



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 984 405**

⑮ Int. Cl.:  
**C07K 14/435** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2013 E 20206702 (1)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024 EP 3835310**

⑮ Título: **Proteínas de dominio de andamio basadas en fibronectina que se unen a la miostatina**

⑯ Prioridad:

**13.09.2012 US 201261700697 P  
13.03.2013 US 201361780005 P**

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.10.2024**

⑮ Titular/es:

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

⑯ Inventor/es:

**CLOAD, SHARON;  
ENGLE, LINDA;  
LIPOVSEK, DASA;  
MADIREDDI, MALAVI;  
RAKESTRAW, GINGER, CHAO;  
SWAIN, JOANNA F.;  
ZHAO, WENJUN;  
WEI, HUI;  
YAMNIUK, AARON, P.;  
KOZHICH, ALEXANDER, T.;  
RAMAMURTHY, VIDHYASHANKAR;  
CORBETT, MARTIN, J. y  
KRYSTEK, STANLEY, RICHARD, JR.**

⑯ Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

### Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 2 984 405 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Proteínas de dominio de andamio basadas en fibronectina que se unen a la miostatina

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a proteínas de dominio de andamio basadas en fibronectina que se unen a la miostatina. La invención también se refiere al uso de proteínas innovadoras en aplicaciones terapéuticas para tratar enfermedades de desgaste muscular y trastornos metabólicos. La invención se refiere además a células que comprenden tales proteínas, a polinucleótidos que codifican tales proteínas y a vectores que comprenden los polinucleótidos que codifican las proteínas innovadoras.

10 **Antecedentes de la invención**

15 La miostatina, también conocida como factor de crecimiento y diferenciación 8 (GDF-8), es un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) de factores de crecimiento secretados. La miostatina tiene todas las características estructurales comunes a las proteínas de la familia TGF- $\beta$ : un extremo amino hidrófobo que actúa como una señal secretora, nueve restos de cisteína invariantes y un sitio de procesamiento proteolítico de tipo furina "RXXR". La escisión proteolítica de la proteína da lugar a un dominio C-terminal que forma un homodímero que es la forma biológicamente activa de la miostatina (Thies *et al.*, *Growth Factors* 2001;18(4):251-9). Las alineaciones del fragmento C-terminal de las secuencias de aminoácidos de miostatina de múltiples especies de vertebrados revelan que la proteína está altamente conservada (100 % de identidad) entre ser humano, mono, vaca, perro, ratón, rata, pavo y pollo (McPherron, *et al.* *PNAS*, 94:12457-61, 1997).

20 25 La expresión de miostatina se limita principalmente al músculo esquelético y al tejido adiposo, donde se ha demostrado que es un regulador negativo del desarrollo del músculo esquelético (Lee LS, *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem*. 2010;10:183-194). En mamíferos, el músculo esquelético parece ser el principal tejido diana de la miostatina, donde se une a los receptores de la superficie celular, dando lugar a pérdida de masa muscular. Los ratones y el ganado con deficiencias genéticas de miostatina exhiben aumentos drásticos en la masa del músculo esquelético, es decir, el fenotipo de "doble musculatura", respaldando de esta manera el papel de la miostatina en la supresión del crecimiento muscular (McPherron y Lee, *Proc Natl Acad Sci USA*. 23 de dic de 2003;100(26):15842-6). La hipertrofia muscular en las razas de ganado azul belga y piémontés se debe a una mutación sin sentido en el tercer exón del gen de la miostatina bovina (Bass *et. al.*, *Domest Anim Endocrinol*. 1999;17(2-3):191-7). La sobreexpresión transgénica de inhibidores de miostatina también produce hipermuscularidad. El aumento del crecimiento muscular en estos animales 30 35 se debe a un aumento tanto en el número de células, o crecimiento hiperplásico, como en el tamaño de las células, o crecimiento hipertrófico, que da como resultado miofibras más grandes y pesadas. También se ha informado en seres humanos un aumento de la masa del músculo esquelético debido a una mutación de la miostatina. La inhibición de la miostatina aumenta eficazmente la masa y la fuerza del músculo esquelético, tanto en el período posnatal como en adultos.

40 45 Los aumentos en la masa y la fuerza del músculo esquelético también están asociados a adaptaciones metabólicas que afectan positivamente a la composición corporal, el gasto de energía, la homeostasis de la glucosa y los requisitos de insulina. Tanto los descubrimientos genéticos como los farmacológicos indican que la miostatina regula el metabolismo energético y que su inhibición puede atenuar significativamente la progresión de las enfermedades metabólicas, incluyendo la obesidad y la diabetes. Por ejemplo, los ratones sin miostatina exhiben una menor acumulación de grasa corporal (McPherron & Lee, *J. JCI* 109:595, 2002) en comparación con ratones de tipo silvestre de la misma edad. Esta reducción de la grasa corporal es una manifestación de una reducción del número y tamaño de los adipocitos, lo que implica un papel importante de la miostatina en la adipogénesis así como en la miogénesis.

50 55 En consecuencia, la miostatina es una diana deseable para la intervención terapéutica o profiláctica para el tratamiento de trastornos o afecciones que se beneficiarían de un aumento de la masa muscular, la fuerza muscular y/o el metabolismo (por ejemplo, distrofia muscular, fragilidad, atrofia por desuso y caquexia), trastornos asociados a la atrofia muscular (por ejemplo, nefropatía, insuficiencia o enfermedad cardíaca y enfermedad hepática) y trastornos metabólicos (por ejemplo, diabetes de tipo II, síndrome metabólico, obesidad y artrosis).

60 En consecuencia, sería ventajoso obtener proteínas de andamio de dominio de fibronectina mejoradas que se unen a miostatina para el tratamiento terapéutico de, por ejemplo, trastornos metabólicos, trastornos de atrofia muscular y pérdida de masa muscular debido a la inactividad.

65 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de Adnectinas que se unen a y antagonizan la miostatina. Específicamente, las Adnectinas antimiotiostatina de la presente invención inhiben la actividad de la miostatina, afectando de esta manera a la señalización SMAD descendente. Un mecanismo que explica la señalización SMAD alterada de algunas de las Adnectinas antimiotiostatina de la invención implica la inhibición del reclutamiento de Alk4 en el complejo miostatina-ActRIIb, cuyas consecuencias fisiológicas son el aumento del volumen muscular y del

peso corporal.

- En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido que comprende un décimo dominio tipo III de fibronectina (<sup>10</sup>Fn3), en donde el dominio <sup>10</sup>Fn3 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281. El polipéptido de la invención tiene los bucles BC, DE y FG como se establece en las SEQ ID NO: 34, 39 y 75, respectivamente, y comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 331 [secuencia central de Adnectina de PRD-1474 y 3116\_A06 sin una secuencia líder N-terminal o cola C-terminal].
- En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 264, 269 y 273. En otras realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 118 [3116\_06], 264 [PRD-1288], 269 [PRD-1305] y 273 [PRD-1474].
- En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a las regiones no BC, DE y FG de SEQ ID NO: 118, 273, 281 o 331.
- Los polipéptidos de la invención se unen a un sitio de unión discontinuo de Adnectina en la miostatina. Los polipéptidos de la invención se unen dentro de dos regiones, aminoácidos 85-101 y 55-66, de la miostatina (SEQ ID NO: 3).
- Los polipéptidos de la invención no compiten por la unión a la miostatina con ActRIIB. Los polipéptidos de la invención compiten por la unión a miostatina con ALK4 y/o ALK5.
- En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos anteriormente pueden comprender uno o más restos farmacocinéticos (PK) tales como polietilenglicol, ácido siálico, Fc, fragmento Fc, transferrina, seroalbúmina, una proteína fijadora de seroalbúmina y una proteína fijadora de inmunoglobulina sérica. En una realización, el resto PK es una proteína de unión a albúmina sérica que comprende un dominio <sup>10</sup>Fn3 que se une a, por ejemplo, HSA. En otra realización, el resto PK es Fc y puede estar en el extremo N o C del polipéptido y, opcionalmente, formar un dímero. En aún otras realizaciones, el resto PK es polietilenglicol. En algunas realizaciones, el resto PK y el polipéptido están unidos mediante al menos un enlace disulfuro, un enlace peptídico, un polipéptido, un azúcar polimérico o un resto de polietilenglicol.
- En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido descrito anteriormente, que opcionalmente está libre de endotoxinas.
- En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido descrito anteriormente, un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos, y una célula que comprende el ácido nucleico que codifica el polipéptido.
- En otro aspecto, la invención proporciona el polipéptido o la composición de la invención para su uso en un método para tratar una enfermedad muscular, un trastorno neurológico o metabólico asociado a atrofia muscular y/o atrofia muscular, o un trastorno degenerativo óseo.
- Además, la divulgación proporciona un método para producir el polipéptido antimiostatina cultivando la célula.
- Además, la divulgación proporciona un método para atenuar o inhibir una enfermedad o un trastorno relacionados con la miostatina en un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz del polipéptido o la composición que comprende un polipéptido descrito anteriormente. La enfermedad a tratar puede ser distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica, miositis por cuerpos de inclusión (MCI), enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, cáncer, SIDA, insuficiencia renal, enfermedad renal crónica, uremia, artritis reumatoide, sarcopenia, pérdida de masa muscular debido al reposo prolongado en cama, lesión de la médula espinal, ictus, fractura ósea, envejecimiento, diabetes, obesidad, hiperglucemia, caquexia, artrosis, osteoporosis, infarto de miocardio o fibrosis.
- Además, la divulgación proporciona un método para atenuar o inhibir un trastorno asociado con la degeneración o la atrofia muscular en un sujeto.
- Además, la divulgación proporciona un método de administración del polipéptido para aumentar la masa muscular, aumentar el número de células musculares, aumentar el tamaño de las células musculares, aumentar la fuerza muscular, el rendimiento físico y/o la resistencia en el sujeto.
- Además, la divulgación proporciona un método para atenuar o inhibir un trastorno metabólico en un sujeto. El trastorno metabólico puede ser diabetes (por ejemplo, diabetes tipo II), hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, resistencia a insulina, metabolismo de la glucosa alterado, lipodistrofia, obesidad o síndrome metabólico. Opcionalmente, puede administrarse una segunda composición terapéutica. La administración del polipéptido puede dar como resultado sensibilidad a la insulina aumentada, captación de la glucosa por las células aumentada, niveles de glucosa en sangre disminuidos y/o grasa corporal disminuida.

Además, la divulgación proporciona un método para mejorar la masa muscular magra en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un polipéptido o una composición descritos anteriormente.

5 Además, la divulgación proporciona un método para aumentar la proporción de masa muscular magra a grasa en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un polipéptido o una composición descritos anteriormente.

Además, la divulgación proporciona kits que comprenden un polipéptido o una composición descritos anteriormente e instrucciones de uso.

10 Además, la divulgación proporciona métodos para detectar o medir miostatina en una muestra que comprenden poner en contacto la muestra con un polipéptido descrito anteriormente y detectar o medir la unión del polipéptido a miostatina.

15 Además, la divulgación se refiere a Adnectinas de unión a antimiostatina para su uso en atenuar o inhibir una enfermedad o trastorno relacionado con la miostatina, atenuar o inhibir un trastorno asociado a la degeneración o desgaste del músculo, aumentar la masa muscular, aumentar el número de células musculares, aumentar el tamaño de las células musculares, aumentar la fuerza muscular, el rendimiento físico y/o la resistencia, atenuar o inhibir un trastorno metabólico, mejorar la masa muscular magra y/o aumentar la proporción de masa muscular magra a grasa, en un sujeto. Las Adnectinas antimiostatina pueden ser aquellas descritas en el presente documento, por ejemplo, las Adnectinas antimiostatina expuestas en SEQ ID NO: 80-123, 228-239 y 252-273.

