada uno de los mutantes se analizó mediante un ensayo basado en SPR, con albúminas inmovilizadas y Adnectinas utilizadas como analitos a 250 nM. Como se muestra en la Tabla 7, la introducción de mutaciones de cisteína individuales en 2629_E06 mostró tasas de disociación similares de las seroalbúminas a través de varias especies como la molécula 2629_E06 original, lo que indica que la unión a la seroalbúmina se mantiene en el contexto de estas mutaciones específicas. Por tanto, uno cualquiera de estos mutantes de cisteína podría servir como un compañero de conjugación química para moléculas terapéuticas de interés y proporcionar un mejoramiento de PK.

Tabla 7.

Descripción	Adnectina	Tasa de disociación de HSA (s^{-1})	Tasa de disociación de RhSA (s^{-1})	Tasa de disociación de MSA (s^{-1})	Tasa de disociación de RatSA (s^{-1})
PKE_2-NYRTEIDKPSQH6	2629_E06*	1.69E-04	2.19E-04	4.01E-04	7.67E-04
2629_E06-NYRTPCH6	5916_E03.PS5-2	2.11E-04	2.72E-04	4.52E-04	7.86E-04
2629_E06-NYRTPEDDGCH6	5916_A04.PS5-2	1.48E-04	1.72E-04	3.07E-04	5.47E-04
MGCSTSGVSD-2629_E06-NYRTPH6	5963_A02.PS5-2	2.53E-04	3.13E-04	4.92E-04	9.02E-04
2629_E06(S55C)-NYRTPH6	5963_C03.PS5-2	2.29E-04	3.03E-04	4.63E-04	7.89E-04
2629_E06(A12C)-N YRTPH6	5963_D01.PS5-2	2.47E-04	3.13E-04	4.99E-04	8.58E-04
2629_E06(T58C)-NYRTPH6	5963_E01.PS5-2	2.50E-04	3.13E-04	5.07E-04	8.48E-04
2629_E06(T56C)-NYRTPH6	5963_E02.PS5-2	2.28E-04	2.84E-04	4.61E-04	7.60E-04
2629_E06(A26C)-N YRTPH6	5963_F03.PS5-2	2.51E-04	3.12E-04	5.04E-04	8.25E-04

Ejemplo 10: Propiedades biofísicas de mutantes de cisteína individuales de 2629_E06

Las propiedades biofísicas de los mutantes de cisteína individuales descritos en el Ejemplo 9 se evaluaron y se muestran en la Tabla 8. Cada mutante produjo una proteína monomérica y térmicamente estable.

Tabla 8.

Mutante	Tampón	Conc. (mg/ml)	Proteína Disponible (mg)	SEC	ASSA (M)	DSC (°C @ 0,5 mg/ml)
2629_E06 (A26C)-NYRTPH6	PBS	2,3	4,1	> 99 % monómero	1,72	65,5
2629_E06-NYRTPCH6	PBS	2,6	4,7	> 99 % monómero	1,77	67,2
2629_E06 (T56C)-NYRTPH6	PBS	2,7	4,8	> 99 % monómero	1,72	68,3
2629_E06 (T58C)-NYRTPH6	PBS	2,4	4,3	> 99 % monómero	1,72	68,7
2629_E06 (A12C)-NYRTPH6	PBS	2,8	5,1	> 99 % monómero	1,70	68,2

(continuación)

Mutante	Tampón	Conc. (mg/ml)	Proteína Disponible (mg)	SEC	ASSA (M)	DSC (°C @ 0,5 mg/ml)
2629_E06 (S55C)-NYRTPH6	PBS	2,4	4,2	> 99 % monómero	1,75	69,4
2629_E06-NYRTPEDGCH6	PBS	0,7	1,3	> 90 % monómero	1,73	70,5
MGCSTSGVSD-2629_E06-NYRTPH6	PBS	1,6	2,8	> 90 % monómero	1,71	67,8

Ejemplo 11: Modularidad de la molécula en tándem de Adnectina PKE2

- 5 Una de las limitaciones de las adnectinas de unión a la seroalbúmina del polo norte fue la falta de compatibilidad para su uso en tándem con otras proteínas ¹⁰F_n3. Por tanto, se exploró la compatibilidad de las adnectinas PKE2 con otras proteínas ¹⁰F_n3. El comportamiento biofísico de las adnectinas PKE2 se probó cuando se fusionó en tándem con una adnectina específica para una diana diferente. Las adnectinas PKE2 se probaron en ambas configuraciones posibles: en la ubicación N terminal (PKE2-X) y la ubicación C terminal (X-PKE2). El comportamiento de la cromatografía de exclusión de tamaño se probó utilizando moléculas obtenidas usando el método HTPP. Las fusiones con la adnectina 1318_H04 basada en el polo norte de primera generación se compararon directamente a las fusiones con las adnectinas PKE2 2629_E06 y 2630_D02. Las parejas de fusión probadas incluyeron un dominio ¹⁰F_n3 de unión a miostatina (2987_H07; véase el documento WO2014/043344), dos dominios ¹⁰F_n3 de unión PCSK9 (2013_E01 y 2382_D09), y un dominio ¹⁰F_n3 de unión a EGFR (1312_E01). Las secuencias de Adnectinas PCSK9 2382_D09 y 2013_E01 se pueden encontrar en el documento WO2011/130354. Como se muestra en la Tabla 9, ambas moléculas de adnectinas PKE2 conservaron consistentemente un buen comportamiento biofísico, como se refleja en la proporción de moléculas con una calificación de SEC de A (es decir, que corresponde a ≥ 90 % de adnectinas monoméricas), en relación con la molécula SABA 1318_H04 basada en polo norte, en el contexto de una Adnectina en tándem. PKE en la tabla se refiere a un dominio ¹⁰F_n3 de unión a la seroalbúmina (es decir, el dominio ¹⁰F_n3 que potencia PK). Las relaciones representan el número de clones con SEC = A/número total de clones analizados. Los tándems que no se generaron se indican como "-".

Tabla 9.

% de PKE en tándems con SEC = A									
Adnectina		2987_H07 (Myo)		2013_E01 (PCSK9)		1312_E01 (EGFR)		2382_D09 (PCSK9)	
Orientación		X-PKE	PKE-X	X-PKE	PKE-X	X-PKE	PKE-X	X-PKE	PKE-X
PKE	1318_H04	31 (8/26)	0 (0/26)	31 (8/26)	-	-	-	8 (8/26)	-
	2629_E06	30 (3/10)	80 (8/10)	90 (9/10)	80 (8/10)	70 (7/10)	70 (7/10)	58 (51/88)	-
	2630_D02	20 (2/10)	60 (6/10)	50 (5/10)	80 (8/10)	70 (7/10)	70 (7/10)	-	-

- 25 Los datos en la Figura 5 reproducen los datos en la Tabla 9 para el dominio ¹⁰F_n3 de unión a miostatina 2987_H07 y el dominio ¹⁰F_n3 de unión a PCSK9 2013_E01, con la excepción de que los distintos tonos de gris reflejan la capacidad de las moléculas en tándem para unirse aún a HSA según se determina en el ensayo ELISA de unión directa descrito anteriormente. Los diferentes tonos de gris en la Figura 5 corresponden a diferentes proporciones de CE₅₀ de Adnectina en tándem/CE₅₀ de monoAdnectina para la unión a HSA, con tonos más oscuros que representan una unión más fuerte de las moléculas en tándem a HSA. Los datos en la Figura 5 muestran que las moléculas en tándem basadas en PKE2 tenían mejor monomericidad (es decir, menos propensas a la dimerización y agregación) y la unión a HSA (es decir, perdió menos unión a HSA y RhSA) en relación con la adnectina 1318_H04. Se observaron patrones similares con cuatro adnectinas adicionales de unión a la diana. Estos datos indican que las Adnectinas PKE2 proporcionan un compañero de unión más estable y activo para otras proteínas ¹⁰F_n3 que las Adnectinas de unión a la seroalbúmina del polo norte.

Ejemplo 12: las moléculas en tándem PCSK9-PKE2 exhiben buena potencia en los ensayos bioquímicos de PCSK9, bajas puntuaciones de EpiMatrix, buenas propiedades biofísicas y unión de albúmina entre especies

- 40 Se produjeron varias adnectinas en tándem PCSK9-PKE2 basadas en la adnectina PKE2 2629_E06 y la adnectina PCSK9 2382_D09, tal como se muestra en la Tabla 10. Cada una de las moléculas en tándem difiere solo por el enlazador, y todas se analizaron por sus propiedades biofísicas y funcionales para asegurar la retención de actividades tanto de la PKE2 de unión a la albúmina como de la Adnectina de unión a PCSK9. La unión a la albúmina de especies cruzadas se determinó utilizando el método ELISA descrito anteriormente. La estabilidad

térmica relativa se evaluó mediante Fluorescencia de barrido térmico (TSF). Las muestras de HTPP se normalizaron a 0,2 mg/ml en PBS. Se añadió 1 µl de tinte naranja Sypro diluido 1:40 con PBS a 25 µl de cada muestra y la placa se selló con un sellado adhesivo de microplaca transparente de 96 pocillos. Las muestras se analizaron utilizando una máquina BioRad RT-PCR mediante el aumento de la temperatura de 25 °C a 95 °C, a una velocidad de 2
5 grados por minuto. Los datos se analizaron utilizando el programa BioRad CFX manager 2.0. Se ha demostrado que los valores obtenidos mediante TSF se correlacionan bien con los valores de Tf obtenidos mediante DSC en un intervalo de fusión de 40 °C a 70 °C. Esto se considera el intervalo de trabajo aceptable para esta técnica. Se obtiene un resultado de SD ("Sin datos") cuando la pendiente de la curva de transición es demasiado pequeña para permitir que su máximo derivado (la tasa de cambio en la fluorescencia con el tiempo) se distinga del ruido.

10 El ensayo PCSK9: EGFA FRET midió la inhibición de la unión de PCSK9 al dominio de homología del precursor del factor de crecimiento epidérmico (LDFA) del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), utilizando PCSK9 humano recombinante expresado en baculovirus y un péptido EGFA sintético de 40-mer (biotinilado). Se ha demostrado que EGFA representa el dominio de interacción clave de LDLR con PCSK9 (Kwon, H.J. et al., Proc.
15 Natl. Acad. Sci. USA, 105(6): 1820-1825 (2008)). Este ensayo utilizó un AcM de unión al dominio C-terminal de PCSK9 (AcM 4H5) marcado con Eu-quelato para proporcionar la interacción de FRET con EGFA biotinilado a través del complejo de fluoróforo estreptavidina/aloficocianina. El ensayo PCSK9-LDLR FRET se realizó de manera similar utilizando el dominio extracelular de LDLR en lugar del péptido EGFA.

20 Todas las moléculas en tándem tenían una baja inmunogenicidad (puntuación de Epimatrix negativa), una alta monomericidad (según lo evaluado por SEC), una estabilidad térmica relativa aceptable (TSF) y una unión favorable a la albúmina de especies cruzadas mediante un ensayo ELISA. Además, las adnectinas en tándem PCSK9-PKE2 conservaron una buena potencia en los ensayos bioquímicos PCSK9 con Cl_{50} similares a la adnectina 2382_D09 sin
25 formatear.

Tabla 10.

Tándem PCSK9-PKE2	Enlazador	Epimatrix	Conc (µg/ml)	SEC	TSF	CE50 (nM) de HuSA	CE50 (nM) de RhSA	CE50 (nM) de MuSA	EGFAFRET 1 (CI50, nM)	EGFAFRET 2 (CI50, nM)	PCSK9: LDLR FRET (CI50, nM)
4472_E09	A	-12,3	3490	A	58,5	23,8	19,8	7,0	5,81	4,81	1,3
4472_A11	B	-21,2	4530	A	61	26,9	15,7	3,9	6,13	3,76	1,4
4472_H09	C	-10,2	2410	A	62,5	27,8	26,8	4,0	9,66	7,17	3
4472_F04	D	-18,8	3410	A	60,5	40,3	27,8	3,8	3,99	4,18	1,2
4472_C08	E	-14,4	2880	A	60	40,4	25,7	4,8	9,38	5,09	1,9
4472_F08	F	-13,0	5050	A	61	55,4	35,2	7,3	7,88	5,88	2,5
4472_F06	G	NA	4450	A	61	58,9	40,8	11,3	4,50	3,42	1,1
4472_G10	H	-15,7	1694	A	61	61,3	48,3	10,0	7,81	6,81	2,4
4472_E06	I	-15,4	4810	A	60	67,3	40,1	4,2	7,67	5,68	1,6
4472_B10	J	-5,4	1299	A	59,5	67,7	38,9	10,9	9,69	6,97	2,2
4472_B09	K	-3,4	2230	A	59,5	69,2	45,1	9,8	9,36	6,95	2,4
4472_B11	L	-11,5	835	A	59,0	70,1	54,0	13,5	6,54	5,03	2
4472_A06	M	-7,0	3720	A	58	77,8	44,4	8,6	9,06	2,72	1,6
4472_D08	N	-13,1	4140	A	60	80,2	54,1	9,5	6,32	5,22	1,7
4472_B05	O	-6,2	639	A	57,5	85,1	59,5	9,3	6,66	5,55	1,9
4472_H11	P	-1,7	1099	A	nd	85,3	58,1	13,2	8,76	6,24	1,3
4472_E04	Q	-5,6	1244	A	60,5	100,9	64,8	8,9	9,45	7,54	2
4472_E05	R	-2,5	933***	A	54,5	102,2	63,1	13,1	5,66	4,35	1,5
4472_B03	S	-7,9	1239	A	59	123,5	98,2	14,8	7,45	4,83	1,4
4472_D06	T	-17,7	2850	A	61,5	139,2	93,1	15,6	8,12	6,51	1,8
4472_A04	u	-6,6	1142	A	nd	143,7	84,0	16,7	5,14	4,44	1,1

(continuación)

Tándem	Enlazador	Epimatrix	Conc (µg/ml)	SEC	TSF	CE50 (nM) de HuSA	CE50 (nM) de RhSA	CE50 (nM) de MuSA	EGFAFRET 1 (CI50, nM)	EGFAFRET 2 (CI50, nM)	PCSK9: LDLR FRET (CI50, nM)
4472_C06	PSTPPTSPST PPTSPS	-19,6	6760	A	61	184,3	131,1	15,6	9,18	3,09	1,4
ADX_2382_D09	n/a				83 (DSC)	n/a	n/a	n/a	19,70	10,6	2,3
ADX_2629_E06	n/a				56 (DSC)	14,5	10,5	2,8	n/a	n/a	n/a

Ejemplo 13: Cinética de unión de las moléculas en tándem PCSK9-PKE2 a PCSK9 humano

La unión de adnectina en tándem PCSK9-PKE2 a PCSK9 humano inmovilizado se midió en presencia o ausencia de HSA mediante interferometría de biocapa (Octet Red 96, utilizando puntas de sensores Superstreptavidin, ForteBio, Menlo Park CA). Los eventos de asociación y disociación se capturaron en tiempo real para una serie de concentraciones de adnectina con PCSK9 biotinilado de longitud completa capturado en las puntas de los sensores. Las curvas de unión se ajustaron globalmente para producir valores para K_D , k_{on} , y k_{off} .

Los complejos de Adnectina-HSA en tándem se formaron previamente mediante la incubación del tándem en exceso y la ejecución del análisis de unión en presencia de HSA en exceso. Se consideró que se había formado un complejo entre los complejos de Adnectina-HSA en tándem con PCSK9 humano cuando había un aumento de masa aparente para las Adnectinas en tándem en presencia de HSA en la misma concentración (véase, por ejemplo, la Figura 6). Como se muestra en la Tabla 11, todas las moléculas PCSK9-PKE2 en tándem analizadas tenían una cinética y potencias de unión similares para PCSK9. Se observó una ligera reducción de la asociación y una disociación algo más rápida para la unión del complejo HSA-Adnectina a huPCSK9.

Tabla 11.

Tabla de datos de la unión de Adnectina PCSK9:PKE2						
	sin HSA			+HSA		
	K_D (nM)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)
4472_F08	0,404	2.89E+05	1.18E-04	0,902	1.61E+05	1.48E-04
4472_E06	0,724	2.81E+05	2.00E-04	1,003	2.07E+05	2.09E-04
4472_C06	0,515	3.36E+05	1.68E-04	1,547	1.97E+05	3.05E-04

Ejemplo 14: Caracterización de la unión de moléculas PCSK9-PKE2 en tándem a la seroalbúmina de varias especies

Las afinidades de las moléculas en tándem PCSK9-PKE2 para la seroalbúmina de varias especies, junto con la afinidad de la Adnectina PKE2 2629_E06, se evaluaron mediante el análisis de Biacore, como se describe en el Ejemplo 2.