25 Las Adnectinas de unión a antimiostatina pueden usarse para preparar un medicamento para atenuar o inhibir una enfermedad o un trastorno relacionados con la miostatina, atenuar o inhibir un trastorno asociado a la degeneración o desgaste del músculo, aumentar la masa muscular, aumentar el número de células musculares, aumentar el tamaño de las células musculares, aumentar la fuerza muscular, el rendimiento físico y/o la resistencia, atenuar o inhibir un trastorno metabólico, mejorar la masa muscular magra y/o aumentar la proporción de masa muscular magra a grasa, en un sujeto. Las Adnectinas antimiostatina pueden ser aquellas descritas en el presente documento, por ejemplo, las Adnectinas antimiostatina expuestas en SEQ ID NO: 80-123, 228-239 y 252-273.

### 30 Breve descripción de las figuras

35 La **Figura 1** muestra una alineación de secuencias de aminoácidos de Adnectina antimiostatina ilustrativas. Las secuencias de aminoácidos de los bucles BC, DE y FG se identifican subrayado, cursiva/subrayado o negrita/subrayado, respectivamente.

40 La **Figura 2** representa un análisis basado en WebLogo de los diversos restos del bucle BC de la familia 1979\_B06 de Adnectinas antimiostatina. Se indica la frecuencia de aminoácidos en cada posición del bucle BC que se variaron durante PROfusion. La imagen fue creada usando WebLogo (Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. Genome Research 2004;14:1188-1190).

45 La **Figura 3** representa un análisis basado en WebLogo de los diversos restos del bucle DE de la familia 1979\_B06 de Adnectinas antimiostatina. Se indica la frecuencia de aminoácidos en cada posición del bucle DE que se variaron durante PROfusion.

50 La **Figura 4** representa un análisis basado en WebLogo de los diversos restos del bucle FG de la familia 1979\_B06 de Adnectinas antimiostatina. Se indica la frecuencia de aminoácidos en cada posición del bucle FG que se variaron durante PROfusion.

55 La **Figura 5** representa un análisis basado en WebLogo de los diversos restos del bucle BC de la familia 2062\_G02 de Adnectinas antimiostatina. Se indica la frecuencia de aminoácidos en cada posición del bucle BC que se variaron durante PROfusion.

60 La **Figura 6** representa un análisis basado en WebLogo de los diversos restos del bucle DE de la familia 2062\_G02 de Adnectinas antimiostatina. Se indica la frecuencia de aminoácidos en cada posición del bucle DE que se variaron durante PROfusion.

65 La **Figura 7** representa un análisis basado en WebLogo de los diversos restos del bucle FG de la familia 2062\_G02 de Adnectinas antimiostatina. Se indica la frecuencia de aminoácidos en cada posición del bucle FG que se variaron durante PROfusion.

La **Figura 8** representa un gráfico que muestra la correlación de datos bioquímicos y celulares para proteínas mutantes de alanina discretas de Adnectina 3116\_A06, con su aptitud relativa en el escaneo mutacional profundo según la posición de la secuencia.

65 La **Figura 9** representa un gráfico que muestra la correlación de ER<sup>norm</sup> del escaneo mutacional profundo NGS de

mutaciones de alanina de Adnectina 3116\_A06 con la IC50 medida por HTRF. Se indican los grupos para mutaciones de sitio único preferibles, más preferibles y lo más preferibles para la unión a miostatina.

5 La **Figura 10** representa un gráfico de un ensayo de unión competitiva (ELISA competitivo) que muestra que las Adnectinas PRD-1285, PRD-1286 y PRD-1288 no bloquean la unión de miostatina a ActRIIb-Fc. Se indica el % de competición de unión de ActRIIb-Fc a miostatina. Como se esperaba, la construcción ActRIIb-Fc de control positivo compitió con la unión de ActRIIb-Fc a la miostatina.

10 La **Figura 11** representa un gráfico que muestra los efectos de varias concentraciones de Adnectinas PRD-1285, PRD-1286 y PRD-1288 sobre la actividad de miostatina en un ensayo de ARE-luciferasa. Las condiciones experimentales son las descritas en el Ejemplo 3. Cada una de PRD-1285, PRD-1286 y PRD-1288 inhibió el 100 % de la actividad ARE-luciferasa inducida por miostatina.

15 La **Figura 12** es un esquema que representa el mecanismo de acción mediante el cual las Adnectinas de la presente invención inhiben la actividad de la miostatina. El complejo de señalización nativo se muestra en la **Fig. 12A**. Específicamente, la unión de miostatina a ActRIIb va seguida por el reclutamiento de quinasa similar al receptor de activina 4 (ALK4) o ALK5, y ActRIIb y ALK4/5 se unen a distintas regiones de miostatina. Las Adnectinas de la presente invención previenen la unión de ALK4/5, pero no ActRIIb, a la miostatina (**Fig. 12B**).

20 La **Figura 13** muestra un modelo computacional que representa el complejo de 3116\_A06 y miostatina. La **Fig. 13A** muestra la estructura de la miostatina sola (gris), con los sitios de unión de ALK4 y los sitios de unión de ActRIIB indicados. Las regiones donde 3116\_A06 se une a la miostatina (es decir, las regiones 1 y 2) se indican en negro, como se determina a partir de los experimentos descritos en el Ejemplo 11. La **Fig. 13B** muestra un complejo preferido de 3116\_A06 (negro) y miostatina (gris) derivado de un protocolo de acoplamiento como se describe en el Ejemplo 12. Las regiones de miostatina 1 y 2 identificadas mediante HDX-MS (Ejemplo 11) se representan con espacio de relleno en un lado de la molécula únicamente, y los bucles BC, DE y FG de 3116\_A06 se representan en representación lineal. Aunque esta figura muestra una Adnectina unida a uno de los dos sitios de unión de Adnectina, cabe señalar que cualquiera de los sitios de unión de Adnectina individuales o ambos sitios de unión de Adnectina, podría estar ocupado.

30 La **Figura 14** representa un gráfico de barras que muestra aumentos porcentuales en el peso corporal el día 15 en ratones tratados con las Adnectinas antimiostatina indicadas en comparación con ratones de control. Los ratones B6 SCID fueron tratados quincenal o semanalmente con inyecciones subcutáneas de Adnectinas antimiostatina durante 14 días, como se describe en el Ejemplo 13. Se midieron los pesos corporales durante todo el período de tratamiento; se representan los valores de cambio porcentual calculados para el día 15. (\*= indica diferencias estadísticas con respecto al grupo de control respectivo;  $p \leq 0,01$  prueba de la *t*).

40 La **Figura 15** Representa un gráfico de barras que muestra aumentos en el volumen de los músculos de las piernas (en  $\text{cm}^3$ ) el día 15 en ratones tratados con las Adnectinas antimiostatina indicadas en comparación con ratones de control. Los ratones B6 SCID fueron tratados quincenal o semanalmente con inyecciones subcutáneas de Adnectinas antimiostatina durante 14 días como se describe en el Ejemplo 13. (\*= indica diferencias estadísticas con respecto al grupo de control respectivo;  $p \leq 0,05$  prueba de la *t*).

45 La **Figura 16** representa un gráfico de barras que muestra aumentos en el volumen de los músculos de las piernas (en  $\text{cm}^3$ ) el día 28 en ratones tratados con las distintas dosis indicadas de PRD-1474. Los ratones B6 SCID fueron tratados quincenal o semanalmente con inyecciones subcutáneas de PRD-1474 durante 28 días como se describe en el Ejemplo 14. ( $*p < 0,0001$ ; # no significativo entre grupos).

#### 50 Descripción detallada de la invención

##### 55 Definiciones

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la materia entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de la invención descrita también pueden usarse 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.

60 "Miostatina de longitud completa" como se usa en el presente documento se refiere a la secuencia polipeptídica de longitud completa descrita en McPherron *et al.* (1997), anteriormente citado, así como polipéptidos de longitud completa relacionados que incluyen variantes alélicas y homólogos entre especies. El término "miostatina" o la expresión "miostatina madura" se refiere a fragmentos de la miostatina madura biológicamente activa, así como polipéptidos relacionados que incluyen variantes alélicas, variantes de corte y empalme y péptidos y polipéptidos de fusión. Se ha informado que la proteína C-terminal madura tiene una identidad de secuencia del 100 % en muchas especies, incluyendo ser humano, ratón, pollo, porcino, pavo y rata (Lee *et al.*, PNAS 2001;98:9306). La secuencia de la prepromiostatina humana es:

MQKLQLCVIYIYLMLIVAGPVDLNENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIK  
 IQILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLRELIIDQYDVQRDDSSDGSLLEDDDYHATTE  
 TIITMPTESDFLMQVDGKPCKCCFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQIL  
 RLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMNPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDE  
 NGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLLEVKTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTV  
 FEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKM  
 SPINMLYFNGKEQIYKGKIPAMVVDRGCS (SEQ ID NO: 1)

La secuencia de la promiostatina humana es:

NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDVIRQLLP  
 KAPPLRELIIDQYDVQRDDSSDGSLLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPCKCCFF  
 KFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMN  
 5 GTGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLLEV  
 KVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGE  
 CEFVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIYKGKIPAMVV  
 DRGCS (SEQ ID NO: 2)

10 La secuencia de la miostatina madura (conservada en ser humano, murino, rata, pollo, pavo, perro, caballo y cerdo) es:

DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQKYPH  
 THLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIYKGKIPAMVVDRGCS (SEQ  
 ID NO: 3).

15 "Polipéptido" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier secuencia de dos o más aminoácidos, independientemente de la longitud, de la modificación postraduccional o de la función. "Polipéptido", "péptido", y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento. Los polipéptidos pueden incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales tales como aquellos descritos en la Pat. de EE.UU. N.º 6.559.126. Los polipéptidos también pueden modificarse mediante cualquiera de diversas formas químicas habituales (por ejemplo, un aminoácido puede estar modificado con un grupo protector; el aminoácido carboxilo terminal puede convertirse en un grupo amida terminal; el resto amino terminal puede modificarse con grupos para, por ejemplo, mejorar la lipofilia; o el polipéptido puede glucosilarse químicamente o modificarse 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). Los péptidos de la invención son proteínas derivadas del décimo dominio tipo III de fibronectina que se han modificado para unirse a miostatina y se denominan en el presente documento, "Adnectina antimiostatina" o "Adnectina miostatina".

20 Una "cadena polipeptídica", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido en donde cada uno de sus dominios está unido a otro dominio o dominios mediante enlace o enlaces peptídicos, en oposición a las interacciones no covalentes o los enlaces disulfuro.

25 Una "cadena polipeptídica" es uno que se ha identificado y se ha separado y/o se ha 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 realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta más de un 95 % en peso de polipéptido determinado por el método de Lowry y lo más preferentemente más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos restos de la secuencia de aminoácidos del N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condición reductora o no reductora usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. Un polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* con células recombinantes ya que no estará presente al menos un componente del entorno natural del polipéptido.

Habitualmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

"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 fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin tener en cuenta ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades del experto en la materia, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles al público tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o el programa informático Megalign (DNASTAR™). Aquellos expertos en la materia pueden determinar fácilmente 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. Por ejemplo, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que puede citarse, como alternativa, como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue: 100 veces la fracción X/Y donde X es el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias 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.

Como se usa en el presente documento, "sustitución conservativa" denota la sustitución de un resto de aminoácido por otro, sin alterar la conformación y la función general del péptido, incluyendo, pero no limitado a, remplazo de un aminoácido por uno que tenga propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, ácido, básico, forma, hidrófobo, aromático y similares). Los aminoácidos con propiedades similares son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, arginina, histidina y lisina son aminoácidos básicos hidrófilos y pueden ser intercambiables. De forma similar, isoleucina, un aminoácido hidrófobo, puede remplazarse por leucina, metionina o valina. Los aminoácidos hidrófilos neutros, que pueden sustituirse unos por otros, incluyen asparagina, glutamina, serina y treonina. Por "sustituidos" o "modificados" la presente invención incluye aquellos aminoácidos que han sido alterados o modificados a partir de aminoácidos naturales. Como tal debe entenderse que en el contexto de la presente invención una sustitución conservativa se reconoce en la técnica como una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sitio de unión de Adnectina" se refiere al sitio o la porción de una proteína (por ejemplo, miostatina) que interactúa o se une a una Adnectina particular (por ejemplo, cuando un anticuerpo reconoce un epítopo). Los sitios de unión de Adnectina pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos o a partir de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los sitios de unión de Adnectina formados por aminoácidos contiguos normalmente se retienen tras la exposición a disolventes desnaturalizantes, mientras que los sitios de unión de Adnectina formados por plegamiento terciario normalmente se pierden con el tratamiento con disolventes desnaturalizantes.

Un sitio de unión de Adnectina para una Adnectina antimiotatina de la invención puede determinarse mediante la aplicación de técnicas convencionales normalmente usadas para el mapeo de epítopos de anticuerpos incluyendo, pero no limitado al mapeo de proteasas y análisis mutacional. Como alternativa, puede determinarse un sitio de unión de Adnectina mediante ensayo de competición usando una Adnectina de referencia o un anticuerpo que se une al mismo polipéptido, por ejemplo, miostatina (como se describe más detalladamente a continuación en la sección "Adnectinas de competición cruzada y/o Adnectinas que se unen al mismo sitio de unión de Adnectina". Si la Adnectina de prueba y la molécula de referencia (por ejemplo, otra Adnectina o anticuerpo) compiten, entonces se unen al mismo sitio de unión de Adnectina o a sitios de unión de Adnectina lo suficientemente proximales como para que la unión de una molécula interfiera con la otra.

Las expresiones "se une específicamente", "unión específica", "unión selectiva", y "se une selectivamente", como se usan indistintamente en el presente documento se refieren a una Adnectina que muestra afinidad por una miostatina, pero no se une significativamente (por ejemplo, menos de aproximadamente el 10 % de unión) a un polipéptido diferente medido mediante una técnica disponible en la técnica tal como, pero no limitado a, 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 miostatina.

La expresión "se une preferentemente" como se usa en el presente documento se refiere a la situación en la que una Adnectina de la invención se une a miostatina al menos aproximadamente un 20 % más de lo que se une a un polipéptido diferente medido mediante una técnica disponible en la técnica tal como, pero no limitado a, Análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva (por ejemplo, ELISA de competición, ensayo BIACORE).

Como se usa en el presente documento, la expresión "reactividad cruzada" se refiere a una Adnectina que se une a más de una proteína distinta que tiene sitios de unión de Adnectina idénticos o muy similares.

- El término " $K_D$ ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de equilibrio de disociación de una interacción particular Adnectina-proteína (por ejemplo, miostatina) o la afinidad de una Adnectina por una proteína (por ejemplo, miostatina), 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 sea suficiente para los fines contemplados. Por ejemplo, una  $K_D$  deseada puede referirse a la  $K_D$  de una Adnectina necesaria para provocar un efecto funcional en un ensayo *in vitro*, por ejemplo, un ensayo de luciferasa basado en células.
- 5 El término " $K_{ass}$ ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de velocidad de asociación para la asociación de una Adnectina en el complejo Adnectina/proteína.
- 10 El término " $K_{diss}$ ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de velocidad de disociación para la disociación de una Adnectina del complejo Adnectina/proteína.
- 15 El término " $IC_{50}$ ", como se usa en el presente documento, se refiere a la concentración de una Adnectina que inhibe una respuesta, ya sea en un ensayo *in vitro* o en un ensayo *in vivo*, a un nivel que es el 50 % de la respuesta inhibidora máxima, es decir, la mitad entre la respuesta inhibidora máxima y la respuesta no tratada.
- 20 La expresión "actividad de miostatina" como se usa en el presente documento se refiere a una o más de las actividades morfogenéticas o reguladoras del crecimiento asociadas a la unión de la proteína miostatina activa a ActRIIb y el posterior reclutamiento de Alk4 o Alk5. Por ejemplo, la miostatina activa es un regulador negativo de la masa del músculo esquelético. La miostatina activa también puede modular la producción de enzimas específicas del músculo (por ejemplo, creatina quinasa), estimular la proliferación de mioblastos y modular la diferenciación de preadipocitos a adipocitos. La actividad de la miostatina puede determinarse usando métodos reconocidos en la técnica, tales como
- 25 aquellos descritos en el presente documento.
- 30 Las expresiones "inhibir la actividad de la miostatina" o "antagonizar la actividad de la miostatina" o "antagonizar la miostatina" se usan indistintamente para referirse a la capacidad de las Adnectinas anti-miostatina de la presente invención para neutralizar o antagonizar una actividad de la miostatina *in vivo* o *in vitro*. Los términos "inhibir" o "neutralizar" como se usan en el presente documento con respecto a una actividad de una Adnectina de la invención significan la capacidad de sustancialmente antagonizar, prohibir, prevenir, restringir, ralentizar, romper, eliminar, detener, reducir o revertir, por ejemplo, la progresión o la gravedad de lo que se está inhibiendo incluyendo, pero no limitado a, una actividad o una propiedad biológica, una enfermedad o una afección. La inhibición o la neutralización es preferentemente de al menos aproximadamente un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 % o más alta.
- 35 Por ejemplo, una Adnectina antimiostatina de la invención puede reducir los niveles circulantes de miostatina biológicamente activa que normalmente se encuentran en un sujeto vertebrado, o una reducción de los niveles circulantes de miostatina biológicamente activa en sujetos con trastornos que dan como resultado niveles circulantes elevados de miostatina. Puede determinarse una reducción de la actividad de la miostatina usando ensayos *in vitro*, por ejemplo, ensayos de unión, como se describe en el presente documento. Como alternativa, una reducción de la actividad de la miostatina puede provocar un aumento del peso corporal, masa muscular mejorada, fuerza muscular aumentada, una alteración en la proporción de músculo a grasa, un aumento de la masa muscular libre de grasa, un aumento en el tamaño y/o número de células musculares y/o una reducción en el contenido de grasa corporal.
- 40 45 La expresión "PK" es un acrónimo de "farmacocinético" y abarca propiedades de un compuesto incluyendo, a modo de ejemplo, absorción, distribución, metabolismo y eliminación por parte de un sujeto. Una "proteína de modulación de PK" o "resto PK" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier proteína, péptido o resto que afecta a las propiedades farmacocinéticas de una molécula biológicamente activa cuando se fusiona o se administra junto con la molécula biológicamente activa. Algunos ejemplos de una proteína de modulación de PK o resto PK incluyen PEG, aglutinantes de albúmina sérica humana (HSA) (como se divulga en la Publicación de EE.UU. N.º 2005/0287153 y 2007/0003549, Publicación PCT N.º WO 2009/083804 y WO 2009/133208), seroalbúmina humana, Fc o fragmentos Fc y variantes de los mismos y azúcares (por ejemplo, ácido siálico).
- 50 55 60 65 La "semivida" de una secuencia de aminoácidos o un compuesto generalmente puede definirse como el tiempo necesario para que la concentración sérica del polipéptido se reduzca en un 50 %, *in vivo*, por ejemplo, debido a la degradación de la secuencia o el compuesto y/o la eliminación o el secuestro de la secuencia o el compuesto por mecanismos naturales. La semivida puede determinarse de cualquier manera conocida en sí misma, tal como por análisis farmacocinético. Las técnicas adecuadas serán claras para el experto en la materia y, por ejemplo, generalmente pueden implicar las etapas de administrar adecuadamente a un sujeto una dosis adecuada de la secuencia de aminoácidos o el compuesto de la invención; recoger muestras de sangre u otras muestras del sujeto a intervalos regulares; determinar el nivel o concentración de la secuencia de aminoácidos o el compuesto de la invención en dicha muestra de sangre; y calcular, a partir de (un gráfico de) los datos obtenidos de este modo, el tiempo hasta que el nivel o concentración de la secuencia de aminoácidos o compuesto de la invención se haya reducido en un 50 % en comparación con el nivel inicial tras la dosificación. La referencia, por ejemplo, se hace según los manuales convencionales, tales como Kenneth, A. *et al.*, Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for

Pharmacists y en Peters *et al.*, Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach (1996). También se hace referencia a Gibaldi, M. *et al.*, Pharmacokinetics, 2<sup>a</sup> edición revisada, Marcel Dekker (1982).

- 5 La semivida puede expresarse usando parámetros tales como el  $t_{1/2}$ -alfa, el  $t_{1/2}$ -beta,  $HL_{Lambda\_z}$  y el área bajo la curva (AUC). En la presente memoria descriptiva, un "aumento de la semivida" se refiere a un aumento de uno cualquiera de estos parámetros, dos cualesquiera de estos parámetros, tres cualesquiera de estos parámetros o los cuatro de estos parámetros. Un "aumento de la semivida" en particular se refiere a un aumento del  $t_{1/2}$ -beta y/o  $HL_{Lambda\_z}$ , ya sea con o sin un aumento en el  $t_{1/2}$ -alfa y/o el AUC o ambos.
- 10 Las notaciones "mpk", "mg/kg" o "mg por kg" se refieren a miligramos por kilogramo. Todas las notaciones se usan indistintamente a lo largo de la presente divulgación.
- 15 Los términos "individuo", "sujeto", y "paciente", usados indistintamente en el presente documento, se refieren a un animal, preferentemente a un mamífero (incluyendo un no primate y un primate) o una especie de ave, incluyendo, pero no limitado a, murinos, simios, seres humanos, animales mamíferos de granja (por ejemplo, bovinos, porcinos, ovinos), animales mamíferos para deportes (por ejemplo, equinos) y mascotas mamíferas (por ejemplo, caninos y felinos); preferentemente el término se refiere a humanos. El término también se refiere a especies de aves, incluyendo, pero no limitado a, pollos y pavos. En una determinada realización, el sujeto, preferentemente un mamífero, preferentemente un ser humano, se caracteriza además por una enfermedad, un trastorno o una afección 20 que se beneficiaría de un nivel disminuido o una bioactividad disminuida de miostatina. En otra realización el sujeto, preferentemente un mamífero, preferentemente un ser humano, se caracteriza además por estar en riesgo de desarrollar un trastorno, una enfermedad o una afección que se beneficiaría de un nivel reducido de miostatina o una bioactividad disminuida de miostatina.
- 25 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere al menos a la dosis mínima, pero menos que una dosis tóxica, de un agente que es necesario para impartir un beneficio terapéutico a un sujeto. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una Adnectina antimiostatina de la invención es una cantidad que en mamíferos, preferentemente seres humanos, da como resultado uno o más de lo siguiente: un aumento en el volumen muscular y/o la fuerza muscular, una disminución de la grasa corporal, un aumento en la sensibilidad a la insulina, o el 30 tratamiento de afecciones en las que la presencia de miostatina causa o contribuye a un efecto patológico indeseable o una disminución en los niveles de miostatina da como resultado un efecto terapéutico beneficioso.

35 El término "frágil" o "fragilidad" como se usa en el presente documento se refiere a una afección que puede caracterizarse por dos o más síntomas de debilidad, pérdida de peso, movilidad ralentizada, fatiga, bajos niveles de actividad, mala resistencia y alteración de la respuesta conductual a las señales sensoriales. Una característica distintiva de la fragilidad es la "sarcopenia" o la pérdida de masa muscular relacionada con la edad.

40 El término "caquexia" como se usa en el presente documento se refiere a la afección de desgaste muscular acelerado y pérdida de masa corporal magra que puede resultar de diversas enfermedades.

#### 40 **Visión general**

- 45 La presente invención proporciona novedosos polipéptidos que se unen a y antagonizan la miostatina (denominados en el presente documento "Adnectinas antimiostatina"). Para identificar los antagonistas de la miostatina, la miostatina se presentó a grandes bibliotecas sintéticas de Adnectinas. Se analizaron las Adnectinas que se unían a la miostatina para determinar su unión a miostatina, por sus propiedades biofísicas y por su actividad inhibidora de la miostatina. Las Adnectinas antimiostatina se mutaron y se sometieron a presión selectiva adicional reduciendo la concentración diana y seleccionando Adnectinas antimiostatina con tasas de eliminación lentas. A partir de este proceso de optimización, se identificó una familia de Adnectinas como inhibidores específicos de la miostatina con actividad bioquímica y biofísica favorable. Las Adnectinas antimiostatina descritas en la presente solicitud son útiles para el tratamiento de trastornos, enfermedades y afecciones para las cuales se sabe que la inhibición de la actividad de la miostatina es beneficiosa, incluyendo, pero no limitado a, el tratamiento de enfermedades de desgaste muscular, trastornos metabólicos y atrofia muscular debido a la inactividad.
- 55 Como se desvela en Rebbapragada *et al.* (MCB 2003;23:7230-42), la ruta de señalización de la miostatina implica la unión de la miostatina a ActRIIb, seguido del reclutamiento de quinasa 4 similar al receptor de activina (ALK4) o ALK5. La unión a las ALK induce la fosforilación de Smad2/Smad3, seguido de la activación de la ruta de señalización similar a TGF $\beta$  (véase, por ejemplo, Rebbapragada *et al.*, MCB 2003;23:7230-42).