Como se muestra en la Tabla 12, las tres moléculas en tándem PCSK9-PKE2 mostraron afinidades comparables a las seroalbúminas a través de las especies, aunque las afinidades de los tándems fueron 5-7 veces más débiles (con tasas de disociación similares) en comparación con la adnectina PKE2 2629_E06.

Tabla 12

Adnectina en tándem	Unión a	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	Rmax (RU)
2629_E06	HuSA	1.74E+04	2.13E-04	12,3	106,8
	RhSA	1.95E+04	2.83E-04	14,5	86,24
	MuSA	6.84E+04	2.42E-04	3,6	97,99
4472_F08	HuSA	4.82E+03	3.24E-04	67,1	187,8
	RhSA	5.34E+03	3.67E-04	68,7	157,9
	MuSA	1.35E+04	3.44E-04	25,5	166,7
4472_E06	HuSA	5.30E+03	3.62E-04	68,4	215,4
	RhSA	5.77E+03	4.15E-04	71,9	181,4
	MuSA	1.50E+04	3.00E-04	20,0	186,2
4472_C06	HuSA	3.92E+03	2.89E-04	73,7	182,5
	RhSA	4.38E+03	3.37E-04	77,0	155,9
	MuSA	1.15E+04	3.01E-04	26,1	163,1

Se realizó un experimento similar (en las condiciones descritas en el Ejemplo 2) con la Adnectina en tándem 4472_C06 sin una cola de histidina 6X (denominada 5190_E01). Como se muestra en la Tabla 13, 5190_E01 se unió a la seroalbúmina de ratón con una K_D similar a la de la seroalbúmina humana, de macaco cynomolgus y de macaco rhesus, y se unió a la seroalbúmina de rata con una K_D de 200 nM.

5

Tabla 13

Adnectina en tándem	Ligando	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	R_{max} (RU)
5190_E01 (sin 6X His)	HSA (n = 4)	4.79E+03	2.72E-04	57,2 ± 8,6	173,2
	cynoSA (n = 3)	6.44E+03	3.26E-04	50,5 ± 5,4	168,5
	RhSA (n = 3)	6.52E+03	3.51E-04	53,8 ± 8,8	158,7
	MSA	1.67E+04	7.23E 04	43,3	148,8
	SA de rata	7.35E+03	1.47E-03	200	139,7

Los efectos del pH en la unión de Adnectina PKE2 2629_E06 y Adnectinas PCSK9-PKE2 en tándem 4472_C06, 4427_E06, y 4472_F08 también fueron probados. Como se muestra en las tablas 14 y 15, todas las Adnectinas analizadas mostraron una unión insensible al pH a la seroalbúmina de varias especies.

10

Tabla 14

Adnectina	Tampón	Unión a	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	R_{max} (RU)	χ^2 (RU ²)
Adnectina PKE2 2625_E06	HBSP, pH 7,4	HuSA	2.07E+04	2.19E-04	10,6	101,7	1,8
		RASA	2.18E+04	2.76E-04	12,7	91,41	1,51
		MuSA	7.91E+04	2.72E-04	3,43	101,1	1,87
	Acetato. pH 7,4	HuSA	2.80E+04	2.72E-04	9,74	112,9	4,64
		RhSA	2.79E+04	3.28E-04	11,8	100,8	3,75
		MuSA	7.68E+04	2.68E-04	3,48	105,2	2,34
	Acetato, pH 5,5	HuSA	7.04E+04	3.26E-04	4,64	88,62	3,25
		RhSA	4.85E+04	5.54E-04	12,0	68,33	1,05
		MuSA	3.40E+04	1.25E-03	14,9	87,71	4,1
PCSK9-PKE2 en tándem ADX_4472_C06	HBSP, pH 7,4	HuSA	3.58E+03	2.58E-04	72,0	167,5	4,02
		RASA	3.86E+03	3.05E-04	78,9	154,3	3,62
		MuSA	1.19E+04	3.36E-04	28,2	157,1	2,64
	Acetato. pH 7,4	HuSA	4.35E+03	3.25E04	74,7	170,1	7,34
		RASA	4.52E+03	3.64E-04	80,7	161,2	5,58
		MuSA	1.08E+04	3.75E-04	34,3	160,7	2,53
	Acetato, pH 5,5	HuSA	1.22E+04	4.66E-04	38,2	143,1	6,01
		RASA	8.36E+03	8.15E-04	97,5	105,2	1,6
		MuSA	1.31E+04	1.61E-03	123	132,3	7,08
PCSK9-PKE2 en tándem 4472_E06	HBSP, pH 7,4	HtsSA	4.75E+03	2.92E-04	61,4	181,2	8,92
		RhSA	5.11E+03	3.32E-04	64,9	166	7,94
		MuSA	1.52E+04	3.30E-04	21,8	172,6	6,43
	Acetato. pH 7,4	HuSA	5.91E+03	3.83E-04	64,9	135,6	17,1
		RhSA	6.24E+03	4.08E-04	65,4	173,8	12,8
		Musa	1.41E+04	3.68E-04	26,1	177,4	6,35
	Acetato, pH 5,5	HuSA	1.36E+04	4 78E-04	35,2	164,1	12,4
		RASA	8.64E+03	7.88E-04	\$1,1	137,5	3,73
		MuSA	1.34E+04	1.52E-03	114	164	14,5

15

Tabla 15

Adnectina	Tampón	Unión a	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi² (RU²)
Adnectina PKE2 2629_E06	HBSP, pH7.4	HuSA	1.79E+04	1.92E-04	10,7	107,0	0,9
		RhSA	2.35E+04	2.67E-04	11,4	108,2	1,8
		MuSA	7.96E+04	2.62E-04	3,3	100,9	1,2
	Acetato, pH 7,4	HuSA	254E+04	2.43E-04	9,6	114,6	2,7
		RhSA	2.86E+04	2.97E-04	10,4	116,0	3,0
		MuSA	4.49E+04	5.03E-04	11,2	81,0	1,2
	Acetato, pH 5,5	HuSA	7.07E+04	2.87E-04	4,1	95,1	3,9
		RhSA	4.49E+04	5.03E-04	11,2	81,0	12
		MuSA	7.70E+04	1.13E-03	14,6	85,3	3,2
PCSK9-PKE2 en tándem 4472_F08	HBSP, pH 7,4	HuSA	3.59E+03	3.01E-04	83,8	185,4	4,4
		RhSA	4.82E+03	3.46E-04	71,7	191,2	9,1
		MuSA	1.37E+04	3.59E-04	26,3	164,4	4,1
	Acetato, pH 7,4	HuSA	4.61E+03	3.87E-04	83,9	176,3	89
		RhSA	5.38E+03	4.05E-04	75,4	194,2	10,2
		MuSA	1.16E+04	4.07E-04	35,0	165,1	2,7
	Acetato, pH 5,5	HuSA	1.11E+04	4.89E-04	43,9	187,1	10,1
		RhSA	7.40E+03	8.18E-04	110,5	161,0	2,6
		MuSA	1.10E+04	1.50E-03	136,6	156,5	7,2

Ejemplo 15: Unión doble de adnectinas PCSK9-PKE2 en tándem a las albúminas y PCSK9

- 5 La capacidad de las adnectinas PCSK9-PKE2 en tándem para unirse simultáneamente a la seroalbúmina y PCSK9 se evaluó utilizando SPR. Es probable que el tándem esté unido a la albúmina la mayor parte del tiempo *in vivo* y, por lo tanto, sería esencial que la actividad de la adnectina PCSK9 se retenga cuando se une a la albúmina. La unión de las adnectinas PCSK9-PKE2 en tándem a ambas dianas simultáneamente se probó en el modo de inyección dual con una primera inyección del tándem en la albúmina inmovilizada en la superficie del chip, seguida de una segunda inyección de PCSK9 humano y el registro de los niveles de unión después de una fase de asociación de 3min para cada inyección. El aumento en la señal de unión de SPR luego de la inyección de PCSK9 frente al tampón, indica una unión simultánea del tándem a HSA y PCSK9, tal como se muestra en la Figura 7. PCSK9 muestra el -40 % del nivel de unión esperado a Adnectina en tándem 500 nM o 1 µM pre-unida a HSA. Como control adicional, PCSK9 no muestra ninguna unión a PKE-2 solo (datos no mostrados).

Ejemplo 16: Aclaramiento *in vivo* de adnectinas PCSK9-PKE2 en ratones C57 BL/6 TS

- La semivida *in vivo* de la adnectina PCSK9-PKE2 4772_C06 en tándem se determinó en un estudio de dosis IV de 2 mg/kg de 2 semanas en ratones C57 BL/6 de tipo silvestre. Los niveles plasmáticos de adnectina en tándem se determinaron utilizando la plataforma MesoScale Discovery. Se usó PCSK9 humano biotinilado para capturar la Adnectina y la detección se realizó a través de seroalbúmina de ratón unida al tándem y un AcP secundario anti-seroalbúmina de ratón marcado con sulfo. Los análisis no compartimentales se realizaron utilizando Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA) utilizando un modelo de plasma y un método de cálculo lineal hacia arriba/ logarítmico hacia abajo. Como se muestra en la Tabla 16 y en la Figura 8, la semivida promedio de la Adnectina en tándem 4772_C06 fue de 16,7 horas.

Tabla 16.

cepa	dosis	ID de ratón	HL_Lambda_z (h)	Cl_obs (ml/h/kg)	Vss_obs (ml/kg)	AUCall (h*nmol/l)	AUCINF_obs UC (h*nmol/l)	AUC_%Extrap_ob s (%)	MRTINF_obs (h)
C57Bl/6	2 mg/kg	N	3	3	3	3	3	3	3
		Media	16,7	4,39	92,0	18657	18787	0,69	21,0
		DT	1,0	0,21	4,0	868	893	0,10	1,5
		SE	0,6	0,12	2,3	501	515	0,06	0,9
		% de VC	6	4,8	4,4	4,7	4,8	15,1	7,4

Ejemplo 17: Las adnectinas en tándem PCSK9-PKE2 exhiben un robusto compromiso con la diana PCSK9 in vivo

La actividad farmacodinámica de la adnectina en tándem PCSK9-PKE2 4472_C06 se evaluó en un modelo de ratón transgénico PCSK9 humano que presenta niveles normales de PCSK9 humano. Este modelo es un transgénico hPCSK9 genómico (BAC-transgénico) que se regula en el hígado de manera similar al PCSK9 de ratón y que expresa niveles casi normales de hPCSK9 en plasma en seres humanos. El hPCSK9 sin unir se evaluó después de una dosis IP única de vehículo PBS o tándem de 0,5 o 2 mg/kg con 8 animales por grupo. Se desarrolló un ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) específico para PCSK9 humano libre (no unido) que no detecta PCSK9 de ratón. El ensayo empleó placas de 96 pocillos pretratadas con estreptavidina recubiertas con 2 µg/ml de PCSK9-Adnectina 2013_E01 biotinilada como reactivo de captura. Las muestras de plasma congeladas una vez solo se diluyeron según corresponda en tampón ELISA (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2 con Tween-20 al 0,05 % y BSA al 0,1 %), se agregaron a los pocillos y se incubaron durante 1 hora a 20 °C. Luego se lavaron los pocillos y se incubaron con 5 µg/ml de anti-IgG PCSK9 de humana policlonal de conejo (anticuerpo personalizado BMS producido por Lampire Biological Labs, Pipersville PA) durante 1 hora, seguido de procesamiento de anti-IgG de conejo marcada con HRP con TMB mediante métodos estándar de ELISA. Las curvas estándar se generaron utilizando PCSK9 humano recombinante purificado.

Como se muestra en la figura 9, el análisis de los niveles de hPCSK9 libres indica una potente participación de la diana por parte de la adnectina en tándem PCSK9-PKE2 en ambas dosis probadas. La hPCSK9 libre se inhibió de manera dependiente de la dosis, como lo demuestra la mayor duración de la respuesta de la dosis de 2 mg/kg en relación con la dosis de 0,5 mg/kg. Estos datos demuestran la actividad *in vivo* de la adnectina en tándem PCSK9-PKE2.

Ejemplo 18: Semivida in vivo de monoadnectinas PKE2 y adnectinas PCSK9-PKE2 en tándem en macacos cynomolgus

Se realizaron estudios de dosis única de PK/PD en macacos cynomolgus hembra delgadas normales con comparaciones del tándem PCSK9-PKE2 entre la monoAdnectina PKE2 o un comparador de adnectina PCSK9 PEGilado en dosis molares equivalentes, como lo indica el sombreado en la Tabla 17 a continuación. La adnectina PKE2 2629_E06 o la adnectina PCSK9-PKE2 en tándem 5190_E01, o una Adnectina PEGilada PCSK9 (conocida como ATI-1476) como un comparador, se administraron a macacos cynomolgus en las concentraciones y rutas indicadas (véase Tabla 17 y Figura 10) y el plasma sanguíneo (K2EDTA) y las muestras de suero se recogieron en intervalos de tiempo para la evaluación farmacocinética y farmacodinámica. Los niveles de fármaco de adnectina se midieron en plasma de macaco cynomolgus utilizando la plataforma tecnológica Mesoscale. 2629_E06 se capturó a través de un AcM anti-His (BMS) y se detectó mediante el uso de seroalbúmina de macaco cynomolgus unida a la adnectina y un AcP secundario marcado con sulfo anti-seroalbúmina de macaco cynomolgus. Para los análisis en tándem, se usó PCSK9 humano biotinilado para capturar la Adnectina y la detección se realizó a través de albúmina de macaco cynomolgus como se describió anteriormente. La adnectina PEGilada ATI-1476 se capturó a través de hPCSK9 biotinilado y se detectó a través de un AcM antiPEG (Epitomics) junto con un AcP de cabra marcado con sulfo anti-conejo. Los análisis no compartimentales se realizaron utilizando Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA) utilizando un modelo de plasma y un método de cálculo lineal hacia arriba/logarítmico hacia abajo.

Como se muestra en la Tabla 17, la semivida en plasma de 2629_E06 y ATI-1476 fue equivalente a las 112 horas. La semivida de 5190-E01 fue más corta que la de la monoAdnectina PKE2 y osciló entre 60 y 82 h después de la administración intravenosa. 5190_E01 exhibió una exposición proporcional a la dosis entre 3 y 10 mg/kg de dosis intravenosas (proporción AUC_{0-∞} de 1,02). Para todas las proteínas analizadas, el volumen de distribución fue menor que el volumen de plasma, lo que sugiere que la distribución de la Adnectina en tándem PCSK9-PKE2 y la Adnectina PEGilada se limitó principalmente al espacio vascular. El aclaramiento fue bajo en general y comparable en las distintas dosis y formatos. La biodisponibilidad subcutánea de la Adnectina en tándem 5190_E01 fue del 41-49 %.

Tabla 17.

Formato	Dosis	HL_Lambda_z (h)	Cl_obs (ml/h/kg)	Vss_obs (ml/kg)	AUCall (h*umol/l)	AUCINF_obs (h*umol/l)	AUC_%Extrap_obs (%)	MRTINF_obs (h)
PCSK9-PKE2 en tándem 5190 E01	SC 3 mg/kg	-	-	-	92 ± 17	92 ± 17	0,54 ± 0,4	-
	IV 3 mg/kg	82 ± 5,1	0,55 ± 0,03	57 ± 4,3	222 ± 24	234 ± 12	5,45 ± 5,4	104,6 ± 2,5
	IV 10 mg/kg	60 ± 6,5	0,58 ± 0,09	50 ± 6,8	754 ± 98	769 ± 103	1,76 ± 1,4	87,3 ± 10,4
PCSK9-PEGATI-1476	IV 5 mg/kg	112 ± 7,6	0,46 ± 0,08	65 ± 10	1000 ± 14	1008 ± 14	0,70 ± 0,5	141,6 ± 7,6
PKE22629_E06	IV 1,5 mg/kg	112 ± 7,3	0,37 ± 0,05	56 ± 5,2	305 ± 49	328 ± 45	6,92 ± 6,6	152 ± 8,2

La farmacocinética de la adnectina 2270_C01 original también se probó en macacos cynomolgus en un estudio separado. Los niveles de fármaco de adnectina se cuantificaron como se describió anteriormente para los estudios de PK en ratones. Como se muestra en la Tabla 18 y en la Figura 11, la Adnectina 2270_C01 tuvo una semivida de 83,5 horas después de una dosis IV única de bolo de 1 mg/kg.