#### 60 **I. Andamios basados en fibronectina**

- 65 Un aspecto de la solicitud proporciona Adnectinas antimiostatina que comprenden un dominio Fn3 en el cual uno o más de los bucles accesibles al disolvente se han aleatorizado o mutado. Los polipéptidos de la invención son como se definen en las reivindicaciones adjuntas. La divulgación técnica que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de las reivindicaciones. Los elementos de la divulgación que no entran en el alcance de las reivindicaciones se proporcionan a título informativo.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el dominio Fn3 es un dominio Fn3 derivado del décimo módulo de tipo silvestre del dominio de fibronectina humana tipo III (<sup>10</sup>Fn3):

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTAT

5 ISGLKPGVDY<sup>T</sup>ITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 4) (los bucles BC, DE y FG están subrayados).

En otras realizaciones descritas en el presente documento, las secuencias que no se unen al ligando de <sup>10</sup>Fn3, es decir, el "andamio <sup>10</sup>Fn3", pueden alterarse siempre que el <sup>10</sup>Fn3 conserve la función de unión al ligando y/o la estabilidad estructural. Se ha informado una diversidad de andamios <sup>10</sup>Fn3 mutantes. En un aspecto, uno o más de 10 Asp 7, Glu 9 y Asp 23 se reemplazan por otro aminoácido, tal como, por ejemplo, un resto de aminoácido cargado no negativamente (por ejemplo, Asn, Lys, etc.). Se ha informado que estas mutaciones tienen el efecto de promover una mayor estabilidad del <sup>10</sup>Fn3 mutante a pH neutro en comparación con la forma de tipo silvestre (véase, por ejemplo, Publicación PCT N.º WO 02/04523). Se ha desvelado una diversidad de alteraciones adicionales en el andamio <sup>10</sup>Fn3 que son beneficiosas o neutrales. Véanse, por ejemplo, Batori *et al.*, Protein Eng., 15(12):1015-1020 (diciembre de 15 2002); Koide *et al.*, Biochemistry, 40(34):10326-10333 (28 de agosto de 2001).

Las proteínas <sup>10</sup>Fn3 tanto variantes como 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 del dominio de la cadena beta. Las cadenas beta ubicadas más cerca de los extremos N y C pueden adoptar una conformación similar a beta en solución. En la SEQ ID NO: 4, el bucle AB corresponde a los restos 15-16, el bucle BC corresponde a los restos 21-30, el bucle CD corresponde a los restos 39-45, el bucle DE corresponde a los restos 51-56, el bucle EF corresponde a los restos 60-66 y el bucle FG corresponde a los restos 76-87 (Xu *et al.*, Chemistry & Biology, 9:933-942, 2002).

25 En consecuencia, en algunas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina es un polipéptido <sup>10</sup>Fn3 que es al menos un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 % o un 90 % idéntico al dominio <sup>10</sup>Fn3 humano, mostrado en SEQ ID NO: 4. Gran parte de la variabilidad generalmente se producirá en uno o más bucles. Cada una de las cadenas beta o similares a beta de un polipéptido <sup>10</sup>Fn3 puede consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 30 100 % idéntica a la secuencia de una cadena beta o de tipo beta correspondiente de SEQ ID NO:4, siempre que dicha variación no perturbe la estabilidad del polipéptido en condiciones fisiológicas.

35 La invención proporciona una Adnectina antimiostatina que comprende un dominio décimo de fibronectina tipo III (<sup>10</sup>Fn3), en donde en el dominio <sup>10</sup>Fn3 comprende un bucle, AB; un bucle, BC; un bucle, CD; un bucle, DE; un bucle EF; y un bucle FG; los bucles BC, DE y FG tienen una secuencia de aminoácidos alterada con respecto a la secuencia del correspondiente bucle del dominio <sup>10</sup>Fn3 humano. Las Adnectinas antimiostatina de la presente invención comprenden un dominio <sup>10</sup>Fn3 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a las regiones sin bucle de SEQ ID NO:4, en donde los bucles BC, DE y FG están alterados, es decir, los dominios <sup>10</sup>Fn3 comprenden bucles que no se producen de forma natural. Por "alteración" se entiende una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos 40 con respecto a una secuencia de molde (que corresponde al dominio de fibronectina humana) e incluye adiciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas. La alteración de una secuencia de aminoácidos puede lograrse a través de variación intencional, con enmascaramiento o espontánea, generalmente de una secuencia codificante de ácido nucleico, y puede producirse mediante cualquier técnica, por ejemplo, PCR, PCR propensa a errores o síntesis química de ADN. En particular, la Adnectina antimiostatina de acuerdo con la invención 45 comprende un dominio <sup>10</sup>Fn3 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281.

50 En la Adnectina antimiostatina de la invención, los bucles BC, DE y FG se extienden o se acortan en longitud con respecto al correspondiente bucle de fibronectina humana. Para optimizar la unión al antígeno, la longitud de un bucle de <sup>10</sup>Fn3 puede alterarse en longitud así como en secuencia para obtener la mayor flexibilidad y afinidad posibles en la unión a antígeno.

55 Las Adnectinas antimiostatina de la invención se basan en un andamio <sup>10</sup>Fn3 y pueden definirse generalmente mediante la siguiente secuencia:  
 EVVAAT(Z)<sub>a</sub>SLLI(Z)<sub>x</sub>YYRITYGE(Z)<sub>b</sub>QEFTV(Z)<sub>y</sub>ATI(Z)<sub>c</sub>DYTITVYAV(Z)<sub>z</sub>ISINYRT (SEQ ID NO: 5),  
 en donde el bucle AB está representado por (Z)<sub>a</sub>, el bucle CD está representado por (Z)<sub>b</sub>, el bucle EF está representado por (Z)<sub>c</sub>, el bucle BC está representado por (Z)<sub>x</sub>, el bucle DE está representado por (Z)<sub>y</sub> y el bucle FG está representado por (Z)<sub>z</sub>. Z representa cualquier aminoácido y el subíndice después de la Z representa un número entero del número de aminoácidos. En particular, a puede ser cualquiera desde 1-15, 2-15, 1-10, 2-10, 1-8, 2-8, 1-5, 2-5, 1-4, 2-4, 1-3, 2-3 o 1-2 aminoácidos; y b, c, x, y y z pueden ser cada uno independientemente cualquiera desde 2-20, 2-15, 2-10, 2-8, 60 5-20, 5-15, 5-10, 5-8, 6-20, 6-15, 6-10, 6-8, 2-7, 5-7 o 6-7 aminoácidos.

Más específicamente, las Adnectinas antimiostatina de la invención se basan en un andamio <sup>10</sup>Fn3 definido generalmente mediante la secuencia:

EVVAATPTSLI(Z)<sub>x</sub>YYRITYGETGGNSPVQEFTV(Z)<sub>y</sub>ATISGLKPGVDYTITVYAV(Z)<sub>z</sub>

ISINYRT (SEQ ID NO: 6)

en donde el bucle BC está representado por (Z)<sub>x</sub>, el bucle DE está representado por (Z)<sub>y</sub> y el bucle FG está representado por (Z)<sub>z</sub>. Z representa cualquier aminoácido y el subíndice después de la Z representa un número entero del número de aminoácidos. En particular, la secuencia de aminoácidos del dominio <sup>10</sup>Fn3 humano comprendido en la Adnectina antimiostatina de acuerdo con la invención se establece en la SEQ ID NO: 281.

En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, una Adnectina antimiostatina puede comprender la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5 o 6, en donde al menos uno de los bucles BC, DE y FG representados por (Z)<sub>x</sub>, (Z)<sub>y</sub> y (Z)<sub>z</sub>, respectivamente, están alterados. Como se ha descrito anteriormente, los restos de aminoácidos correspondientes a los restos 21-30, 51-56 y 76-87 de SEQ ID NO: 4 definen los bucles BC, DE y FG, respectivamente. Sin embargo, debería comprenderse que no es necesario modificar todos los restos dentro de la región de bucle con el fin de conseguir un producto de unión de <sup>10</sup>Fn3 que tenga una fuerte afinidad por una diana deseada (por ejemplo, miostatina).

Por ejemplo, los restos 21 (S) y 22 (W) del bucle BC como se muestra en SEQ ID NO: 1 no necesitan modificarse para unirse a miostatina. Es decir, los dominios <sup>10</sup>Fn3 con unión de alta afinidad a miostatina pueden obtenerse modificando solo los restos 23-30 del bucle BC como se muestra en SEQ ID NO: 4. Esto se demuestra en los bucles BC exemplificados en la Tabla 1, lo que indica que solo se modifican las posiciones subrayadas.

De forma similar, las posiciones 51 (P) y 56 (T) del bucle DE como se muestra en SEQ ID NO: 4 no necesitan modificarse para unir miostatina. Es decir, los dominios <sup>10</sup>Fn3 con unión de alta afinidad a miostatina pueden obtenerse modificando solo los restos 52-55 del bucle DE como se muestra en SEQ ID NO: 4. Esto se demuestra en los bucles DE exemplificados en la Tabla 1, lo que indica que solo se alteraron los restos que abarcan las posiciones subrayadas.

Igualmente, las posiciones 76 (T) y 87 (P) del bucle FG como se muestra en SEQ ID NO: 1 no necesitan modificarse para unir miostatina. Es decir, los dominios <sup>10</sup>Fn3 con unión de alta afinidad a miostatina pueden obtenerse modificando solo los restos 77-86 del bucle FG como se muestra en SEQ ID NO: 4. Esto se demuestra en los bucles FG exemplificados en la Tabla 1, lo que indica que solo se alteraron los restos que abarcan las posiciones subrayadas.

En consecuencia, en algunas realizaciones descritas en el presente documento, las regiones de bucle BC, DE y FG de las Adnectinas antimiostatina pueden describirse de acuerdo con secuencias consenso. Estas secuencias consenso están exemplificadas por los bucles BC, DE y FG mostrados en la Tabla 1 y según lo determinado por el análisis de WebLogo (Fig. 2-7) (Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. Genome Research 2004;14:1188-1190).

El análisis de WebLogo genera una firma de aminoácidos que refleja la frecuencia de los aminoácidos en cada posición alterada del bucle BC, DE o FG.