5

Tabla 18.

	HL_Lambda_z (hr)	Vz_obs (ml/kg)	Cl_obs (ml/hr/kg)	AUCINF_obs (hr*nmol/l)	MRTINF_obs (hr)
N	2	2	2	2	2
Media	83,5	22,319	0,185	419981,536	102,847
DT	8,632	2,819	0,004	9680,781	1,888
SE	6,104	1,993	0,003	6845,346	1,335
Min	77,4	2033	0,18	413136,19	101,51
Máx	89,6	24,31	0,19	426826,88	104,18
% de VC	10,3	12,6	2,3	2,3	1,8

Ejemplo 19: La adnectina en tándem PCSK9-PKE2 funciona como un inhibidor de PCSK9 en macacos cynomolgus

10

El estudio PK/PD de macacos cynomolgus descrito anteriormente se evaluó por los efectos farmacodinámicos de la inhibición de PCSK9. Se desarrollaron ensayos de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) específicos para PCSK9 de macaco cynomolgus. El ensayo PCSK9 libre (no unido) empleó la plataforma MesoScale Discovery e incorporó placas MSD de 96 pocillos pretratadas con estreptavidina recubiertas con 2 µg/ml de PCSK9-Adnectin 2013_E01 biotinilado como reactivo de captura. Las muestras se diluyeron 1:4 con anti-IgG de PCSK9 humana policlonal de conejo marcada con sulfo (anticuerpo personalizado BMS producido por Lampire Biological Labs, Pipersville PA), se agregaron a los pocillos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, los pocillos se lavaron y leyeron con un tampón de lectura MSD 2X. El ensayo ELISA de PCSK9 total se realizó de manera similar a como se describió anteriormente, excepto que AcM-4H5 (anticuerpo BMS personalizado producido por Lampire Biological Labs, Pipersville PA) se incorporó como anticuerpo de captura y la etapa de detección se realizó por separado de la etapa de captura. El AcM-4H5 se une al dominio C-terminal de PCSK9, y cuando se une a las placas de 96 pocillos captura de manera eficaz el PCSK9 total (ambos complejos Adnectin-PCSK9 más PCSK9 libre). Las etapas de captura y detección para PCSK9 total se incubaron durante 1 hora. Las curvas estándar se generaron utilizando PCSK9 recombinante purificado humano o de macaco cynomolgus. Los analitos séricos se analizaron en un Sistema de Química Clínica Advia 1800 de Siemens utilizando procedimientos enzimáticos estandarizados. El colesterol LDL se analizó mediante el método de LDL directo (Roche Diagnostics). Otros analitos probados fueron: aspartato aminotransferasa; alanina aminotransferasa; fosfatasa alcalina; Gammaglutamiltransferasa; bilirrubina total; nitrógeno de urea en sangre; creatinina; colesterol total; triglicérido; lipoproteína de alta densidad; lipoproteína de baja densidad; glucosa; proteína total; albúmina; globulinas; proporción de albúmina/globulina; calcio; fósforo inorgánico; sodio; potasio; cloruro.

30

Como se muestra en la Figura 12, 5190_E01 provocó los efectos farmacodinámicos en PCSK9 libre/no unido, PCSK9 total y LDL-c que se han observado previamente con otros inhibidores de adnectina PCSK9. Específicamente, se observó un rápido compromiso con la diana en el que el PCSK9 libre cae a niveles no detectables dentro de 1 hora de la dosificación. LDL-c se redujo a -50 % de los valores iniciales como resultado de la inhibición de PCSK9, y se observó una inhibición máxima en el marco de tiempo de 2 a 5 días. De manera adicional, el PCSK9 total aumenta a medida que se acumula el complejo adnectina PCSK9-PKE2:PCSK9. Tras la disociación del complejo y el aclaramiento de fármacos, los niveles de PCSK9 y LDL-c vuelven a los valores iniciales a los 15 días del estudio. Una tendencia similar se observa con el comparador de adnectina PCSK9 PEGilada. Como se muestra en la Figura 13, 5190_E01 mostró una reducción de LDL-c robusta similar a 10 mg/kg como la dosis molar equivalente del comparador de adnectina PCSK9 PEGilada.

35

40

Ejemplo 20: Dependencia de dosis en el compromiso de la diana de PCSK9

Se observó una respuesta dependiente de la dosis de la inhibición de PCSK9 libre en las dosis de 3 y 10 mg/kg del 5190_E01 como se muestra en la Figura 14. La dosis de 10 mg/kg muestra una duración más prolongada de la aplicación de la diana de PCSK9 que la dosis de 3 mg/kg. Esta figura también ilustra el compromiso de la diana de PCSK9 equivalente para las dosis molares equivalentes de las Adnectinas en tándem y PEGiladas. Como se esperaba, 2629_E06 no modula PCSK9 libre; cualquier variación observada en PCSK9 libre es probable que se deba a los ritmos diurnos y la variabilidad de los valores iniciales.

45

50

La Figura 15 ilustra la diferencia en los efectos de las adnectinas PCSK9 en tándem y PEGiladas en la PCSK9 total.

Aunque la tendencia general es la misma, la PCSK9 total alcanza su punto máximo y vuelve a los valores iniciales más rápidamente en el 5190_E01 de macaco cynomolgus dosificado en comparación con el comparador de adnectina PCSK9 PEGilada, lo que sugiere diferentes mecanismos de depuración para el complejo de fármaco PCSK9:adnectina según el método de mejora de PK empleado (aclaramiento renal para la captación en tándem frente a macrófagos para la Adnectina PEGilada). De nuevo, 2629_E06 no muestra ningún efecto farmacodinámico en este ensayo como se esperaba.

Ejemplo 21: El formato en tándem muestra una respuesta de inmunogenicidad in vitro equivalente en relación con los componentes

La evaluación *in vitro* de la inmunogenicidad potencial se evaluó para varias adnectinas PCSK9-PKE2 en tándem utilizando el ensayo de proliferación de linfocitos T, como se describe en el Ejemplo 8.

Como se muestra en la figura 16, el porcentaje y la magnitud de la respuesta de inmunogenicidad a las Adnectinas en tándem es similar a los componentes de la monoadnectina (es decir, PCSK9 o PKE2; medio de la Figura 16). Estos resultados sugieren un riesgo de inmunogenicidad adicional mínimo/nulo de adnectinas en tándem frente a monoadnectinas. De manera adicional, las diferencias en la respuesta proliferativa a los tándems se observan en función de la secuencia del enlazador que une las adnectinas PCSK9 y PKE2. En relación con las adnectinas PCSK9-PKE2 en tándem 4472_F08 y 4472_E06, la adnectina en tándem 4472_C06 mostró la inmunogenicidad más baja. Un mecanismo potencial para estas diferencias observadas podría ser las diferencias en el procesamiento de proteínas por parte de los linfocitos T en respuesta a las secuencias del enlazador.

En la tabla 19 a continuación, se presenta un resumen de las propiedades de 4472_C06.

Tabla 19.

Propiedad	Sistema	4472_C06
Peso molecular		Proteína de 25 kD
Biofísica	Estabilidad térmica, T _f Monomericidad	55 °C > 99 %
K _D de PCSK9 (37°C)	Ser humano, macaco cynomolgus	0,14 nM, 39 nM (primario, Octet Red)
K _D de albúmina (37 °C)	Ser humano, macaco cynomolgus, ratón, rata	57 nM, 51 nM, 43 nM, 200 nM
Actividad bioquímica	PCSK9:EGFA FRET, ser humano	1,5 nM
Actividad basada en células	Captación de PCSK9 Disminución de LDLR Proliferación de PBMC	19 nM (primario) 21 nM (en tándem) 9,4 nM (en tándem) Medio bajo (tándem primario)
Inmunogenicidad predicha	Epimatrix Contenido de 10Fn3 seq de TS	Bajo Mayor
PK	Ratón transgénico o TS Macaco cynomolgus	17-24 hr 82 h
Viscosidad	A la concentración requerida	Bajo

Tabla 20: RESUMEN DE SECUENCIAS

SEQ ID	Descripción	Secuencia
1	Dominio ¹⁰ F _n 3 humano de tipo silvestre	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISW DAPAVTVR YYRITYGETGGNSPVQEF TV PGSKSTATISGLKPGVDY TITVYAV TGRGDSPASSKP ISINYRT
2	Dominio ¹⁰ F _n 3 humano de tipo silvestre con secuencias de bucle definidas genéricamente	VSDVPRDLEVVA(A) _u LLISW(X) _v YYRITY(X) _w FTV(X) _x ATISGL (X) _y YTITVYAV(X) _z ISINYRT
3	Líder N-terminal	MGVSDVPRDL
4	Líder N-terminal	GVSDVPRDL
5	Líder N-terminal	X _n SDVPRDL
6	Líder N-terminal	X _n DVPRDL
7	Líder N-terminal	X _n VPRDL
8	Líder N-terminal	X _n PRDL
9	Líder N-terminal	X _n RDL
10	Líder N-terminal	X _n DL
11	Líder N-terminal	MASTSG
12	Cola C-terminal	EIEK
13	Cola C-terminal	EGSGC
14	Cola C-terminal	EIEKPCQ
15	Cola C-terminal	EIEKPSQ
16	Cola C-terminal	EIEKP
17	Cola C-terminal	EIEKPS
18	Cola C-terminal	EIEKPC
19	Cola C-terminal	EIDK
20	Cola C-terminal	EIDKPCQ
21	Cola C-terminal	EIDKPSQ
22	Cola 6X His	HHHHHH
23	Adnectina PKE2 2270_C01 (secuencia de aminoácidos)	MASTSGVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGWQVQMYSD WGPLYIYKEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSK PISINYRTEGDKPSQHHHHHH
24	Adnectina PKE2 2629_A09 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGRHVQIYSDL GPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSK ISINYRTEIDKPSQHHHHHH
25	Adnectina PKE2 2629_A11 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGRHVHIYSDW GPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSK ISINYRTEIDKPSQHHHHHH
26	Adnectina PKE2 2629_C10 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSVL GPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSK ISINYRTEIDKPSQHHHHHH

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
27	Adnectina PKE2 2629_D09 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQMYSDL GPLYVYSEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH
28	Adnectina PKE2 2629_E05 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKFSDW GPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH
29	Adnectina PKE2 2629_E06 (secuencia de aminoácidos) (también denominada ATI- 1490)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDL GPLYIYQEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH
30	Adnectina PKE2 2629_F04 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVHQYSDW GPMYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH
31	Adnectina PKE2 2629_H01 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVXYRITYGREVHKNSDW GTLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVXAVTGSGEXPASSKP ISINYRTEIDKXSQHSHHHHH
32	Adnectina PKE2 2629_H06 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDL GPLYIYAEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH
33	Adnectina PKE2 2629_H07 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVHLYSDW GPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH
34	Adnectina PKE2 2630_A02 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGRHVQMYSDL GPLYIFSEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH
35	Adnectina PKE2 2630_A11 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVHMYSDF GPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH
36	Adnectina PKE2 2630_D02 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDW GPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH
37	Adnectina PKE2 2630_D10 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQMYSDL GPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH
38	Adnectina PKE2 2630_F04 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQMYSDL GPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVGYTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
39	Adnectina PKE2 2630_G03 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDL GPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHH
40	Adnectina PKE2 2630_G10 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQIYSDW GPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHH
41	Adnectina PKE2 2630_H03 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATXTSLGISWDAPAVTVXYRITYGREVQKYSW GPLYIYQFTVPGSXSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKXSQHSHHHH
42	Adnectina PKE2 2631_B04 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDVPAVTVRYRITYGRHVHLYSEF GPMYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHH
43	Adnectina PKE2 2631_E03 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRDVHMYSDW GPMYIYQFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHH
44	Adnectina PKE2 2631_G01 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDW GPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHH
45	Adnectina PKE2 2631_G03 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRYVQLYSDW GPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHH
46	Adnectina PKE2 2631_H09 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRQVQVFSDL GPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHH
47	Adnectina PKE2 2632_G01 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRQVQIYSDW GPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHH
48	Adnectina PKE2 4079_A04 (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRQVQMYSDW GPLYIYAEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQHSHHHH
49	2270_C01 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MASTSGVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGWQVQMYSD WGPLYIYKEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSK PISINYRTEGDKPSQ
50	2629_A09 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDL GPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQ
51	2629_A11 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRHVHIYSDW GPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQ

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
52	2629_C10 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQKYSVL</u> <u>GPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP</u> ISINYRTEIDKPSQ
53	2629_D09 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQMYSDL</u> <u>GPLYVYSEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP</u> ISINYRTEIDKPSQ
54	2629_E05 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQKFSDW</u> <u>GPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP</u> ISINYRTEIDKPSQ
55	2629_E06 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQKYSDL</u> <u>GPLYIQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP</u> ISINYRTEIDKPSQ
56	2629_F04 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVHQYSDW</u> <u>GPMYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP</u> ISINYRTEIDKPSQ
57	2629_H01 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVXYRITY <u>GREVHKNSDW</u> <u>GTLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVXAVTGSGEXPASSKP</u> ISINYRTEIDKXSQ
58	2629_H06 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQKYSDL</u> <u>GPLYIYAEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP</u> ISINYRTEIDKPSQ
59	2629_H07 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVHLYSDW</u> <u>GPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP</u> ISINYRTEIDKPSQ
60	2630_A02 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GRHVQMYSDL</u> <u>GPLYIFSEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP</u> ISINYRTEIDKPSQ
61	2630_A11 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVHMYSDF</u> <u>GPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP</u> ISINYRTEIDKPSQ
62	2630_D02 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQKYSW</u> <u>GPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP</u> ISINYRTEIDKPSQ
63	2630_D10 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQMYSDL</u> <u>GPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKP</u> ISINYRTEIDKPSQ
64	2630_F04 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQMYSDL</u> <u>GPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVGYTITVYAVTGSGESPASSKP</u> ISINYRTEIDKPSQ

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
65	2630_G03 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDL GPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQ
66	2630_G10 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQIYSDW GPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQ
67	2630_H03 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATXTSLLISWDAPAVTVXYRITYGREVQKYSW GPLYIYQFTVPGSXSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKXSQ
68	2631_B04 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDVPAVTVRYRITYGRHVHLYSEF GPMYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQ
69	2631_E03 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGRDVHMYSDW GPMYIYQFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQ
70	2631_G01 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDW GPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQ
71	2631_G03 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGRYVQLYSDW GPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQ
72	2631_H09 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGRQVQVFSDL GPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQ
73	2632_G01 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGRQVQIYSDW GPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQ
74	4079_A04 sin marcador his (secuencia de aminoácidos)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGRQVQMYSDW GPLYIYAEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKP ISINYRTEIDKPSQ
75	2270_C01 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGWQVQMYSDWGPLYIYKEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRT
76	2629_A09 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDLGPLYIYTEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRT
77	2629_A11 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGRHVHIYSDWGPMYIYTEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRT
78	2629_C10 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSVLGPLYIYTEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRT

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
79	2629_D09 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQMYSDLGPLYVYSEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SIN YRT
80	2629_E05 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKFSDWGPLYIYTEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SIN YRT
81	2629_E06 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DLGPLYIYQEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SIN YRT
82	2629_F04 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVHQYSDWGPMYIYNEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SIN YRT
83	2629_H01 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVXYYRITYGREVHKNSDWGTLIYTEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVXAVTGSGEXPASSKPI SIN YRT
84	2629_H06 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DLGPLYIYAEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SIN YRT
85	2629_H07 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVHLYSDWGPMYIYTEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SIN YRT
86	2630_A02 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGRHVQMYSDLGPLYIFSEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SIN YRT
87	2630_A11 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVHMYSDFGPMYIYTEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SIN YRT
88	2630_D02 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DWGPLYIYNEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SIN YRT
89	2630_D10 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQMYSDLGPLYIYNEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SIN YRT
90	2630_F04 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQMYSDLGPLYIYTEFT VPGSKSTATISGLKPGVG YITITVYAVTGSGESPASSKPI SIN YRT
91	2630_G03 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDLGPLYIYNEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SIN YRT
92	2630_G10 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQIYSDWGPLYIYNEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SIN YRT
93	2630_H03 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATXTSLLLISWDAPAVTVXYYRITYGREVQKYS DWGPLYIYQEFT VPGSXSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SIN YRT