Por ejemplo, en algunas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle BC, (Z)<sub>x</sub>, se define por la secuencia consenso X<sub>1</sub>-L-P-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>, en donde, X<sub>1</sub> es S, T o Y; X<sub>2</sub> es H, Y, N, R, F, G, S o T; X<sub>3</sub> es A, P, Q, S, F, H, N o R; X<sub>4</sub> es G o A; X<sub>5</sub> H, L, R, V, N, D, F, I o K; X<sub>6</sub> es A, L, G, M, F, I o V; y X<sub>7</sub> es H o N. En determinadas realizaciones preferidas descritas en el presente documento, el bucle BC comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 7, 11-21, 23-31, 34 y 36-38. En una realización descrita en el presente documento y en las Adnectinas antimiostatina de acuerdo con la presente invención, el bucle BC comprende los aminoácidos expuestos en SEQ ID NO. 34.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle DE, (Z)<sub>y</sub>, está definido por la secuencia consenso G-R-G-X<sub>8</sub>, en donde X<sub>8</sub> es V o L. En determinadas realizaciones preferidas descritas en el presente documento, el bucle DE comprende un aminoácido seleccionado de SEQ ID NO: 39 y 42. En una realización descrita en el presente documento y en las Adnectinas antimiostatina de acuerdo con la presente invención, el bucle DE comprende los aminoácidos expuestos en SEQ ID NO. 39.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle FG, (Z)<sub>z</sub>, se define por la secuencia consenso X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>-X<sub>17</sub>-X<sub>18</sub>, en donde X<sub>9</sub> es L, V o I; X<sub>10</sub> es T o S; X<sub>11</sub> es K, R, A, G, S, D, H, N, T o P; X<sub>12</sub> es S, T, A, E, H, K o N; X<sub>13</sub> es K, G, Q, D, E, N, T o S; X<sub>14</sub> es V, I, F, L, M, P, T o Y; X<sub>15</sub> es I, L o Y; X<sub>16</sub> es H, I, V, K, L, R, F, G, S o T; X<sub>17</sub> es Y o H; y X<sub>18</sub> es K, M, L, R o V. En determinadas realizaciones preferidas descritas en el presente documento, el bucle FG comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 46, 50-62, 64-72, 75-77 y 79. En una realización descrita en el presente documento y en las Adnectinas antimiostatina de acuerdo con la presente invención, el bucle FG comprende los aminoácidos expuestos en SEQ ID NO. 75.

En otras realizaciones descritas en el presente documento, el bucle BC, (Z)<sub>x</sub>, se define por la secuencia consenso X<sub>19</sub>-X<sub>20</sub>-P-X<sub>21</sub>-G-X<sub>22</sub>-A, en donde X<sub>19</sub> es D, E, V o W; X<sub>20</sub> es A, S o V; X<sub>21</sub> es R, A, G, K o L; y X<sub>22</sub> es L o N. En determinadas

realizaciones preferidas descritas en el presente documento, el bucle BC comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 8-10, 22, 32, 33 y 35.

- 5 En otras realizaciones descritas en el presente documento, el bucle DE, (Z)<sub>y</sub>, se define por la secuencia consenso X<sub>23</sub>-G-R-G-X<sub>24</sub>, en donde X<sub>23</sub> es V, P, F, I o L; y X<sub>24</sub> es S, N o T. En determinadas realizaciones preferidas descritas en el presente documento, el bucle DE comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 40, 41 y 43-45.
- 10 En otras realizaciones descritas en el presente documento, el bucle FG, (Z)<sub>z</sub>, se define por la secuencia consenso X<sub>25</sub>-X<sub>26</sub>-R-X<sub>27</sub>-G-X<sub>28</sub>-X<sub>29</sub>-X<sub>30</sub>-X<sub>31</sub>-X<sub>32</sub>, en donde X<sub>25</sub> es I o V; X<sub>26</sub> es F, D o Y; X<sub>27</sub> es D o T; X<sub>28</sub> es P, M, V o T; X<sub>29</sub> es V, L, N, R o S; X<sub>30</sub> es H, T, L, N, Q o S; X<sub>31</sub> es F, W, Y, H o L; y X<sub>32</sub> es D, A o G. En determinadas realizaciones preferidas descritas en el presente documento, el bucle FG comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 47-49, 63, 73, 74 y 78.
- 15 En consecuencia, en determinadas realizaciones descritas en el presente documento, una Adnectina antimiotostatina comprende un bucle BC, (Z)<sub>x</sub>, que tiene la secuencia X<sub>1</sub>-L-P-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub> y un bucle DE, (Z)<sub>y</sub>, que tiene la secuencia G-R-G-X<sub>8</sub>, como se ha definido anteriormente. En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle BC comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 7, 11-21, 23-31, 34 y 36-38 y el bucle DE comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 39 y 42. En una realización descrita en el presente documento y en las Adnectinas antimiotostatina de acuerdo con la presente invención, los bucles BC y DE comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 34 y 39, respectivamente.
- 20 En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiotostatina comprende un bucle BC, (Z)<sub>x</sub>, que tiene la secuencia X<sub>1</sub>-L-P-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub> y un bucle FG, (Z)<sub>z</sub>, que tiene la secuencia X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>-X<sub>17</sub>-X<sub>18</sub>, como se ha definido anteriormente. En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle BC comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 7, 11-21, 23-31, 34 y 36-38 y el bucle FG comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 46, 50-62, 64-72, 75-77 y 79. En una realización descrita en el presente documento y en las Adnectinas antimiotostatina de acuerdo con la presente invención, los bucles BC y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 34 y 75, respectivamente.
- 25 En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiotostatina comprende un bucle DE, (Z)<sub>y</sub>, que tiene la secuencia G-R-G-X<sub>8</sub> y un bucle FG, (Z)<sub>z</sub>, que tiene la secuencia X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>-X<sub>17</sub>-X<sub>18</sub>, como se ha definido anteriormente. En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle DE comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 39 y 42 y el bucle FG comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 46, 50-62, 64-72, 75-77 y 79. En una realización descrita en el presente documento y en las Adnectinas antimiotostatina de acuerdo con la presente invención, los bucles DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 39 y 75, respectivamente.
- 30 En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiotostatina comprende un bucle BC, (Z)<sub>x</sub>, que tiene la secuencia X<sub>1</sub>-L-P-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>, un bucle DE, (Z)<sub>y</sub>, que tiene la secuencia G-R-G-X<sub>8</sub> y un bucle FG, (Z)<sub>z</sub>, que tiene la secuencia X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>-X<sub>17</sub>-X<sub>18</sub>, como se ha definido anteriormente. En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle BC comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 7, 11-21, 23-31, 34 y 36-38, el bucle DE comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 39 y 42 y el bucle FG comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 46, 50-62, 64-72, 75-77 y 79. En una realización descrita en el presente documento y en las Adnectinas antimiotostatina de acuerdo con la presente invención, los bucles BC, DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 34, 39 y 75, respectivamente.
- 35 En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiotostatina comprende un bucle BC, (Z)<sub>x</sub>, que tiene la secuencia X<sub>1</sub>-L-P-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>, un bucle DE, (Z)<sub>y</sub>, que tiene la secuencia G-R-G-X<sub>8</sub> y un bucle FG, (Z)<sub>z</sub>, que tiene la secuencia X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>-X<sub>17</sub>-X<sub>18</sub>, como se ha definido anteriormente. En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle BC comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 8-10, 22, 32, 33 y 35 y el bucle DE comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 40, 41 y 43-45.
- 40 En otras realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiotostatina comprende un bucle BC, (Z)<sub>x</sub>, que tiene la secuencia X<sub>19</sub>-X<sub>20</sub>-P-X<sub>21</sub>-G-X<sub>22</sub>-A y un bucle DE, (Z)<sub>y</sub>, que tiene la secuencia X<sub>23</sub>-G-R-G-X<sub>24</sub>, como se ha definido anteriormente. En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle BC comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 8-10, 22, 32, 33 y 35 y el bucle DE comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 47-49, 63, 73, 74 y 78.
- 45 En otras realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiotostatina comprende un bucle BC, (Z)<sub>x</sub>, que tiene la secuencia X<sub>19</sub>-X<sub>20</sub>-P-X<sub>21</sub>-G-X<sub>22</sub>-A y un bucle FG, (Z)<sub>z</sub>, que tiene la secuencia X<sub>25</sub>-X<sub>26</sub>-R-X<sub>27</sub>-G-X<sub>28</sub>-X<sub>29</sub>-X<sub>30</sub>-X<sub>32</sub>, como se ha definido anteriormente. En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle BC comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 8-10, 22, 32, 33 y 35 y el bucle FG comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 47-49, 63, 73, 74 y 78.
- 50 En otras realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiotostatina comprende un bucle BC, (Z)<sub>x</sub>, que tiene la secuencia X<sub>19</sub>-X<sub>20</sub>-P-X<sub>21</sub>-G-X<sub>22</sub>-A y un bucle FG, (Z)<sub>z</sub>, que tiene la secuencia X<sub>25</sub>-X<sub>26</sub>-R-X<sub>27</sub>-G-X<sub>28</sub>-X<sub>29</sub>-X<sub>30</sub>-X<sub>32</sub>, como se ha definido anteriormente. En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle BC comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 40, 41 y 43-45 y el bucle FG comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 47-49, 63, 73, 74 y 78.
- 55 En otras realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiotostatina comprende un bucle DE, (Z)<sub>y</sub>, que tiene la secuencia X<sub>23</sub>-G-R-G-X<sub>24</sub> y un bucle FG, (Z)<sub>z</sub>, que tiene la secuencia X<sub>25</sub>-X<sub>26</sub>-R-X<sub>27</sub>-G-X<sub>28</sub>-X<sub>29</sub>-X<sub>30</sub>-X<sub>32</sub>, como se ha definido anteriormente. En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle DE comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 40, 41 y 43-45 y el bucle FG comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 47-49, 63, 73, 74 y 78.
- 60 En otras realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiotostatina comprende un bucle DE, (Z)<sub>y</sub>, que tiene la secuencia X<sub>23</sub>-G-R-G-X<sub>24</sub> y un bucle FG, (Z)<sub>z</sub>, que tiene la secuencia X<sub>25</sub>-X<sub>26</sub>-R-X<sub>27</sub>-G-X<sub>28</sub>-X<sub>29</sub>-X<sub>30</sub>-X<sub>32</sub>, como se ha definido anteriormente. En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle DE comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 40, 41 y 43-45 y el bucle FG comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 47-49, 63, 73, 74 y 78.