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
94	2631_B04 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLGISWDPAVTVRYRITYGRHVHLYSEFGPMYIYNEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPISINYRT
95	2631_E03 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLGISWDPAVTVRYRITYGRDVHMYSDWGPMYIYQEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPISINYRT
96	2631_G01 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLGISWDPAVTVRYRITYGRHVQIYSDWGPLYIYNEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPISINYRT
97	2631_G03 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLGISWDPAVTVRYRITYGRYVQLYSDWGPMYIYTEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPISINYRT
98	2631_H09 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLGISWDPAVTVRYRITYGRQVQVFDLGLPLYIYNEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPISINYRT
99	2632_G01 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLGISWDPAVTVRYRITYGRQVQIYSDWGPLYIYNEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPISINYRT
100	4079_A04 primaria (secuencia de aminoácidos)	EVVAATPTSLGISWDPAVTVRYRITYGRQVQMYSDWGPLYIYAEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPISINYRT
101	bucle CD de 2629_A09	GRHVQIYSDLGPLYIYTE
102	bucle CD de 2629_A11	GRHVHIYSDWGPMYIYTE
103	bucle CD de 2629_C10	GREVQKYSVLGPLYIYTE
104	bucle CD de 2629_D09	GREVQMYSDLGPLYVYSE
105	bucle CD de 2629_E05	GREVQKFSDWGPLYIYTE
106	bucle CD de 2629_E06	GREVQKYSDLGPLYIYQE
107	bucle CD de 2629_F04	GREVHQYSDWGPMYIYNE
108	bucle CD de 2629_H01	GREVHKNSDWGTLIYTE
109	bucle CD de 2629_H06	GREVQKYSDLGPLYIYAE
110	bucle CD de 2629_H07	GREVHLYSDWGPMYIYTE
111	bucle CD de 2630_A02	GRHVQMYSDLGPLYIFSE
112	bucle CD de 2630_A11	GREVHMYSDFGPMYIYTE
113	bucle CD de 2630_D02	GREVQKYSWGPLYIYNE
114	bucle CD de 2630_D10	GREVQMYSDLGPLYIYNE
115	bucle CD de 2630_F04	GREVQMYSDLGPLYIYTE
116	bucle CD de 2630_G03	GRHVQIYSDLGPLYIYNE

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
117	bucle CD de 2630_G10	GREVQIYSDWGPLYIYNE
118	bucle CD de 2630_H03	GREVQKYSDWGPLYIYQE
119	bucle CD de 2631_B04	GRHVHLYSEFGPMYIYNE
120	bucle CD de 2631_E03	GRDVHMYSDWGPMYIYQE
121	bucle CD de 2631_G01	GRHVQIYSDWGPLYIYNE
122	bucle CD de 2631_G03	GRYVQLYSDWGPMYIYTE
123	bucle CD de 2631_H09	GRQVQVFSDLGPLYIYNE
124	bucle CD de 2632_G01	GRQVQIYSDWGPLYIYNE
125	bucle CD de 4079_A04	GRQVQMYSWDGPLYIYAE
126	2270_C01 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGCTAGCACTAGTGGCGTGCCGCGCGACTTGGAAGTGTTGCCCGG ACCCCGACGTCTCTGCTTATTAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTG AGATATTATCGCATTACATATGGTTGGCAGGTTTACAGATGTACTCTGAC TGGGGTCCGCTGTACATCTACAAAGAGTTCACGGTACCTGGGAGCAAG TCCACAGCTACCATCAGCGGTCTCAAACCTGGAGTTGATTACACCATT ACGGTATACGCAGTCACCGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAG CCAATTTCCATTAATTATCGGACCGAAGGCGACAAACCATCCCAGCAC CATCACCACCACCACTGA
127	2629_A09 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGACGGCATGTTTACAGATCTATTCTGACTTA GGCCCGCTGTACATCTACACAGAGTTTACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
128	2629_A11 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGTAGACACGTTTATATCTACTCAGACTGG GGTCCGATGTACATCTACACAGAGTTTACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
129	2629_C10 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGGAGAGAGGTTTACAGAAATACTCTGTCTTG GGTCCACTGTACATATAACGAGTTTACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
130	2629_D09 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGGAGGGAGGTTTACAGATGTACTCTGACTTG GGTCCATTGTACGTATACAGCGAGTTTACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
131	2629_E05 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGTCGGGAGGTACAGAAGTTCTCGGACTGG GGTCCGCTGTACATCTACACAGAGTTTACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
132	2629_E06 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGCAGGGAGGTTTACAGAAGTACTCGGACTTG GGTCCGTTGTACATCTACCAAGAGTTTACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
133	2629_F04 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGTAGGGAGGTTTATCAATACTCTGACTTG GGTCCGATGTACATCTACAACGAGTTTACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
134	2629_H01 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCR TATTACCGCATCACTTACGGTCGGGAGGTTTATAGAAGTACTGACTTG GGTACGCTGTACATCTACACAGAGTTTACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTRTGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGARCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAAMCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
135	2629_H06 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGACGGGAGGTTTACAGAAGTATTGACTTG GGTCCACTGTACATCTACGCAGAGTTTACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
136	2629_H07 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGGCGGGAGGTCCACCTGTACTCCGACTGG GGGCCGATGTACATCTACACAGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
137	2630_A02 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTACCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGTAGGCACGTTCAAATGTACTCTGACCTT GGTCCGTTGTACATCTTCAGTGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
138	2630_A11 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGACGGGAGGTTTCATATGTACTCTGACTTC GGTCCGATGTACATATAACAGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
139	2630_D02 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGTAGAGAAGTTCAGAAATACTCTGACTGG GGCCCGCTCTACATCTACAATGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
140	2630_D10 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGTCGGGAGGTTTCAGATGTACTCGGACTTG GGTCCGCTCTACATCTACAACGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
141	2630_F04 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGTAGAGAGGTCCAGATGTACTCAGACTTG GGGCCGCTGTACATCTATACAGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGGTTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
142	2630_G03 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGACGGCATGTTTACAGATCTACTCCGACTTG GGTCCCTCTGTATATCTACAATGAGTTTACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
143	2630_G10 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGTCGGGAGGTTCAAATATACTCTGACTGG GGTCCGCTGTATATATAACAACGAGTTTACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
144	2630_H03 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC SCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCSA TATTACCGCATCACTTACGGACGTGAAGTRCAGAAATACTCTGACTGG GGCCCGCTGTACATCTACCAAGAGTTTACTGTGCCTGGGAGCRAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAAMCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
145	2631_B04 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGTACCTGCCGTTACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGCAGGCACGTACATTTGTACTCGGAGTTC GGTCCGATGTATATCTACAACGAGTTTACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
146	2631_E03 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGTAGGGATGTCCACATGTACTCTGACTGG GGTCCGATGTACATATAACCAAGAGTTTACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
147	2631_G01 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGTAGGCATGTTTACAGATATACTCGGACTGG GGTCCGCTGTACATCTACAATGAGTTTACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
148	2631_G03 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTACTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGAAGGTATGTTTCAGCTATACTCTGACTGG GGTCCGATGTACATCTACACGGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
149	2631_H09 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGACGGCAAGTGCAAGTGTTCTCAGACTTG GGTCCGCTGTACATATAACAACGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
150	2632_G01 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGTAGACAGGTGCAGATCTACTCTGACTGG GGACCGCTGTACATCTACAATGAGTTCACCTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
151	4079_A04 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGTAGGCAGGTACAGATGTACTCTGACTGG GGTCCACTTTACATCTACGCCGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
152	Enlazador	PSTPPTPSPSTPPTPSPS
153	Enlazador	GSGSGSGSGSGSGS
154	Enlazador	GGSGSGSGSGSGS
155	Enlazador	GGSGSGSGSGSGSGSG
156	Enlazador	GSEGSEGSEGSEGSE
157	Enlazador	GGSEGGSE
158	Enlazador	GSGSGSGS
159	Enlazador	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
160	Enlazador	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
161	Enlazador	GGGGSGGGGSGGGGSG
162	Enlazador	GPGPGPG
163	Enlazador	GPGPGPGPGPG

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
164	Enlazador	PAPAPA
165	Enlazador	PAPAPAPAPAPA
166	Enlazador	PAPAPAPAPAPAPAPAPA
167	Dominio ¹⁰ F _n 3 de PCSK9	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQ EFTVPVSKGTATISGLKPGVDYTITVYAVEFDFPGAGYYHRPISINYR T
168	Adnectina en tándem PCSK9-PKE2 sin marcador his 5190_E01 (ATI-1676)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQ EFTVPVSKGTATISGLKPGVDYTITVYAVEFDFPGAGYYHRPISINYR TEPSTPPTPSPSTPPTPSPSGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAV TVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDY TITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTP
169	Adnectina en tándem PCSK9-PKE2 con marcador his 4472_C06 (ATI-1574)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQ EFTVPVSKGTATISGLKPGVDYTITVYAVEFDFPGAGYYHRPISINYR TEPSTPPTPSPSTPPTPSPSGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAV TVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDY TITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEHHHHHH
170	Bucle CD consenso	G-X ₁ -X ₂ -V-X ₃ -X ₄ -X ₅ -S-X ₆ -X ₇ -G-X ₈ -X ₉ -Y-X ₁₀ -X ₁₁ -X ₁₂ -E
171	3852_F10	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGGCTGTTGACGGTTCGA TATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACCTGTGCCTGGTTCTAAATCTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTCCGTAC GAATTCATTTCCCGTACACTCATTACTCTTCTAAACCAATTTCCATT AATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCACCACCAC CACTGA
172	Secuencia de ácido nucleico de adnectina en tándem PCSK9-PKE2 5190_E01 (ATI-1676)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGGCTGAAGGGTACGGT TATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACCTGTGCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCAATTTCGAC TTCCCCGGCGCCGGTTACTACCATCGTCCAATTTCCATTAATTACCGG ACCGAACCGAGCACACCTCCGACCCCGAGTCCGTCAACACCACCGACA CCGTCACCGAGCGGAGTTTCTGACGTCCCGCGCGACCTGGAAGTGTT GCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTC ACAGTGCGATATTACCGCATCACTTACGGCAGGGAGGTTTCAAGATAC TCGGACTTGGGTCCGTTGTACATCTACCAAGAGTTCACTGTGCCTGGG AGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTAT ACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGC AGCAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACACCGTGA
173	Enlazador	PSPEPPTPEP
174	Enlazador	PSPEPPTPEPPSPEPPTPEP
175	Enlazador	PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP
176	Enlazador	PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP
177	Enlazador	EEEEDE

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
178	Enlazador	EEEEDEEEEEDE
179	Enlazador	EEEEDEEEEEDEEEEEDEEEEEDE
180	Enlazador	EEEEDEEEEEDEEEEEDEEEEEDEEEEEDEEEEEDE
181	Enlazador	RGGEKKKEKEKEEQEERETKTP
182	Uso a modo de ejemplo del enlazador	NYRTPGPSPEPPTPEP
183	Uso a modo de ejemplo del enlazador	PSPEPPTPEPGVSDV
184	2270_C01 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGWQVQMYSDWGPLYIYKEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTP
185	2629_A09 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDLGPLYIYTEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTP
186	2629_A11 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGRHVHIYSDWGPMYIYTEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTP
187	2629_C10 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSVLGPLYIYTEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTP
188	2629_D09 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQMYSDLGPLYVYSEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTP
189	2629_E05 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKFSDWGPLYIYTEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTP
190	2629_E06 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTP
191	2629_F04 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVHQYSDWGPMYIYNEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTP
192	2629_H01 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVXYYRITYGREVHKNSDWGTLIYTEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVXAVTGSGEXPASSKPISINYRTP

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
193	2629_H06 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS ~~DLGPLYIYAEFT~~ VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPI ~~SINYRTP~~
194	2629_H07 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVHLYSDWGPMYIY ~~TEFT~~ VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPI ~~SINYRTP~~
195	2630_A02 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGRHVQMYSDLGPLYI ~~FSEFT~~ VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPI ~~SINYRTP~~
196	2630_A11 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVHMYSDFGPMYIY ~~TEFT~~ VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPI ~~SINYRTP~~
197	2630_D02 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS ~~DWGPLYIYNEFT~~ VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPI ~~SINYRTP~~
198	2630_D10 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQMYSDLGPLYIY ~~NEFT~~ VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPI ~~SINYRTP~~
199	2630_F04 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQMYSDLGPLYIY ~~TEFT~~ VPGSKSTATISGLKPGVGYTTITVYAVTGSGESPASSKPI ~~SINYRTP~~
200	2630_G03 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDLGPLYIY ~~NEFT~~ VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPI ~~SINYRTP~~
201	2630_G10 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQIYSDWGPLYIY ~~NEFT~~ VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPI ~~SINYRTP~~
202	2630_H03 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATXTSLLISWDAPAVTVXYYRITYGREVQKYS ~~DWGPLYIYQEFT~~ VPGSXSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPI ~~SINYRTP~~
203	2631_B04 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLISWDVPAVTVRYRITYGRHVHLYSEFGPMYIY ~~NEFT~~ VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPI ~~SINYRTP~~
204	2631_E03 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGRDVHMYSDWGPMYIY ~~QEFT~~ VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPI ~~SINYRTP~~

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
205	2631_G01 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDWGPLYIYNEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTP
206	2631_G03 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRYVQLYSDWGPMYIYTEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTP
207	2631_H09 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRQVQVFSDLGPLYIYNEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTP
208	2632_G01 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRQVQIYSDWGPLYIYNEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTP
209	4079_A04 primaria (secuencia de aminoácidos) con prolina C-terminal	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRQVQMYSDWGPLYIYAEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTP
210	Cola C-terminal	EIEPKSS
211	Cola C-terminal	EIDKPC
212	Cola C-terminal	EIDKP
213	Cola C-terminal	EIDKPS
214	Cola C-terminal	EIDKPSQLE
215	Cola C-terminal	EIEDEDEDEDED
216	Cola C-terminal	EGSGS
217	Cola C-terminal	EIDKPCQLE
218	Cola C-terminal	EIDKPSQHSHHHH
219	Cola C-terminal	GSGCHSHHHH
220	Cola C-terminal	EGSGCHSHHHH
221	Cola C-terminal	PIDK
222	Cola C-terminal	PIEK
223	Cola C-terminal	PIDKP
224	Cola C-terminal	PIEKP
225	Cola C-terminal	PIDKPS
226	Cola C-terminal	PIEKPS
227	Cola C-terminal	PIDKPC
228	Cola C-terminal	PIEKPC
229	Cola C-terminal	PIDKPSQ
230	Cola C-terminal	PIEKPSQ