- En otras realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende un bucle BC, (Z)<sub>x</sub>, que tiene la secuencia X<sub>19</sub>-X<sub>20</sub>-P-X<sub>21</sub>-G-X<sub>22</sub>-A, comprende un bucle DE, (Z)<sub>y</sub>, que tiene la secuencia X<sub>23</sub>-G-R-G-X<sub>24</sub> y un bucle FG, (Z)<sub>z</sub>, que tiene la secuencia X<sub>25</sub>-X<sub>26</sub>-R-X<sub>27</sub>-G-X<sub>28</sub>-X<sub>29</sub>-X<sub>30</sub>-X<sub>31</sub>-X<sub>32</sub>, como se ha definido anteriormente. En 5 determinadas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle BC comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 8-10, 22, 32, 33 y 35, el bucle DE comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 40, 41 y 43-45 y el bucle FG comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 47-49, 63, 73, 74 y 78.
- 10 En determinadas realizaciones preferidas descritas en el presente documento, una Adnectina antimiostatina comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5 o 6, en donde los bucles BC, DE y FG representados por (Z)<sub>x</sub>, (Z)<sub>y</sub> y (Z)<sub>z</sub>, respectivamente, se reemplazan por un conjunto respectivo de bucles BC, DE y FG que tienen las secuencias consenso de SEQ ID NO: 7-38, 39-45 y 46-79, respectivamente.
- 15 En otras realizaciones preferidas descritas en el presente documento, una Adnectina antimiostatina comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5 o 6, en donde los bucles BC, DE y FG representados por (Z)<sub>x</sub>, (Z)<sub>y</sub> y (Z)<sub>z</sub>, respectivamente, se reemplazan por un conjunto respectivo de bucles BC, DE y FG que tengan secuencias al menos 20 un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % idénticas a las secuencias de los bucles BC, DE o FG de los clones listados en la Tabla 1.
- 25 En realizaciones ilustrativas descritas en el presente documento, una Adnectina antimiostatina se define por SEQ ID NO: 5 y tiene un conjunto respectivo de secuencias de bucles BC, DE y FG de cualquiera de los clones enumerados en la Tabla 1. Por ejemplo, el clon 1979\_B06 en la Tabla 1 comprende los bucles BC, DE y FG como se expone en SEQ ID NO: 7, 39 y 46, respectivamente. Por tanto, una Adnectina antimiostatina basada en estos bucles puede 30 comprender SEQ ID NO: 5 o 6, en donde (Z)<sub>x</sub> comprende SEQ ID NO: 7, (Z)<sub>y</sub> comprende SEQ ID NO: 39 y (Z)<sub>z</sub> comprende SEQ ID NO: 46. Se contemplan construcciones similares usando el conjunto de bucles BC, DE y FG de los otros clones en la Tabla 1, o las secuencias consenso de SEQ ID NO: 7-38, 39-45 y 46-79, respectivamente. Las regiones de andamio de dichas Adnectinas antimiostatina pueden comprender 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, eliminaciones o adiciones con respecto a los restos de aminoácidos del andamio de SEQ ID NO: 4. Pueden realizarse tales 35 modificaciones del andamio, siempre que la Adnectina antimiostatina sea capaz de unir la miostatina con una K<sub>D</sub> deseada.
- 40 En realizaciones preferidas descritas en el presente documento, el bucle BC de la Adnectina antimiostatina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SWSLPHAGHV (SEQ ID NO: 7), SWVSPRGRAR (SEQ ID NO: 8), SWEVPRGLAR (SEQ ID NO: 9), SWWAPGLAR (SEQ ID NO: 10), SWTLPHAGLAH (SEQ ID NO: 11), SWYLPYPAHMN (SEQ ID NO: 12), SWSLPFAGHNL (SEQ ID NO: 13), SWSLPYSGLAN (SEQ ID NO: 14), SWSLPHAGHAAH (SEQ ID NO: 15), SWTLPNFGLIN (SEQ ID NO: 16), SWTLPHAGRAH (SEQ ID NO: 17), SWSLPYAGHNL (SEQ ID NO: 18), SWSLPYAAHMN (SEQ ID NO: 19), SWSLPYPGHLN (SEQ ID NO: 20), SWSLPYAGHAAH (SEQ ID NO: 21), SWDAPGGLAR (SEQ ID NO: 22), SWSLPTPGLAH (SEQ ID NO: 23), SWSLPHRGVAN (SEQ ID NO: 24), SWSLPSSGVAH (SEQ ID NO: 25), SWSLPHHGFGH (SEQ ID NO: 26), SWSLPHAGDAH (SEQ ID NO: 27), SWSLPNGVAH (SEQ ID NO: 28), SWSLPRQQLAN (SEQ ID NO: 29), SWSLPGPGHFFH (SEQ ID NO: 30), SWSLPHPGGLH (SEQ ID NO: 31), SWDAPRGLAR (SEQ ID NO: 32), SWDAPAGLAR (SEQ ID NO: 33), SWSLPHQGKAN (SEQ ID NO: 34), SWDAPKGLAR (SEQ ID NO: 35), 45 SWSLPNPGIAH (SEQ ID NO: 36), SWSLPRPGNAH (SEQ ID NO: 37) y SWSLPNPGNAH (SEQ ID NO: 38). En las Adnectinas antimiostatina de acuerdo con la presente invención, el bucle BC comprende la secuencia de aminoácidos SWSLPHQGKAN (SEQ ID NO: 34).
- 50 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle BC de la Adnectina antimiostatina comprende la porción subrayada de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-38, como se muestra en la Tabla 1. En una realización descrita en el presente documento y en las Adnectinas antimiostatina de acuerdo con la presente invención, el bucle BC comprende la parte subrayada de SEQ ID NO: 34.
- 55 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle DE de la Adnectina antimiostatina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en PGRGVT (SEQ ID NO: 39), PGRGST (SEQ ID NO: 40), LGRGST (SEQ ID NO: 41), PGRGLT (SEQ ID NO: 42), IGRGST (SEQ ID NO: 43), FGRGTT (SEQ ID NO: 44) y VGRGNT (SEQ ID NO: 45). En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle DE de la Adnectina antimiostatina de la invención comprende la parte subrayada de una cualquiera de las SEQ ID NO: 39-45, como se muestra en la Tabla 1. En una realización descrita en el presente documento y en las Adnectinas 60 antimiostatina de acuerdo con la presente invención, el bucle DE comprende la parte subrayada de SEQ ID NO: 39.
- 65 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle FG de la Adnectina antimiostatina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en TLTKSQMIHYMP (SEQ ID NO: 46), TIYRDGMSHDP (SEQ ID NO: 47), TVYRDGPLLLAP (SEQ ID NO: 48), TIFRTGMVQYDP (SEQ ID NO: 49), TLTNSEIILYKP (SEQ ID NO: 50), TLTKSQILHHRP (SEQ ID NO: 51), TLTRSKIIHYMP (SEQ ID NO: 52), TLTHSNIIRYVP (SEQ ID NO: 53), TVSSTKVIVYLP (SEQ ID NO: 54), TITKSTIIYKP (SEQ ID NO: 55),

5 TTTTTSVILYKP (SEQ ID NO: 56), TLTKSQLIHYP (SEQ ID NO: 57), TLTRSQVIIHYP (SEQ ID NO: 58),  
 TLTTSKIIHYP (SEQ ID NO: 59), TVSSTKVIHYKP (SEQ ID NO: 60), TLTKSKVIHYKP (SEQ ID NO: 61),  
 TVTTTKVIHYKP (SEQ ID NO: 62), TIDRDGVNHFAP (SEQ ID NO: 63), TVTHHGVIGYKP (SEQ ID NO: 64),  
 TLTGANVIIYKP (SEQ ID NO: 35), TVTNTGVIIYKP (SEQ ID NO: 66), TVTATGIIYKP (SEQ ID NO: 67),  
 10 TVTRAGFYRYKP (SEQ ID NO: 68), TVTREEVISYKP (SEQ ID NO: 69), TVTAAGVIIYKP (SEQ ID NO: 70),  
 TVTANQPIIYKP (SEQ ID NO: 71), TIPETIIVYKP (SEQ ID NO: 72), TIDRDGTRSFDP (SEQ ID NO: 73),  
 TIFRDGPVWTWDP (SEQ ID NO: 74), TVTDTGVLKYKP (SEQ ID NO: 75), TLGSDTIFYKP (SEQ ID NO: 76),  
 TVTGKDVVKYKP (SEQ ID NO: 77), TIFRDGVVNYGP (SEQ ID NO: 78) y TVTDTGFIYKP (SEQ ID NO: 79). En las  
 Adnectinas antimiostatina de acuerdo con la presente invención, el bucle FG comprende la secuencia de aminoácidos  
 15 TVTDTGVLKYKP (SEQ ID NO: 75).

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle FG de la antimiostatina comprende la porción  
 15 subrayada de una cualquiera de SEQ ID NO: 46-79, como se muestra en la Tabla 1. En una realización descrita en el  
 presente documento y en las Adnectinas antimiostatina de acuerdo con la presente invención, el bucle FG comprende  
 la parte subrayada de SEQ ID NO: 75.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende una secuencia  
 20 de bucle BC seleccionada de las secuencias de bucle BC que tienen SEQ ID NO: 7-38 o la parte subrayada de una  
 cualquiera de SEQ ID NO: 7-38, como se muestra en la Tabla 1; una secuencia de bucle DE seleccionada de las  
 25 secuencias de bucle DE que tienen SEQ ID NO: 39-45 o la parte subrayada de una cualquiera de SEQ ID NO: 39-45  
 como se muestra en la Tabla 1; y una secuencia de bucle FG seleccionada de las secuencias de bucle FG que tienen  
 30 SEQ ID NO: 46-79 o la parte subrayada de una cualquiera de SEQ ID NO: 46-79 como se muestra en la Tabla 1. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende una secuencia de  
 35 aminoácidos del bucle BC, DE y FG al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 %, un  
 99 % o un 100 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 7-38, 39-45 y 46-79, respectivamente. En otras  
 40 realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende una secuencia de  
 45 aminoácidos del bucle BC, DE y FG al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 %, un  
 99 % o un 100 % idéntica a la parte subrayada de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-38, 39-45 y 46-79, respectivamente,  
 como se muestra en la Tabla 1.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende la secuencia de  
 50 aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 80-123, 228-239 y 252-273 (secuencias de longitud completa de las  
 55 Tablas 2, 5 y 6). En realizaciones de la invención, la Adnectina antimiostatina comprende la secuencia de aminoácidos  
 de una cualquiera de SEQ ID NO: 118, 264, 269 y 273 (secuencias de longitud completa de las Tablas 2 y 6). En una  
 60 realización, la Adnectina antimiostatina comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 273.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende una secuencia  
 65 de aminoácidos al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %  
 70 idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 80-123, 228-239 y 252-273. En otras realizaciones, la Adnectina  
 75 antimiostatina comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 %, un  
 80 99 % o un 100 % idéntico a las regiones de bucle BC, DE y FG de SEQ ID NO: 80-123, 228-239 y 252-273.

La Adnectina antimiostatina de la invención comprende los bucles BC, DE y FG como se establece en SEQ ID NO:  
 85 34, 39 y 75, respectivamente. La Adnectina antimiostatina de la invención comprende la secuencia de aminoácidos  
 90 expuesta en SEQ ID NO: 281 [secuencia central de Adnectina compartida por PRD-1474 y 3116\_A06, precedida por  
 95 una secuencia de extensión N-terminal (GVSDVPRDL) y seguida de una cola C-terminal (El)]. En una realización, la  
 100 Adnectina antimiostatina de la invención comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, un 85 %, un  
 105 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida  
 110 en SEQ ID NO: 273 [PRD-1474] o SEQ ID NO: 118 [3116\_A06]. La Adnectina antimiostatina de la invención  
 115 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 331 [secuencia central de Adnectina de PRD-1474  
 120 y 3116\_A06 sin una secuencia líder N-terminal o cola C-terminal]. La secuencia principal de Adnectina de PRD-1474  
 125 y 3116\_A06 se establece a continuación:  
 130 EWAATPTSLISWSLPHQGKANYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPG  
 135 VDYTITVYAVTVDTGVLKYKPISINYRT (SEQ ID NO: 331)

140 En una realización descrita en el presente documento, la Adnectina antimiostatina descrita en el presente documento  
 145 puede describirse con respecto a la Adnectina antimiostatina que comprende los bucles BC, DE y FG como se  
 150 establece en SEQ ID NO: 34, 39 y 75.

155 En consecuencia, en algunas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina  
 160 comprende los bucles BC, DE y FG como se establece en SEQ ID NO: 34, 39 y 75, respectivamente, en donde el  
 165 bucle BC comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservativas de  
 170 aminoácidos. En consecuencia, en algunas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle BC se define  
 175 por la secuencia consenso X<sub>33</sub>-L-P-X<sub>34</sub>-X<sub>35</sub>-X<sub>36</sub>-X<sub>37</sub>-X<sub>38</sub>-X<sub>39</sub>, en donde X<sub>33</sub> es T o Y; X<sub>34</sub> es Y, N, R, F, G, S o T; X<sub>35</sub> es  
 180 A, P, S, F, H, N o R; X<sub>36</sub> es A; X<sub>37</sub> es H, L, R, V, N, D, F o I; X<sub>38</sub> es L, G, M, F, I o V; y X<sub>39</sub> es H.

- En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende los bucles BC, DE y FG como se establece en SEQ ID NO: 34, 39 y 75, respectivamente, en donde el bucle DE comprende una sustitución de 1 aminoácido, tal como una sustitución conservativa de aminoácidos. En consecuencia, en algunas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle DE está definido por la secuencia consenso G-R-G-X<sub>40</sub>, en donde X<sub>40</sub> es L.
- En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende los bucles BC, DE y FG como se establece en SEQ ID NO: 34, 39 y 75, respectivamente en donde el bucle FG comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservativas de aminoácidos. En consecuencia, en algunas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle FG se define por la secuencia consenso X<sub>41</sub>-X<sub>42</sub>-X<sub>43</sub>-X<sub>44</sub>-X<sub>45</sub>-X<sub>46</sub>-X<sub>47</sub>-X<sub>48</sub>-X<sub>49</sub>-X<sub>50</sub>, en donde X<sub>41</sub> es L o I; X<sub>42</sub> es S; X<sub>43</sub> es K, R, A, G, S, H, N, T o P; X<sub>44</sub> es S, A, E, H, K o N; X<sub>45</sub> es K, Q, D, E, N, T o S; X<sub>46</sub> es V, I, F, L, M, P o T; X<sub>47</sub> es I o Y; X<sub>48</sub> es H, I, V, L, R, F, G, S o T; X<sub>49</sub> es H; y X<sub>50</sub> es M, L, R o V.
- En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende los bucles BC, DE y FG como se establece en SEQ ID NO: 34, 39 y 75, respectivamente, en donde el bucle BC tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservativas de aminoácidos, y el bucle DE tiene 1 sustitución de aminoácido, tal como una sustitución conservativa de aminoácidos. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle BC tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula X<sub>33</sub>-L-P-X<sub>34</sub>-X<sub>35</sub>-X<sub>36</sub>-X<sub>37</sub>-X<sub>38</sub>-X<sub>39</sub>, en donde X<sub>33</sub> es T o Y; X<sub>34</sub> es Y, N, R, F, G, S o T; X<sub>35</sub> es A, P, S, F, H, N o R; X<sub>36</sub> es A; X<sub>37</sub> es H, L, R, V, N, D, F o I; X<sub>38</sub> es L, G, M, F, I o V; y X<sub>39</sub> es H, y el bucle DE tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula G-R-G-X<sub>40</sub>, en donde X<sub>40</sub> es L.
- En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende los bucles BC, DE y FG como se establece en SEQ ID NO: 34, 39 y 75, respectivamente, en donde el bucle BC tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservativas de aminoácidos y el bucle FG tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservativas de aminoácidos. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle BC comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula X<sub>33</sub>-L-P-X<sub>34</sub>-X<sub>35</sub>-X<sub>36</sub>-X<sub>37</sub>-X<sub>38</sub>-X<sub>39</sub>, en donde X<sub>33</sub> es T o Y; X<sub>34</sub> es Y, N, R, F, G, S o T; X<sub>35</sub> es A, P, S, F, H, N o R; X<sub>36</sub> es A; X<sub>37</sub> es H, L, R, V, N, D, F o I; X<sub>38</sub> es L, G, M, F, I o V; y X<sub>39</sub> es H y el bucle FG comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula X<sub>41</sub>-X<sub>42</sub>-X<sub>43</sub>-X<sub>44</sub>-X<sub>45</sub>-X<sub>46</sub>-X<sub>47</sub>-X<sub>48</sub>-X<sub>49</sub>-X<sub>50</sub>, en donde X<sub>41</sub> es L o I; X<sub>42</sub> es S; X<sub>43</sub> es K, R, A, G, S, H, N, T o P; X<sub>44</sub> es S, A, E, H, K o N; X<sub>45</sub> es K, Q, D, E, N, T o S; X<sub>46</sub> es V, I, F, L, M, P o T; X<sub>47</sub> es I o Y; X<sub>48</sub> es H, I, V, L, R, F, G, S o T; X<sub>49</sub> es H; y X<sub>50</sub> es M, L, R o V.
- En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende los bucles BC, DE y FG como se establece en SEQ ID NO: 34, 39 y 75, respectivamente, en donde y el bucle DE tiene una sustitución de 1 aminoácido, tal como una sustitución conservativa de aminoácidos y el bucle FG tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservativas de aminoácidos. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle DE comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula G-R-G-X<sub>40</sub>, en donde X<sub>40</sub> es L y el bucle FG comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula X<sub>41</sub>-X<sub>42</sub>-X<sub>43</sub>-X<sub>44</sub>-X<sub>45</sub>-X<sub>46</sub>-X<sub>47</sub>-X<sub>48</sub>-X<sub>49</sub>-X<sub>50</sub>, en donde X<sub>41</sub> es L o I; X<sub>42</sub> es S; X<sub>43</sub> es K, R, A, G, S, H, N, T o P; X<sub>44</sub> es S, A, E, H, K o N; X<sub>45</sub> es K, Q, D, E, N, T o S; X<sub>46</sub> es V, I, F, L, M, P o T; X<sub>47</sub> es I o Y; X<sub>48</sub> es H, I, V, L, R, F, G, S o T; X<sub>49</sub> es H; y X<sub>50</sub> es M, L, R o V.
- En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende los bucles BC, DE y FG como se establece en SEQ ID NO: 34, 39 y 75, respectivamente, en donde el bucle BC tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservativas de aminoácidos, y el bucle DE tiene 1 sustitución de aminoácido, tal como una sustitución conservativa de aminoácidos y el bucle FG tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservativas de aminoácidos. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el bucle BC comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula X<sub>33</sub>-L-P-X<sub>34</sub>-X<sub>35</sub>-X<sub>36</sub>-X<sub>37</sub>-X<sub>38</sub>-X<sub>39</sub>, en donde X<sub>33</sub> es T o Y; X<sub>34</sub> es Y, N, R, F, G, S o T; X<sub>35</sub> es A, P, S, F, H, N o R; X<sub>36</sub> es A; X<sub>37</sub> es H, L, R, V, N, D, F o I; X<sub>38</sub> es L, G, M, F, I o V; y X<sub>39</sub> es H; el bucle DE comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula G-R-G-X<sub>40</sub>, en donde X<sub>40</sub> es L; y el bucle FG comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula X<sub>41</sub>-X<sub>42</sub>-X<sub>43</sub>-X<sub>44</sub>-X<sub>45</sub>-X<sub>46</sub>-X<sub>47</sub>-X<sub>48</sub>-X<sub>49</sub>-X<sub>50</sub>, en donde X<sub>41</sub> es L o I; X<sub>42</sub> es S; X<sub>43</sub> es K, R, A, G, S, H, N, T o P; X<sub>44</sub> es S, A, E, H, K o N; X<sub>45</sub> es K, Q, D, E, N, T o S; X<sub>46</sub> es V, I, F, L, M, P o T; X<sub>47</sub> es I o Y; X<sub>48</sub> es H, I, V, L, R, F, G, S o T; X<sub>49</sub> es H; y X<sub>50</sub> es M, L, R o V.
- En una realización descrita en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende los bucles BC, DE y FG como se establece en SEQ ID NO: 34, 39 y 75, respectivamente, y tiene sustituciones de aminoácidos en los bucles BC, DE y FG que permiten que la Adnectina antimiostatina mantenga la unión a la miostatina. Tales sustituciones de aminoácidos pueden determinarse mediante, por ejemplo, barrido mutacional profundo, como se describe en el Ejemplo 8.
- En consecuencia, en algunas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende un bucle BC que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula X<sub>51</sub>-X<sub>52</sub>-X<sub>53</sub>-X<sub>54</sub>-X<sub>55</sub>-X<sub>56</sub>-X<sub>57</sub>-X<sub>58</sub>-X<sub>59</sub>, en donde: X<sub>51</sub> se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W e

- Y;  $X_{52}$  se selecciona del grupo que consiste en L, M y V;  $X_{53}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V e Y;  $X_{54}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{55}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{56}$  se selecciona del grupo que consiste en G y S;  $X_{57}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{58}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, G, L, M, S y T; y  $X_{59}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, F, H, N, P, Q, R, S e Y. En una realización preferida,  $X_{51}$  se selecciona del grupo que consiste en C, F, I, S, V, W e Y;  $X_{52}$  se selecciona del grupo que consiste en L;  $X_{53}$  se selecciona del grupo que consiste en p;  $X_{54}$  se selecciona del grupo que consiste en C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{55}$  se selecciona del grupo que consiste en G;  $X_{57}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W e Y;  $X_{58}$  se selecciona del grupo que consiste en A, G, L, M y S; y  $X_{59}$  se selecciona del grupo que consiste en C, H, N, Q, S e Y. En una realización más preferida descrita en el presente documento,  $X_{51}$  se selecciona del grupo que consiste en F, S y W;  $X_{52}$  se selecciona del grupo que consiste en L;  $X_{53}$  se selecciona del grupo que consiste en p;  $X_{54}$  se selecciona del grupo que consiste en C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W e Y;  $X_{55}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V e Y;  $X_{56}$  se selecciona del grupo que consiste en G;  $X_{57}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, H, K, L, M, N, R, V, W e Y;  $X_{58}$  se selecciona del grupo que consiste en A, G y L; y  $X_{59}$  se selecciona del grupo que consiste en H, N y Q.
- En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende un bucle DE que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula G-R-G- $X_{60}$ , en donde  $X_{60}$  es A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T y V. En una realización preferida descrita en el presente documento,  $X_{60}$  es C, E, I, L, M, Q, T y V. En una realización más preferida descrita en el presente documento,  $X_{60}$  es C, E, I, L, M y V.
- En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende un bucle FG que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula  $X_{61}$ - $X_{62}$ - $X_{63}$ - $X_{64}$ - $X_{65}$ - $X_{66}$ - $X_{67}$ - $X_{68}$ - $X_{69}$ - $X_{70}$ , en donde  $X_{61}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W e Y;  $X_{62}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{63}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{64}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{65}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{66}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, F, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{67}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{68}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{69}$  se selecciona del grupo que consiste en F, W e Y; y  $X_{70}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W e Y. En una realización preferida descrita en el presente documento,  $X_{61}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, I, L, M y V;  $X_{62}$  se selecciona del grupo que consiste en C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{63}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W e Y;  $X_{64}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V, W e Y;  $X_{65}$  se selecciona del grupo que consiste en A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W e Y;  $X_{66}$  se selecciona del grupo que consiste en C, F, I, L, M, P, T, V, W e Y;  $X_{67}$  se selecciona del grupo que consiste en C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W e Y;  $X_{68}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{69}$  se selecciona del grupo que consiste en W e Y; y  $X_{70}$  se selecciona del grupo que consiste en F, W e Y; y  $X_{70}$  se selecciona del grupo que consiste en A, G, K, L, M, P, Q y R.
- En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende bucles BC, DE y FG, en donde el bucle BC comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula  $X_{51}$ - $X_{52}$ - $X_{53}$ - $X_{54}$ - $X_{55}$ - $X_{56}$ - $X_{57}$ - $X_{58}$ - $X_{59}$ , en donde,  $X_{51}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{52}$  se selecciona del grupo que consiste en L, M y V;  $X_{53}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{54}$  es A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{55}$  se selecciona del grupo que consiste en G y S;  $X_{57}$  es A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{58}$  es A, C, G, L, M, S y T; y  $X_{59}$  es A, C, F, H, N, P, Q, R, S e Y; el bucle DE comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula G-R-G- $X_{60}$ , en donde  $X_{60}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T y V; y el bucle FG comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula  $X_{61}$ - $X_{62}$ - $X_{63}$ - $X_{64}$ - $X_{65}$ - $X_{66}$ - $X_{67}$ - $X_{68}$ - $X_{69}$ - $X_{70}$ , en donde  $X_{61}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W e Y;  $X_{62}$  es A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{63}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{64}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W e Y;  $X_{65}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{66}$  se selecciona del grupo que consiste en F, W e Y; y  $X_{70}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{69}$  se selecciona del grupo que consiste en F, W e Y; y  $X_{70}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W e Y.