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
231	Cola C-terminal	PIDKPCQ
232	Cola C-terminal	PIEKPCQ
233	Cola C-terminal	PHHHHHH
234	Cola C-terminal	PCHHHHHH
235	2270_C01 sin marcador his y metionina N- terminal y con prolina C-terminal	ASTSGVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYYRITYGWQVQMYSDW GPLYIYKEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEGDKPSQP
236	2629_A09 sin marcador his y metionina N- terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYYRITYGRHVQIYSDLG PLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
237	2629_A11 sin marcador his y metionina N- terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYYRITYGRHVHIYSDWG PMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
238	2629_C10 sin marcador his y metionina N- terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSVLG PLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
239	2629_D09 sin marcador his y metionina N- terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQMYSDLG PLYVYSEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
240	2629_E05 sin marcador his y metionina N- terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKFSDWG PLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
241	2629_E06 sin marcador his y metionina N- terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLG PLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
242	2629_F04 sin marcador his y metionina N- terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVHQYSDWG PMYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
243	2629_H01 sin marcador his y metionina N- terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVXYYRITYGREVHKNSDWG TLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVXAVTGSGEXPASSKPI SINYRTEIDKXSQP
244	2629_H06 sin marcador his y metionina N- terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLG PLYIYAEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
245	2629_H07 sin marcador his y metionina N-terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVHLYSDWG PMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
246	2630_A02 sin marcador his y metionina N-terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRHVQMYSDLG PLYIFSEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
247	2630_A11 sin marcador his y metionina N-terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVHMYSDFG PMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
248	2630_D02 sin marcador his y metionina N-terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDWG PLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
249	2630_D10 sin marcador his y metionina N-terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQMYSDLG PLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
250	2630_F04 sin marcador his y metionina N-terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQMYSDLG PLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVGYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
251	2630_G03 sin marcador his y metionina N-terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDLG PLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
252	2630_G10 sin marcador his y metionina N-terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQIYSDWG PLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
253	2630_H03 sin marcador his y metionina N-terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATXTSLGISWDAPAVTVXYRITYGREVQKYSDWG PLYIYQEFVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKXSQP
254	2631_B04 sin marcador his y metionina N-terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDVPAVTVRYRITYGRHVHLYSEFG PMYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
255	2631_E03 sin marcador his y metionina N-terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRDVHMYSDWG PMYIYQEFVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
256	2631_G01 sin marcador his y metionina N-terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDWG PLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
257	2631_G03 sin marcador his y metionina N-terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGRYVQLYSDWG PMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
258	2631_H09 sin marcador his y metionina N-terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGRQVQVFSDLG PLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
259	2632_G01 sin marcador his y metionina N-terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGRQVQIYSDWG PLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
260	4079_A04 sin marcador his y metionina N-terminal y con prolina C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGRQVQMYSDWG PLYIYAEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSQP
261	Adnectina en tándem PCSK9-PKE2 sin marcador his y metionina N-terminal 5190_E01 (ATI-1676)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQE FTVPVSKGTATISGLKPGVDYTTITVYAVEFDFPGAGYYHRPISINYRT EPSTPPTPSPSTPPTPSPSGVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVT VRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYT ITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTP
262	Enlazador a modo de ejemplo	(EEEEDE) _n E n=1-10
263	Enlazador a modo de ejemplo	(EEEEDE) _n E n=1-10

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende un décimo dominio de tipo III de fibronectina (¹⁰F_n3) en donde el dominio ¹⁰F_n3 comprende los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG, y el bucle CD comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula G-X₁-X₂-V-X₃-X₄-X₅-S-X₆-X₇-G-X₈-X₉-Y-X₁₀-X₁₁-X₁₂-E, en donde,
 5 (a) X₁ es R; (b) X₂ es E; (c) X₃ es Q; (d) X₄ es K; (e) X₅ es Y; (f) X₆ es D; (g) X₇ es L o W; (h) X₈ es P; (i) X₉ es L; (j) X₁₀ es I; (k) X₁₁ es Y; y (l) X₁₂ es Q o N, y en donde el polipéptido se une a seroalbúmina humana con una K_D de menos de 500 nM, y a una o más de seroalbúmina de macaco rhesus, seroalbúmina de macaco cynomolgus, seroalbúmina de ratón y seroalbúmina de rata con una K_D de menos de 500 nM, por ejemplo, menos de 100 nM o
 10 menos de 10 nM.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el dominio ¹⁰F_n3 se une a:
 15 a) seroalbúmina de macaco rhesus y seroalbúmina de macaco cynomolgus,
 b) seroalbúmina de ratón y seroalbúmina de rata, o
 c) seroalbúmina de macaco rhesus, seroalbúmina de macaco cynomolgus, seroalbúmina de ratón y seroalbúmina de rata.
3. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dominio ¹⁰F_n3 se une a seroalbúmina en un intervalo de pH de 5,5 a 7,4.
 20
4. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dominio ¹⁰F_n3 se une al dominio I-II de HSA.
5. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde (a) X₁ es R; (b) X₂ es E; (c) X₃ es Q; (d) X₄ es K; (e) X₅ es Y; (f) X₆ es D; (g) X₇ es L; (h) X₈ es P; (i) X₉ es L; (j) X₁₀ es I; (k) X₁₁ es Y; y (l) X₁₂ es Q.
 25
6. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde (a) X₁ es R; (b) X₂ es E; (c) X₃ es Q; (d) X₄ es K; (e) X₅ es Y; (f) X₆ es D; (g) X₇ es W; (h) X₈ es P; (i) X₉ es L; (j) X₁₀ es I; (k) X₁₁ es Y; y (l) X₁₂ es N.
 30
7. Un polipéptido que comprende un décimo dominio de tipo III de fibronectina (¹⁰F_n3) en donde el dominio ¹⁰F_n3 comprende los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG, y en donde el bucle CD comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 106, 113, 101-105, 107-112, y 114-125, y en donde el polipéptido se une a la seroalbúmina humana con una K_D de menos de 500 nM, y a una o más de la seroalbúmina de macaco rhesus, seroalbúmina de macaco cynomolgus, seroalbúmina de ratón y seroalbúmina de rata con una K_D de menos de 500 nM, por ejemplo, menos de 100 nM o menos de 10 nM.
 35
8. El polipéptido de la reivindicación 7, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de las SEQ ID NO: : 81, 88, 24-48, 50-74, 76-80, 82-87, 89-100, 185-209 y 236-260.
 40
9. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido es un polipéptido de fusión que comprende una proteína heteróloga.
10. El polipéptido de la reivindicación 9, en donde la proteína heteróloga es una fracción terapéutica.
 45
11. El polipéptido de la reivindicación 9, en donde la proteína heteróloga es un polipéptido que comprende un dominio ¹⁰F_n3.
12. El polipéptido de la reivindicación 11, en donde el dominio ¹⁰F_n3 en la proteína heteróloga se une a una proteína diana distinta de la seroalbúmina.
 50
13. Una composición que comprende un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo.
14. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
 55
15. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 14, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 127-151 y 172.
 60
16. Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
17. Una célula que comprende una molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 14 o 15 o un vector de expresión de la reivindicación 16.
 65

18. Un método para producir el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 que comprende cultivar la célula de la reivindicación 17 en condiciones adecuadas para expresar el polipéptido, y purificar el polipéptido.

Figura 1

Formato de ensayo
AlphaScreen competitivo

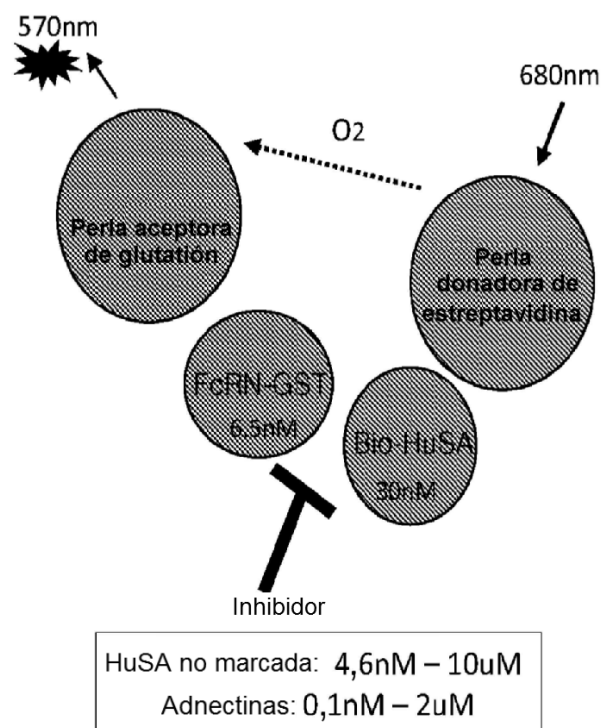


Figura 2
Competencia con hFcRn por la unión a HSA

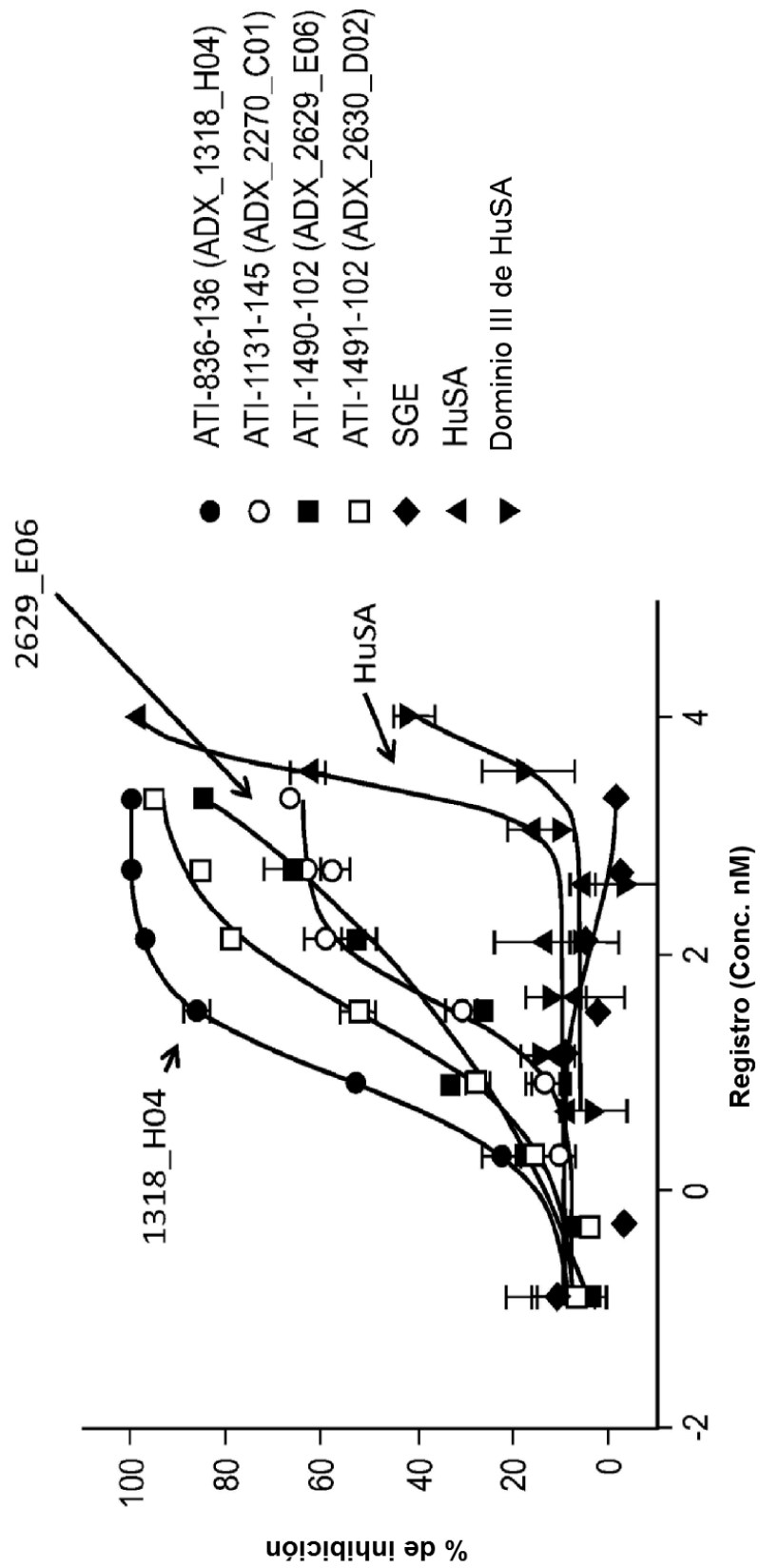


Figura 3

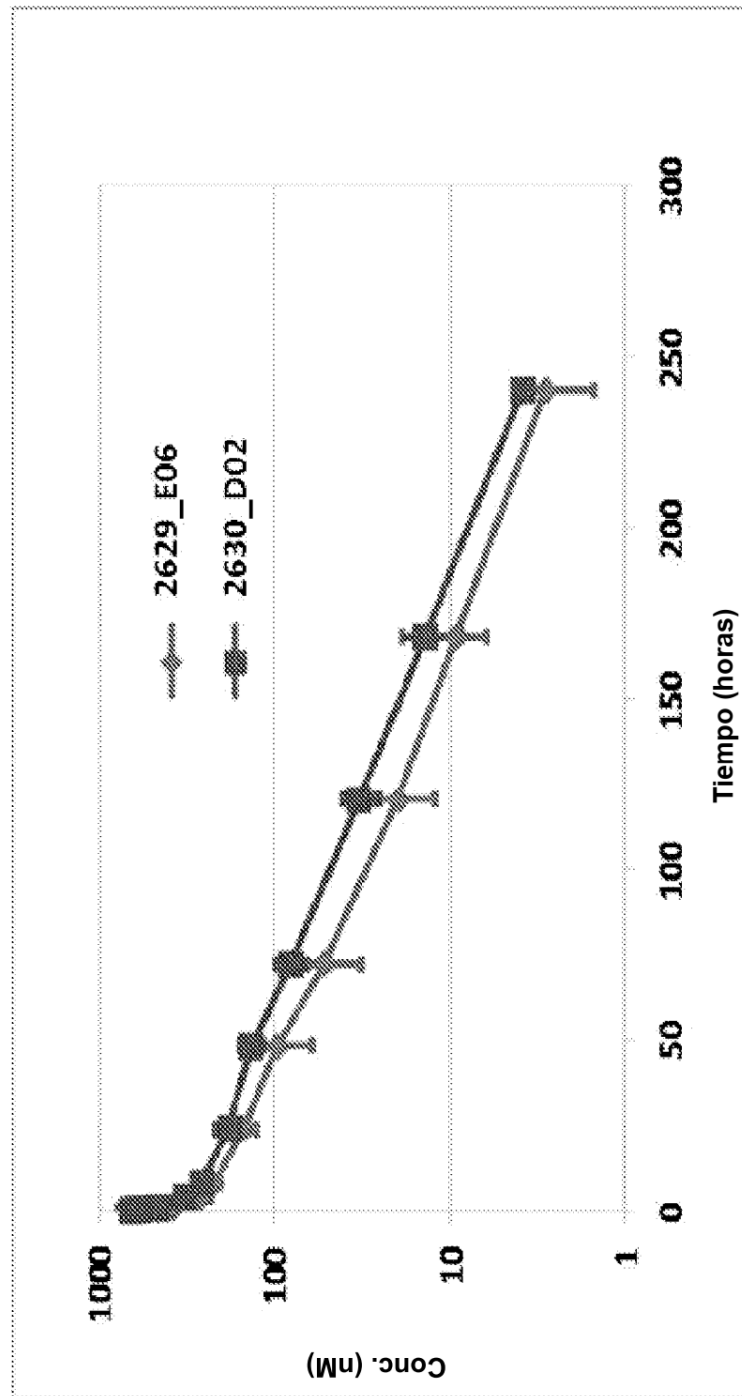


Figura 4

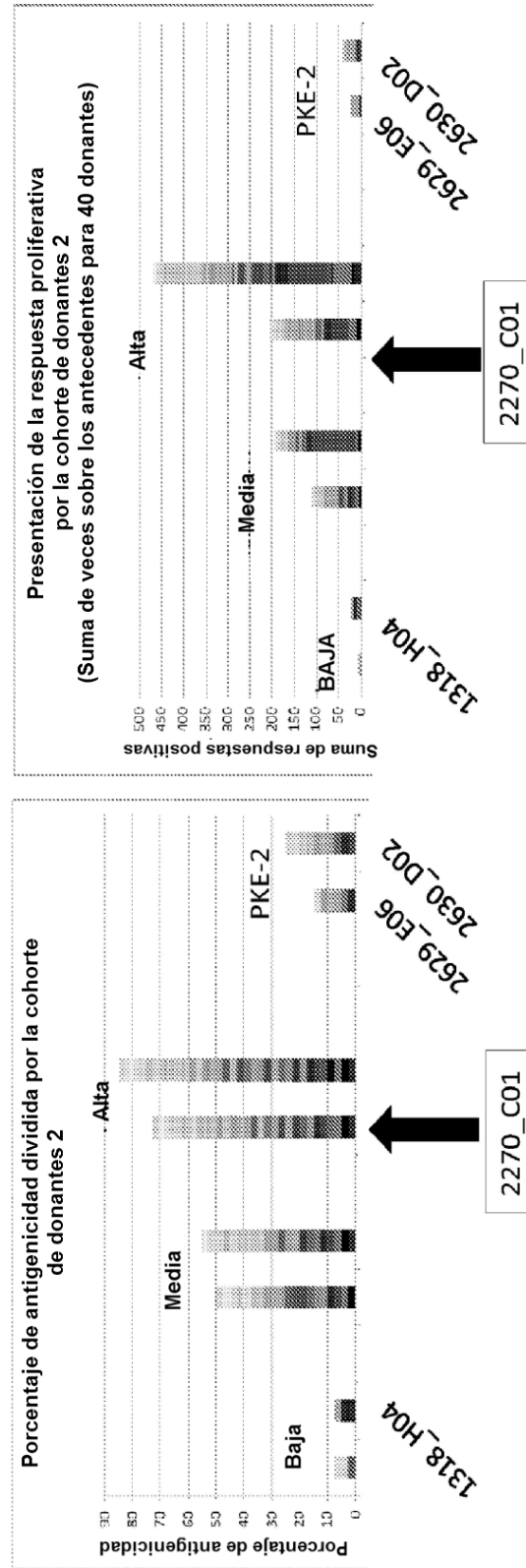
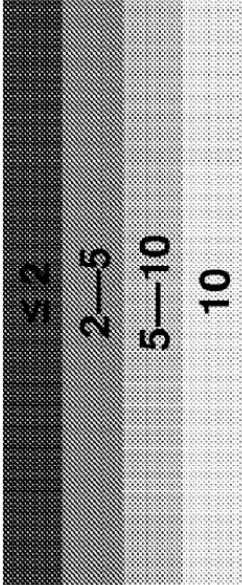


Figura 5

Adnectina		2987_H07 (myo)		2013_E01 (PCSK9)	
PKE	CE ₅₀ de HSA (nM)	X-PKE	PKE-X	X-PKE	PKE-X
1318_H04	5	31% (8/26)	0% (0/26)	31% (8/26)	X
2629_E06	20	30% (3/10)	80% (8/10)	90% (9/10)	80% (8/10)
2630_D02	9	20% (2/10)	60% (6/10)	50% (5/10)	80% (8/10)

CE₅₀_tándem/CE₅₀_mono de HSA



X = tándems no hechos

Figura 6

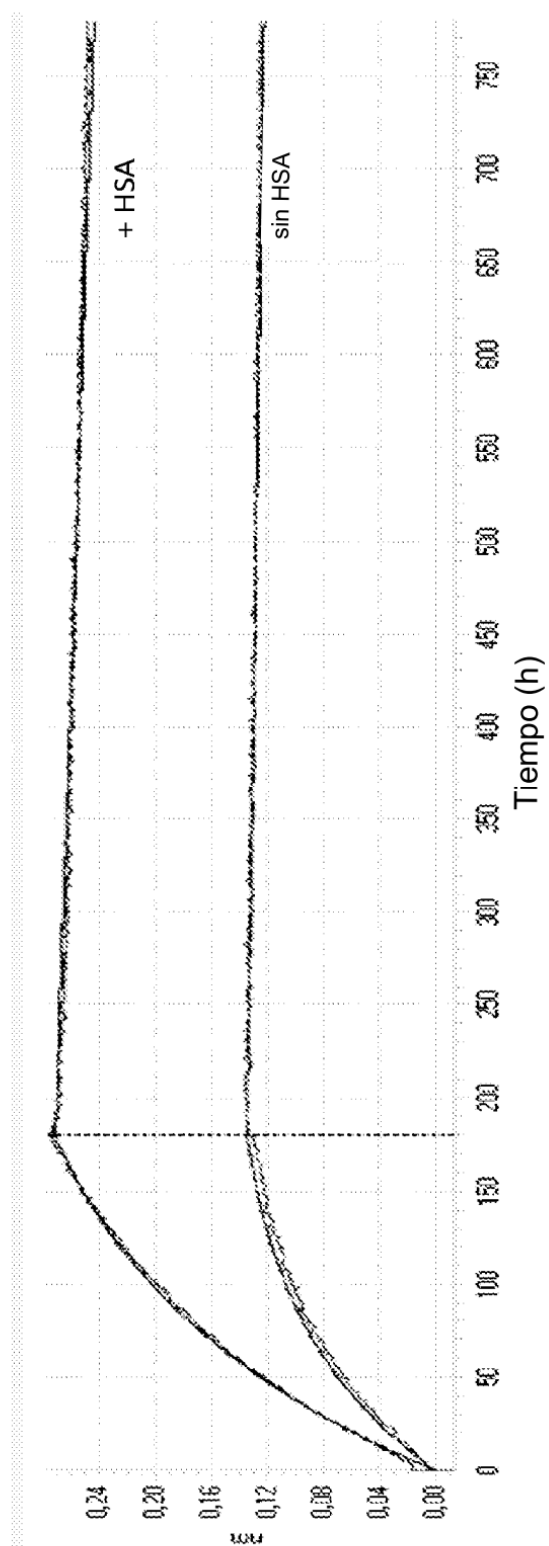


Figura 7

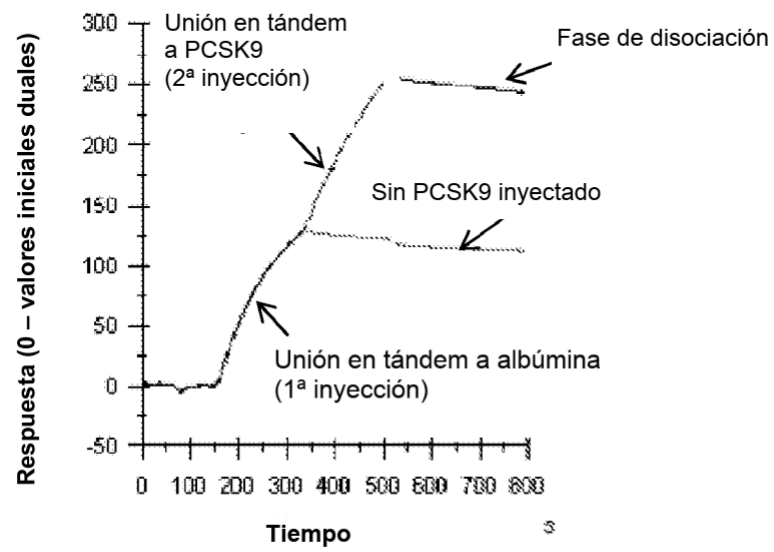


Figura 8

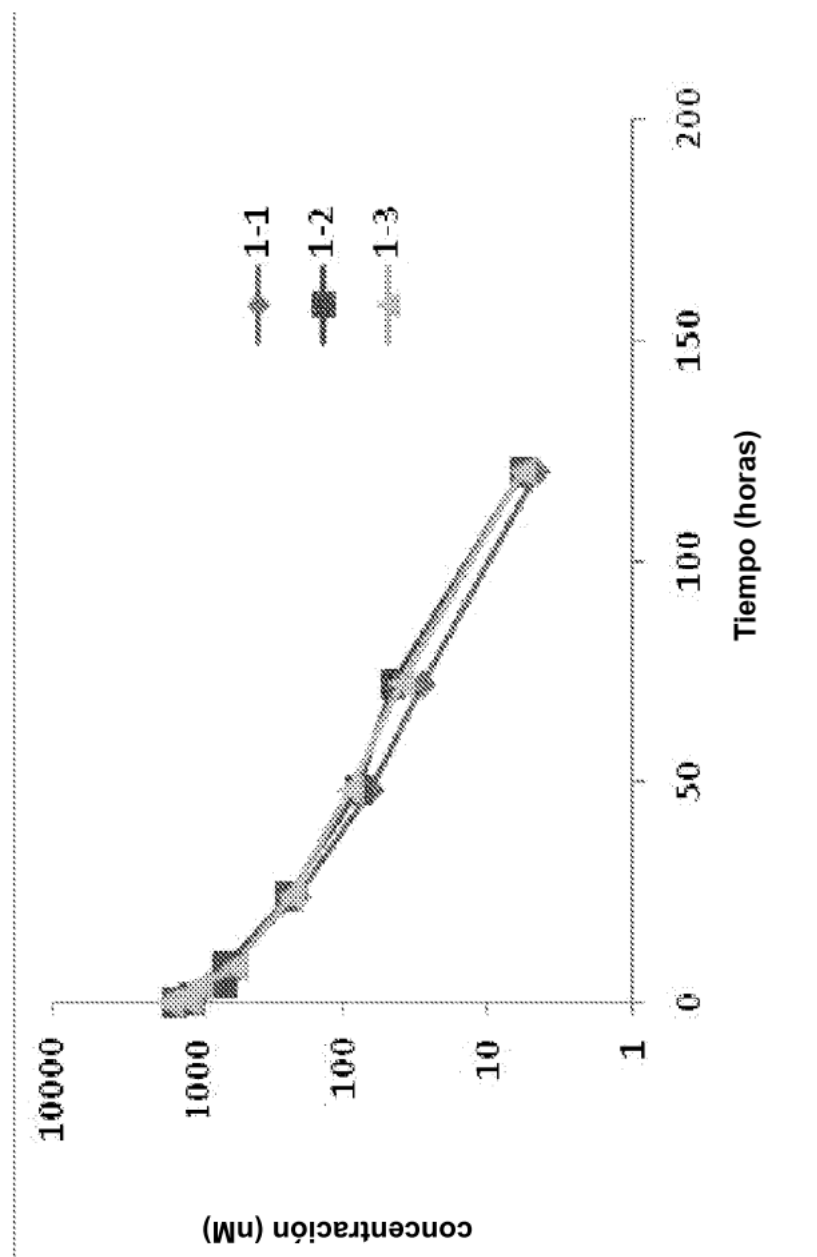


Figura 9

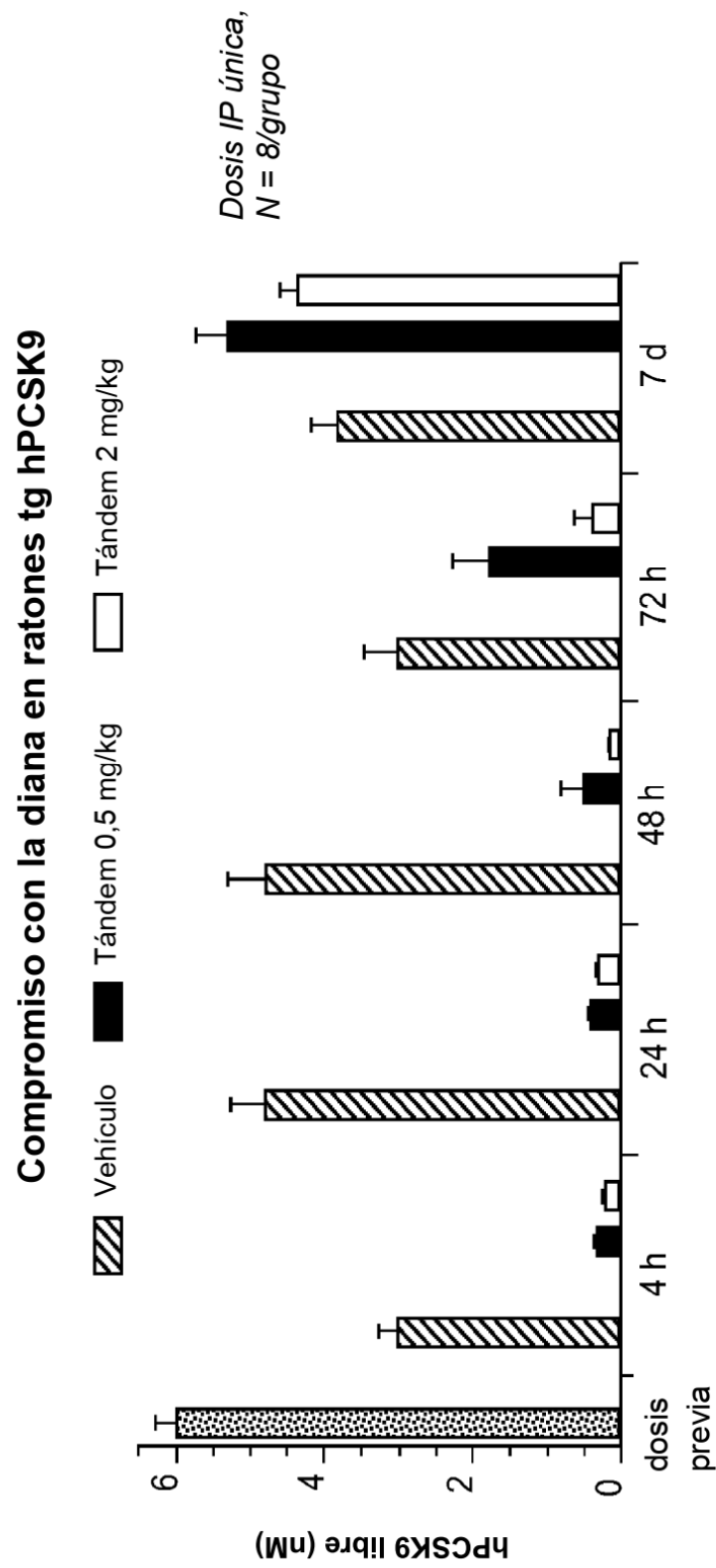


Figura 10

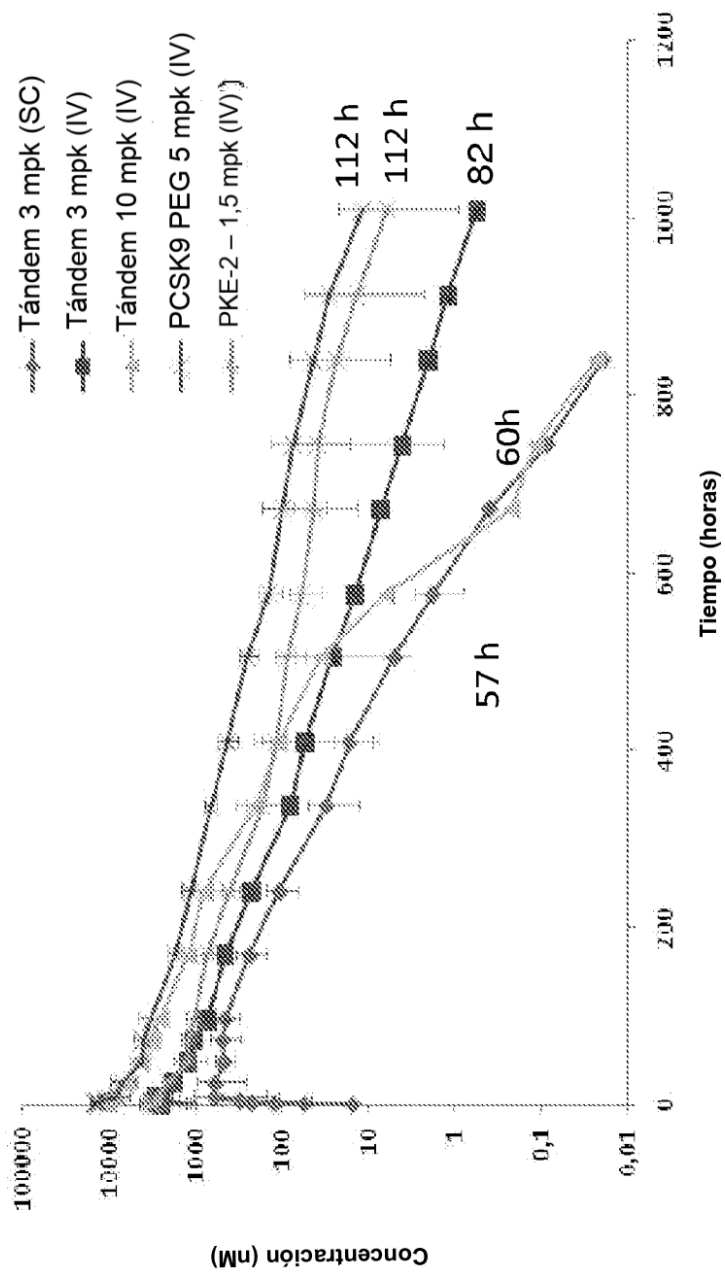


Figura 11

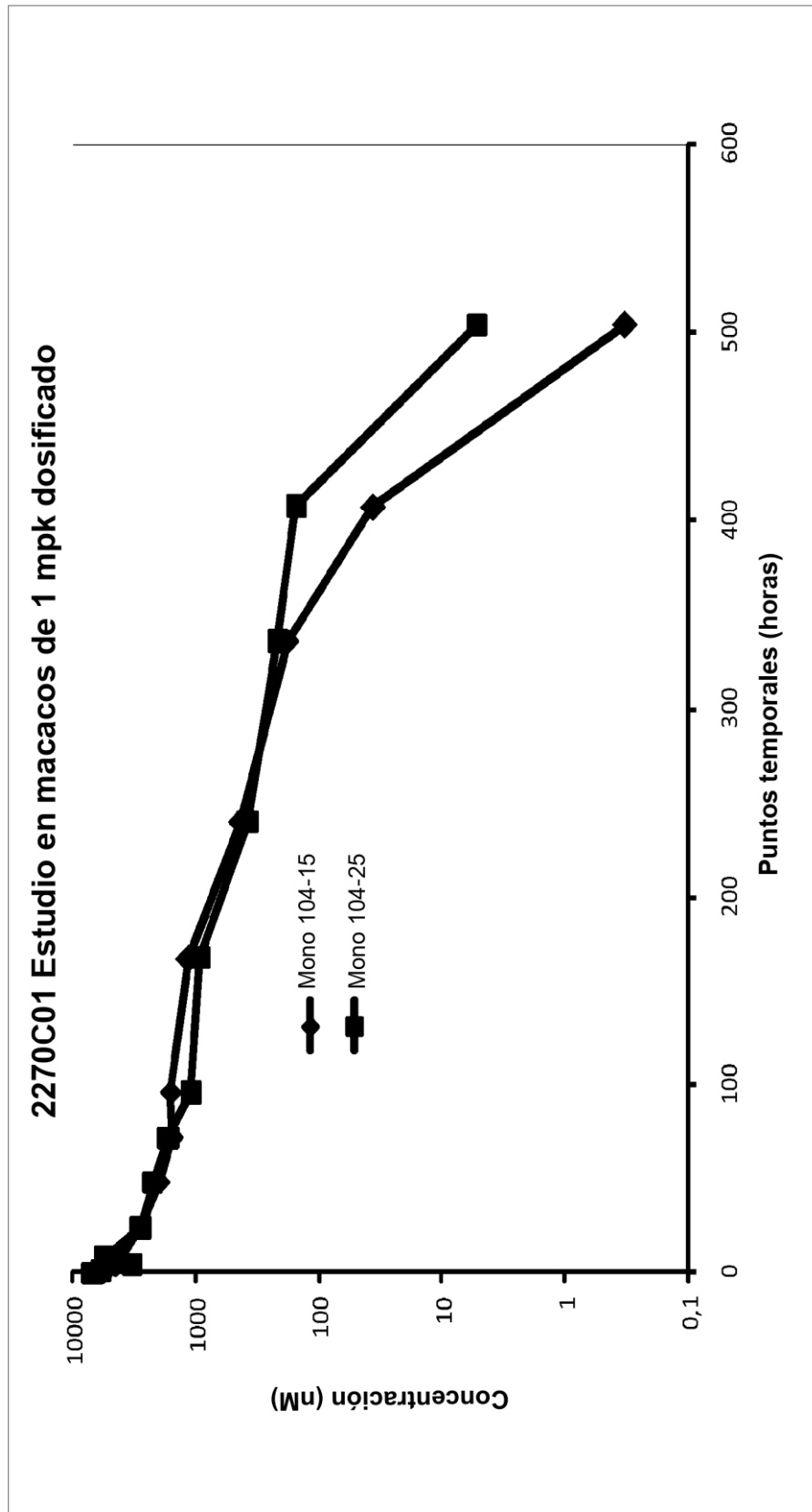


Figura 12

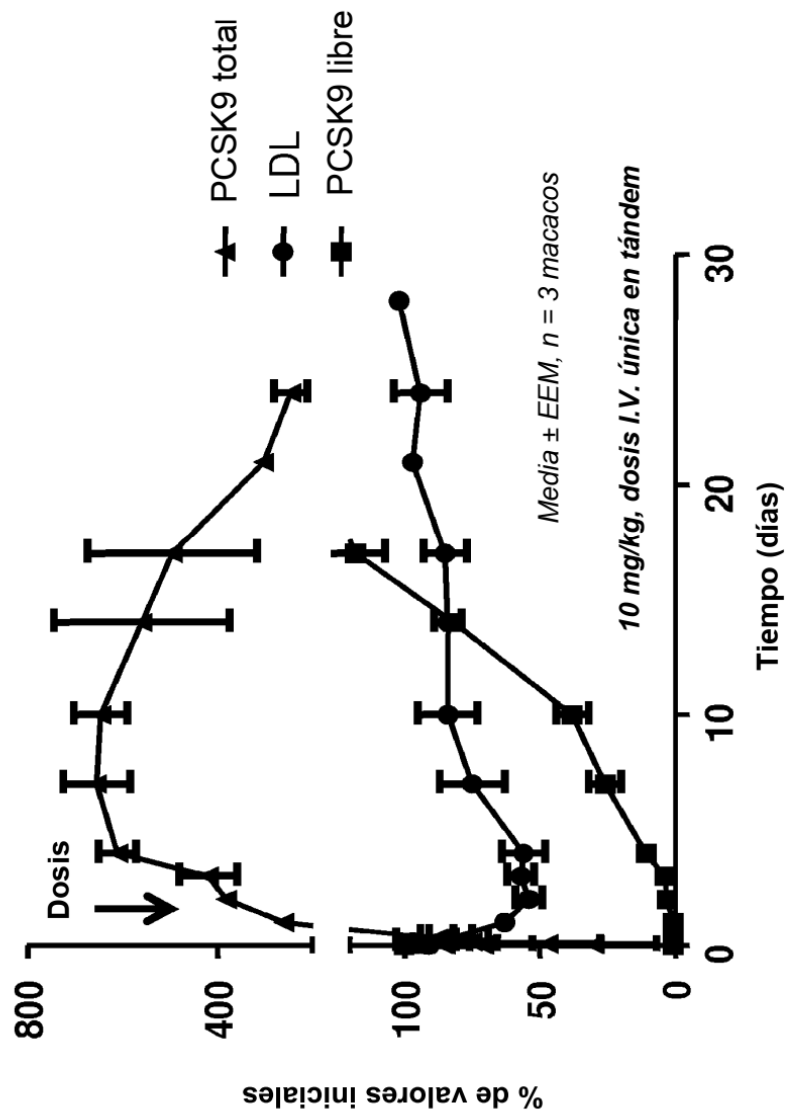


Figura 13

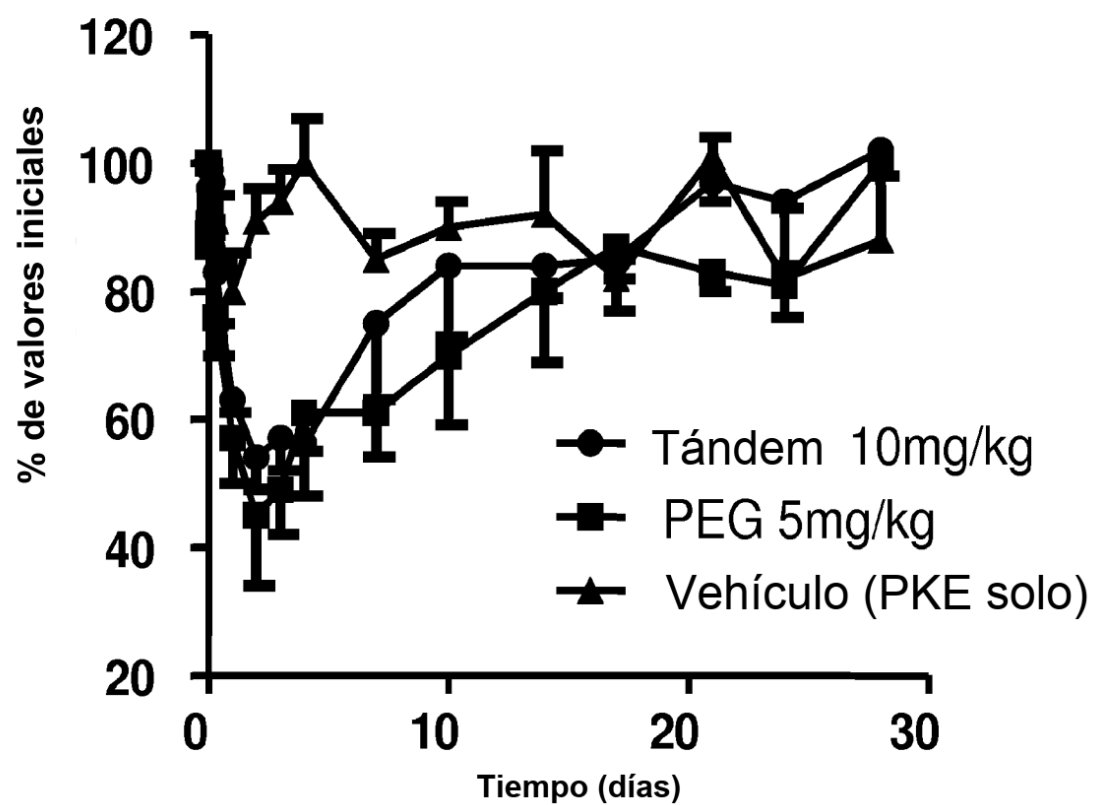


Figura 14

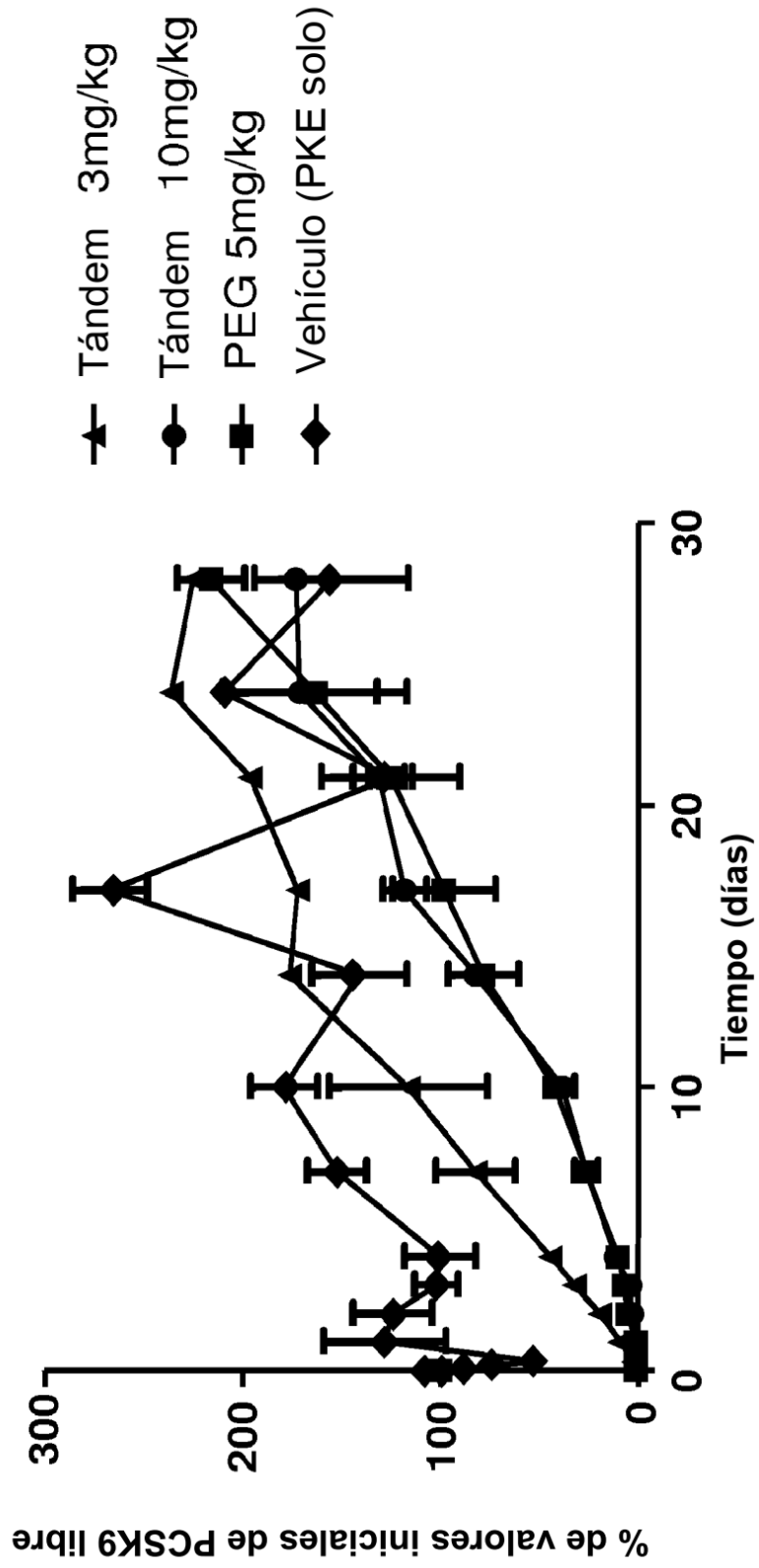


Figura 15

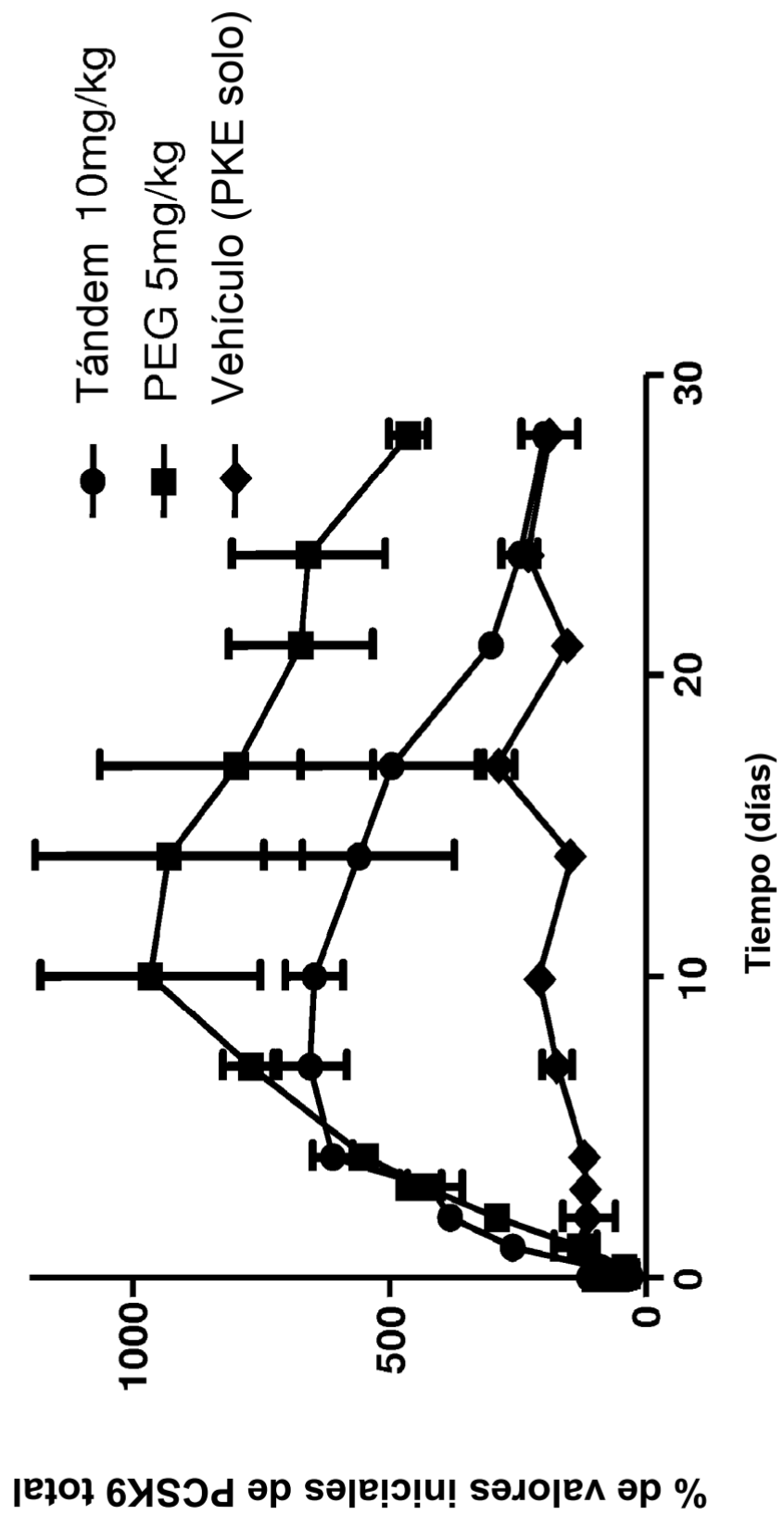


Figura 16

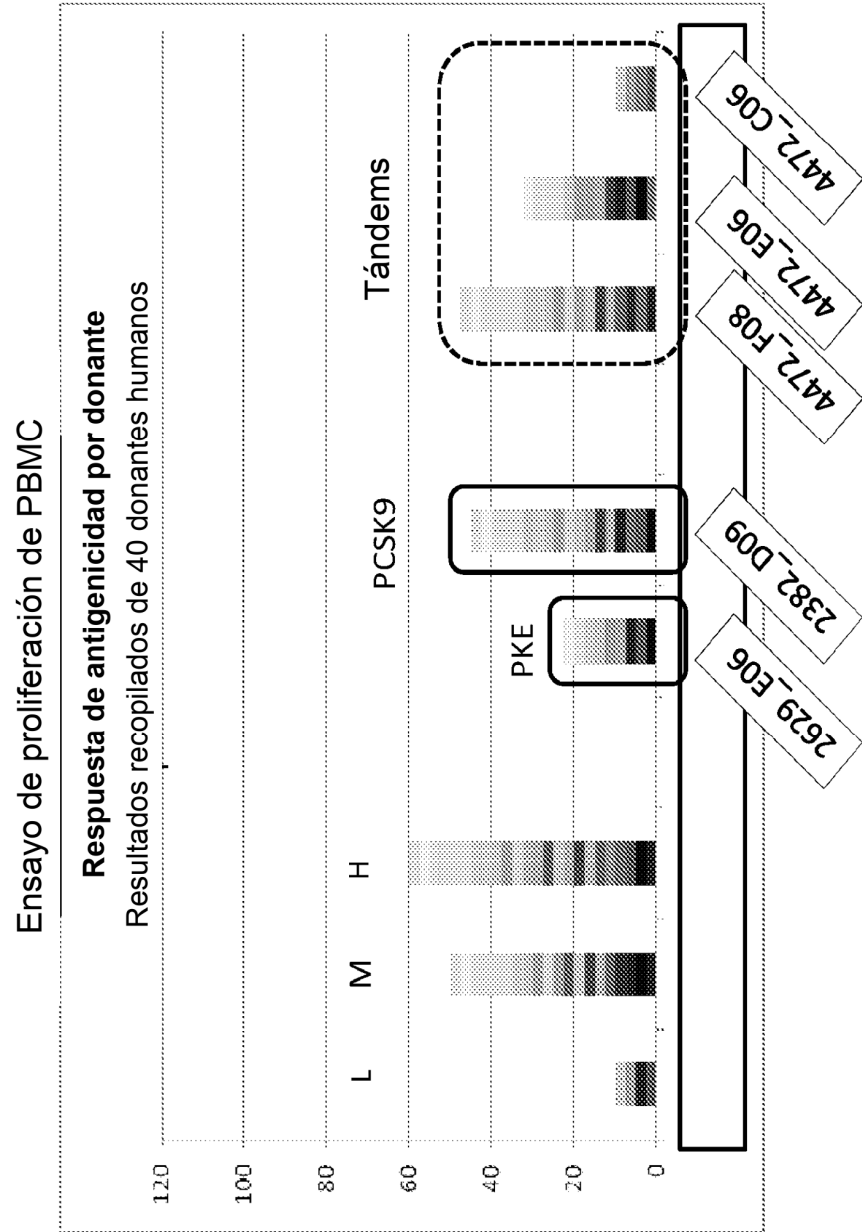


Figura 17

Adnectina	Secuencia proteica completa
2270_C01	MASTSGVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGWQVQMYSDWGPLYIYKEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2629_A09	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGRHVQIYSDGLPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2629_A11	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGRHVHIYSDWGPMMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2629_C10	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGREVKYISVLGPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2629_D09	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGREVQMYSDGLPLYIYSEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2629_E05	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGREVQKFSDWGPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2629_E06	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2629_F04	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGREVH QYSDWGPMMYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2629_H01	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGREVHKNSDWGTLIYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGEXPASSKPISINRYRTEIDKXSQHHHHHHH*
2629_H06	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGREVQKYSDLGPLYIAEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2629_H07	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGREVHLYSDWGPMMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2630_A02	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGRHVQMYSDGLPLYIYFSEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2630_A11	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGREVHMYSDFGPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2630_D02	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGREVQKYSDWGPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2630_D10	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGREVQMYSDGLPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2630_F04	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGREVQMYSDGLPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVGVIYIYAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2630_G03	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGRHVQIYSDGLPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2630_G10	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGREVQIYSDWGPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2630_H03	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGREVQKYSDWGPLYIYQEFVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKXSQHHHHHHH*
2631_B04	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGRHVHLYSEFGPMYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2631_E03	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGRDVMHMYSDWGPMMYIYQEFVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2631_G01	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGRHVQIYSDWGPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2631_G03	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGRVQLYSDWGPMMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2631_H09	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGRVQVQFSDGLPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
2632_G01	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGRVQVQIYSDWGPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*
4079_A04	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRRYRITYGRVQVQIYSDWGPLYIAEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVAVTSGESPASSKPISINRYRTEIDKPSQHHHHHHH*

Figura 18A

2270_C01	ATGGCTAGCACTAGTGGCGTGCCTGGAGTGGTTGCCGCGACCCGAGGTCTCTGCTTATTAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGAGATATTATCG CATTACATATGGTTGGCAGGTTACAGATCTGACTGGGGTCCGCTGTACATCTACAAGAGTTACGGTGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTC TCAAACTGGAGTTGATTACACATTACGGTATACGCACTACCGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAATTTCCATTATATCGACCGAAGCGAC AAACCATCCAGCACCATTACCAACCACTGA
2629_A09	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACAGCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCGGATATTACCGCAT CACTTACGGACGGCATGTTACAGATCTATTCTGACTTAGCCCGCTGTACATCTACAGAGTTCACTGTGCTGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAA ACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGCTGCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAAGCCAAATTTCCATTAAATACCGCACAGAAATTGACAAAC ATCCAGCACCATTACCAACCACTGA
2629_A11	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACAGCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCGGATATTACCGCAT CACTTACGGTAGACAGTTTACATATCTACTACAGACTGGGTCCGATGTACATCTACAGAGTTCACTGTGCTGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAA ACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGCTGCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAAGCCAAATTTCCATTAAATACCGCACAGAAATTGACAAAC ATCCAGCACCATTACCAACCACTGA
2629_C10	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACAGCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCGGATATTACCGCAT CACTTACGGGAGAGGTTTACAGAAATACTCTGCTTGGTCCACTGTACATATACAGGAGTTCACTGTGCTGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAA AACTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGCTGCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAAGCCAAATTTCCATTAAATACCGCACAGAAATTGACAAAC CATCCAGCACCATTACCAACCACTGA
2629_D09	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACAGCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCGGATATTACCGCAT CACTTACGGGAGGAGTTTACAGTACTCTGACTTGGTCCATTGTACGTATACAGGAGTTCACTGTGCTGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAA AACTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGCTGCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAAGCCAAATTTCCATTAAATACCGCACAGAAATTGACAAAC CATCCAGCACCATTACCAACCACTGA
2629_E05	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACAGCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCGGATATTACCGCAT CACTTACGGTGGGAGGTACAGAGTTCTCGGACTGGGTCCGCTGTACATCTACAGAGTTCACTGTGCTGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAA AACTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGCTGCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAAGCCAAATTTCCATTAAATACCGCACAGAAATTGACAAAC CATCCAGCACCATTACCAACCACTGA
2629_E06	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACAGCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCGGATATTACCGCAT CACTTACGGAGGAGGTTTACAGAGTACTCGGACTGGGTCCGCTGTACATCTACAGAGTTCACTGTGCTGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAA AACTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGCTGCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAAGCCAAATTTCCATTAAATACCGCACAGAAATTGACAAAC CATCCAGCACCATTACCAACCACTGA
2629_F04	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACAGCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCGGATATTACCGCAT CACTTACGGTAGGAGGTTTACATCACTGACTGGGTCCGATGTACATCTACAAGTTCATCTGCTGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAA AACTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGCTGCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAAGCCAAATTTCCATTAAATACCGCACAGAAATTGACAAAC CATCCAGCACCATTACCAACCACTGA
2629_H01	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACAGCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCGGATATTACCGCAT CACTTACGGTGGGAGGTTTACAGAGTACTGAGAGTGGGTAGCTGTACATCTACAGAGTTCACTGTGCTGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAA AACTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGCTGCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAAGCCAAATTTCCATTAAATACCGCACAGAAATTGACAAAC MCATCCAGCACCATTACCAACCACTGA
2629_H06	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACAGCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCGGATATTACCGCAT CACTTACGGAGGAGGTTTACAGAGTATTACAGATGTTTACATCTACGAGAGTTCACTGTGCTGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAA AACTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGCTGCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAAGCCAAATTTCCATTAAATACCGCACAGAAATTGACAAAC CATCCAGCACCATTACCAACCACTGA

Figura 18B

2629_H07	ATGGGAGTTTCTGATGTCGCGCGACCTGGAAAGTGTTGTCGCCACCCCAACCCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCCACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGCGGGAGGTCACCTGTAATCAGACTGGGGCCGATGTACATCTACACAGAGTTCACTGTGCCTGGGAGC AAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTAATGCTGATGCTGCTGAGAGAGCCCCCGCAAGCA GCAAGCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAAGCACCATCACCACCACTGA
2630_A02	ATGGGAGTTTCTGATGTCGCGCGACCTGGAAAGTGTTGTCGCCACCCCAACCCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCCACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGTAGGCAGTTCAAATGTACTGACCTTGGTCCGTTGTACATCTTACAGTGAATTCAGTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTAATGCTGCTGCTGAGAGAGCCCCCGCAAGCAG CAAGCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAAGCACCATCACCACCACTGA
2630_A11	ATGGGAGTTTCTGATGTCGCGCGACCTGGAAAGTGTTGTCGCCACCCCAACCCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCCACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGACGGGAGGTTCAATGTACTCTGACTTGGTCCGATGTACATCTACACAGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTAATGCTGCTGCTGAGAGAGCCCCCGCAAGCAG CAAGCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAAGCACCATCACCACCACTGA
2630_D02	ATGGGAGTTTCTGATGTCGCGCGACCTGGAAAGTGTTGTCGCCACCCCAACCCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCCACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGTAGAGAGTTTCAAGAAATCTCTGACTGGGGCCGCTTACATCTACATCTACAAAGTTCAGTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTAATGCTGCTGCTGAGAGAGCCCCCGCAAGCAG CAAGCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAAGCACCATCACCACCACTGA
2630_D10	ATGGGAGTTTCTGATGTCGCGCGACCTGGAAAGTGTTGTCGCCACCCCAACCCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCCACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGTCGGAGGTTTCAGATGTAATCGACTTGGTCCGCTCTACATCTACAAAGTTCAGTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTAATGCTGCTGCTGAGAGAGCCCCCGCAAGCAG CAAGCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAAGCACCATCACCACCACTGA
2630_F04	ATGGGAGTTTCTGATGTCGCGCGACCTGGAAAGTGTTGTCGCCACCCCAACCCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCCACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGTAGAGAGTCCAGATGTAATCAGACTTGGGGCCGCTTACATCTACAGAGTTCACTGTGCCTGGGAGC AAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTAATGCTGCTGCTGAGAGAGCCCCCGCAAGCA GCAAGCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAAGCACCATCACCACCACTGA
2630_G03	ATGGGAGTTTCTGATGTCGCGCGACCTGGAAAGTGTTGTCGCCACCCCAACCCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCCACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGACGGCATGTTTCAGATCTACTCCGACTTGGTCCGCTCTACATCTACAAAGTTCAGTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTAATGCTGCTGCTGAGAGAGCCCCCGCAAGCAG CAAGCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAAGCACCATCACCACCACTGA
2630_G10	ATGGGAGTTTCTGATGTCGCGCGACCTGGAAAGTGTTGTCGCCACCCCAACCCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCCACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGTCGGAGGTTCAAATTAATCTGACTGGGGTCCGCTGTATATATACAAAGTTCAGTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTAATGCTGCTGCTGAGAGAGCCCCCGCAAGCAG CAAGCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAAGCACCATCACCACCACTGA
2630_H03	ATGGGAGTTTCTGATGTCGCGCGACCTGGAAAGTGTTGTCGCCACCCCAACCCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCCACAGTG CSATATTACCGCATCACTTACGGACGTGAAGTRCAGAAATCTCTGACTGGGGCCGCTGTACATCTACAAAGTTCAGTGTGCCTGGGAGCR AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTAATGCTGCTGCTGAGAGAGCCCCCGCAAGCAG CAAGCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAAMCATCCCAAGCACCATCACCACCACTGA
2631_B04	ATGGGAGTTTCTGATGTCGCGCGACCTGGAAAGTGTTGTCGCCACCCCAACCCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCCACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGCAGGACGTACATTTGCTCGGAGTTCCGTCGATATATACAAAGTTCAGTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTAATGCTGCTGCTGAGAGAGCCCCCGCAAGCAG CAAGCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAAGCACCATCACCACCACTGA

Figura 18C

2631_E03	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCAT ATTACCGCATCACTTACGGTAGGGATGTCACATGCTACTCTGACTGGGTCGGATGTACATATACCAAGAGTTCACTGTGCTGGGAGCAAGTCCAC AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGATGCTGCTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAAATTT CCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGACCATCACCACCACTGA
2631_G01	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCAT ATTACCGCATCACTTACGGTAGGGATGTCACATATCTGACTGGGTCGGATGTACATCTACAAATGAGTTCACTGTGCTGGGAGCAAGTCCACA GCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGATGCTGCTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAAATTT CATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGACCATCACCACCACTGA
2631_G03	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCAT ATTACCGCATCACTTACGGAAAGTATGTTACGTATATCTGACTGGGTCGGATGTACATCTACCGAGTTCACTGTGCTGGGAGCAAGTCCACA GCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGATGCTGCTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAAATTT CATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGACCATCACCACCACTGA
2631_H09	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCAT ATTACCGCATCACTTACGGACGGCAAGTGAAGTGTCTCAGACTTGGTCCGCTGTACATATACCAAGAGTTCACTGTGCTGGGAGCAAGTCCAC AGTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGATGCTGCTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAAATTT CCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGACCATCACCACCACTGA
2632_G01	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCAT ATTACCGCATCACTTACGGTAGAGGTGAGATCTACTGACTGGGACCGCTGTACATCTACAAATGAGTTCACTGTGCTGGGAGCAAGTCCAC AGTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGATGCTGCTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAAATTT CCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGACCATCACCACCACTGA
3852_F10	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCCTGCTGATCAGCTGGGAGCTCCGGCTGTTGACGGTGCAT ATTACCGCATCACTTACGGCAACAGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCTGTTCTAAATCTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGATGCTCACTCCGTACGAATTCATTTCCCGTACACTCACTTACTCTTTAAACCAATTTCCATTAAATACC GCACAGAAATTGACAAACCATCCAGACCATCACCACCACTGA
4079_A04	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCAT ATTACCGCATCACTTACGGTAGGAGGTACAGATGTAATCTGACTGGGTCACCTTACATCTACCGGAGTTCACTGTGCTGGGAGCAAGTCCACA GCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGATGCTGCTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAAATTT CATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGACCATCACCACCACTGA
5190_E01	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCCTGCTGATCAGCTGGGAGCTCCGGCTGAAGGGTACGGT TATTACCGCATCACTTACGGCAACAGAGGCAATAGCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCTGTTCTAAAGGTACAGTACCATCAGCGGCCTTAA ACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGATGCTGCAATTCGATTCCCGGCGCGGTACTACCTACCTCAATTTCCATTAAATACCGGACCGA ACCGAGCACACCTCCGACCCGAGCTCCGTCAACACCCAGACCGCTACCGAGCGGAGTTTCTGACGTCCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCC ACCCCCACAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCATATACCGCATCACTACGGCAGGAGGTTTCAGAAAGTACTCGGACT TGGGTCCGTTGTACATCAACAGAGTTCACTGTGCTGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGCCTTAAACCTGCGCTTGAATTATACCATCACT GTGTATGCTGCTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAAATTTCCATTAAATACCGCACACCCGTGA