- En una realización preferida descrita en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende bucles BC, DE y FG, en donde el bucle BC comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula  $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$ , en donde,  $X_{51}$  se selecciona del grupo que consiste en C, F, I, S, V, W e Y;  $X_{52}$  es L;  $X_{53}$  es P;  $X_{54}$  se selecciona del grupo que consiste en C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{55}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{56}$  es G;  $X_{57}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W e Y;  $X_{58}$  se selecciona del grupo que consiste en A, G, L, M y S; y  $X_{59}$  se selecciona del grupo que consiste en C, H, N, Q, S e Y; el bucle DE comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula G-R-G-X<sub>60</sub>, en donde  $X_{60}$  se selecciona del grupo que consiste en C, E, I, L, M, Q, T y V; y el bucle FG comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula  $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$ , en donde  $X_{61}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, I, L, M y V;  $X_{62}$  es C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{63}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W e Y;  $X_{64}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{65}$  se selecciona del grupo que consiste en A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W e Y;  $X_{66}$  se selecciona del grupo que consiste en C, F, I, L, M, P, T, V, W e Y;  $X_{67}$  se selecciona del grupo que consiste en C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W e Y;  $X_{68}$  se selecciona del grupo que consiste en W e Y; y  $X_{69}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W e Y;  $X_{70}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W e Y.
- En una realización más preferida descrita en el presente documento, la Adnectina antimiostatina comprende bucles BC, DE y FG, en donde el bucle BC comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula  $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$ , en donde,  $X_{51}$  se selecciona del grupo que consiste en F, S y W;  $X_{52}$  es L;  $X_{53}$  es P;  $X_{54}$  se selecciona del grupo que consiste en C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W e Y;  $X_{55}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V e Y;  $X_{56}$  es G;  $X_{57}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, H, K, L, M, N, R, V, W e Y;  $X_{58}$  se selecciona del grupo que consiste en A, G y L; y  $X_{59}$  se selecciona del grupo que consiste en H, N y Q; el bucle DE comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula G-R-G-X<sub>60</sub>, en donde  $X_{60}$  se selecciona del grupo que consiste en C, E, I, L, M y V; y el bucle FG comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula  $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$ , en donde  $X_{61}$  se selecciona del grupo que consiste en I y V;  $X_{62}$  es C, F, I, L, M, T, V, W e Y;  $X_{63}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T y V;  $X_{64}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W e Y;  $X_{65}$  se selecciona del grupo que consiste en A, G, S, T y W;  $X_{66}$  se selecciona del grupo que consiste en F, I, V, W e Y;  $X_{67}$  se selecciona del grupo que consiste en F, H, I, L, M, V, W e Y;  $X_{68}$  se selecciona del grupo que consiste en A, C, F, G, I, K, L, M, T, V y W;  $X_{69}$  se selecciona del grupo que consiste en W e Y; y  $X_{70}$  se selecciona del grupo que consiste en A, G, K, L, M, P, Q y R.
- En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la Adnectina antimiostatina está codificada por una secuencia de ácido nucleico como se establece en una cualquiera de las SEQ ID NO: 124-167, 240-251 y 284-305 (secuencias de longitud completa de las Tablas 2, 5 y 6). En algunas realizaciones, la Adnectina antimiostatina está codificada por una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 124-167, 240-251 y 284-305. En una realización de la invención, la Adnectina antimiostatina está codificada por una secuencia de ácido nucleico como se establece en una cualquiera de las SEQ ID NO: 296, 301 y 305. La fibronectina se une de forma natural a ciertos tipos de integrinas a través de su motivo de unión a integrinas, "arginina-glicina-ácido aspártico" (RGD). El polipéptido de la invención comprende un dominio <sup>10</sup>Fn3 que carece del motivo de unión a integrina (RGD). El dominio de unión a integrina puede eliminarse alterando la secuencia RGD mediante sustitución, eliminación o inserción de aminoácidos.
- En algunas realizaciones descritas en el presente documento, las secuencias de aminoácidos de los bucles BC, DE y/o FG idénticas a la parte subrayada de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-38, 39-45 y 46-79, respectivamente, como se muestra en la Tabla 1, se injertan en andamios de proteína distintas de dominio <sup>10</sup>Fn3. Por ejemplo, una o más secuencias de aminoácidos de bucle se intercambian o se insertan en uno o más bucles de CDR de una cadena pesada o ligera de anticuerpo o fragmento de la misma. En otras realizaciones descritas en el presente documento, el dominio proteico en el que se intercambian o insertan una o más secuencias de bucle de aminoácidos incluye, pero no se limita a, dominios Fn3 de consenso (Centocor, EE.UU.), proteínas repetidas anquirina (Molecular Partners AG, Zurich Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd, Cambridge, MA), nanocuerpos de camélidos de dominio único (Ablynx, Bélgica), Lipocalinas (por ejemplo, anticalinas; Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), Avímeros (Amgen, California), afícueros (Affibody AG, Suecia), ubiquitina (por ejemplo, afílinas; Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania), miméticos de epítopos de proteínas (Polyphor Ltd, Allschwil, Suiza), andamios de haces helicoidales (por ejemplo, afícueros, Complix, Bélgica), Dominios Fyn SH3 (Covagen AG, Suiza) o atrímeros (Anaphor, Inc., CA).
- Las SEQ ID NO de los bucles BC, DE y FG de las Adnectinas antimiostatina ilustrativas descritas en el presente documento y las Adnectinas antimiostatina de la invención (véase 3116\_A06) se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1

Bucles BC, DE y FG de las Adnectinas antimiotistatina						
	Secuencias de bucle					
Clon	Bucle BC	SEQ ID NO:	Bucle DE	SEQ ID NO:	Bucle FG	SEQ ID NO:
1979_B06	<u>SWSLPHAGHV</u>	7	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTKSQMIHYMP</u>	46
2062_G02	<u>SWVSPRGRAR</u>	8	<u>PGRGST</u>	40	<u>TIYRDGMSHHD</u> P	47
2522_C09	<u>SWEVPRGLAR</u>	9	<u>LGRGST</u>	41	<u>TVYRDGPLLLAP</u>	48
2523_G06	<u>SWWAPGLAR</u>	10	<u>PGRGST</u>	40	<u>TIFRTGMVQYDP</u>	49
2524_C11	<u>SWTLPHAGLAH</u>	11	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTNSEIILYKP</u>	50
2524_D09	<u>SWYLPYPAHMN</u>	12	<u>PGRGLT</u>	42	<u>TLTKSQILHHRP</u>	51
2524_E10	<u>SWSLPFAGHLN</u>	13	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTRSKIIHYMP</u>	52
2524_H05	<u>SWSLPYGLAN</u>	14	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTHSNIIRYVP</u>	53
2524_H11	<u>SWSLPHAGHAAH</u>	15	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVSSTKVIVYLP</u>	54
2525_B01	<u>SWTLPNFGLIN</u>	16	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TITKSTIIYKP</u>	55
2525_D02	<u>SWTLPHAGRAH</u>	17	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTTTSVILYKP</u>	56
2525_D05	<u>SWSLPYAGHLN</u>	18	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTKSQLIHYP</u>	57
2525_F07	<u>SWSLPYAAHMN</u>	19	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTRSQVIIHYMP</u>	58
2987_A06	<u>SWSLPHAGHAAH</u>	15	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTKSKIIHYMP</u>	59
2987_B04	<u>SWSLPYPGHLN</u>	20	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTKSKIIHYMP</u>	59
2987_B09	<u>SWTLPHAGRAH</u>	17	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTRSKIIHYMP</u>	52
2987_C02	<u>SWSLPYAGHAAH</u>	21	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTKSKIIHYMP</u>	59
2987_D05	<u>SWSLPHAGHAAH</u>	15	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTRSKIIHYMP</u>	52
2987_E03	<u>SWSLPYPGHLN</u>	20	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTRSKIIHYMP</u>	52
2987_E08	<u>SWTLPHAGRAH</u>	17	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVSSTKVIIHYKP</u>	60
2987_F01	<u>SWSLPYAGHAAH</u>	21	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTRSKIIHYMP</u>	52
2987_F06	<u>SWSLPHAGHAAH</u>	15	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTKSKVIIHYMP</u>	61
2987_G04	<u>SWSLPYPGHLN</u>	20	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTKSKVIIHYMP</u>	61
2987_G09	<u>SWTLPHAGRAH</u>	17	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVSSTKVIVYLP</u>	54
2987_H02	<u>SWSLPYAGHAAH</u>	21	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTKSKVIIHYMP</u>	61
2987_H07	<u>SWTLPHAGRAH</u>	17	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTTTKVIIHYKP</u>	62
3006_A10	<u>SWDAPGGLAR</u>	22	<u>TGRGST</u>	43	<u>TIDRDGVNHFAP</u>	63
3007_B08	<u>SWSLPTPGLAH</u>	23	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTHHGIVIGYKP</u>	64
3007_C09	<u>SWSLPHRGVAN</u>	24	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTGANVIIYKP</u>	65
3007_C10	<u>SWSLPSSGVAH</u>	25	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVNTNTGVIYKP</u>	66
3008_A03	<u>SWSLPHHGFGH</u>	26	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTATGIIYKP</u>	67
3008_B08	<u>SWSLPHAGDAH</u>	27	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTRAGFYRYKP</u>	68
3008_D04	<u>SWSLPHNGVAH</u>	28	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTREEVISYKP</u>	69
3008_F01	<u>SWSLPRQGLAN</u>	29	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTAAGVIIYKP</u>	70
3008_G01	<u>SWSLPGPGHFH</u>	30	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTANQPIIYKP</u>	71
3008_G03	<u>SWSLPHPGGLH</u>	31	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TITPETIIVYKP</u>	72
3115_D04	<u>SWDAPRGLAR</u>	32	<u>FGRGTT</u>	44	<u>TIDRDGTRSFDP</u>	73
3115_E06	<u>SWDAPAGLAR</u>	33	<u>VGRGNT</u>	45	<u>TIFRDGPVWTWDP</u>	74
3116_A06	<u>SWSLPHQGKAN</u>	34	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTDTGYLKYKP</u>	75
3116_A07	<u>SWDAPKGLAR</u>	35	<u>VGRGNT</u>	45	<u>TIFRDGPVWTWDP</u>	74
3116_C01	<u>SWSLPNPGIAH</u>	36	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTGSDDTIFYKP</u>	76
3116_C06	<u>SWSLPRPGNAH</u>	37	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTGKDVVKYKP</u>	77
3116_H06	<u>SWDAPAGLAR</u>	33	<u>VGRGNT</u>	45	<u>TIFRDGVVNYGP</u>	78
3146_A08	<u>SWSLPNPGNAH</u>	38	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTDGFIYKP</u>	79

Las SEQ ID NO de monoAdnectinas antimiotistatina ilustrativas descritas en el presente documento y monoAdnectinas antimiotistatina ilustrativas de la invención (véase 3116\_A06) se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

MonoAdnectinas antimostatina	
	Secuencia
1979_B06 también denominado en el presente documento ATI-1133 (Secuencia del núcleo 1 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<p>Secuencia de aminoácidos</p> <p><u>M</u>GVSIDVPRDLEVVAA<u>T</u>PTSSLIS WSLPHAGHVNYRITYGETGGN SPVQ<u>EFT</u>VPGRGTATISGLKPG V<u>DYTHIVVYAVT</u>LT<u>KSQMIHYMPI</u> S<u>IN</u>YRTE<u>IDKPSQ</u>Q<u>HHHHH</u> (SEQ ID NO: 80)</p> <p>Secuencia de ácido nucleico</p> <p>ATGGGGAGTTTCTGATGTGCCGGGACCT GGAAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCC TGCCTGATCAGCTGGTCTCTGCCATGCT GGTCATGTGA<u>ACTT</u>ACCGCATCACTTA CGCGAAACAGGAGGGCAATAGGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCCTGGTGGTGT TACAGCTACCATCAGGGCCCTAAACCTTG GGGTGATATA<u>CCATC</u>ACTGTGTATGCT GTCA<u>CTGACTAAATCTCAGATGATCCA</u> TTACATGCCAAT<u>TTCCATTAA</u>TTACGGCAC AGAA<u>ATTGACAAACCATTCCCAGCACCAC</u> ACCACCAAC (SEQ ID NO: 24)</p>

(continuación)

MonoAdrecolinas antimiotostatina	
	Secuencia
	Secuencia de aminoácidos
2062_G02 también denominado en el presente documento AdT-1134 (Secuencia del núcleo 2 de Adrecolina que tiene la secuencia terminal AdNT-1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6) ID NO: 81)	<u>M</u> G VSDVPRDLEVVAAIPTSLLIS W VSPRGRARYYRITYGETGGNS PVQEFTVPGRGSTATISGLKPGV DYTIIVYAVITYRDGMSHDPISI NYRTE <u>D</u> KPSQHIIIIII (SEQ ID NO: 81)  ATGGGGAGTTCTGATGTGCCCGCGGACCT GGAAAGTGGGTTGCCACCCACCAAGCC TGCTGATCAGCTGGTTCTCCGGTGGT CGTGCTCGATATTACCCGATCACTTACGG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCCCTGTCCAG GAGTTCACITGGCTGGCTGGTGGTTCTAC AGCTACCATTAGGGCCCTAAACCTGGCG TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTATCTACCGTGACGGTATGTTCTCATCAT GACCCAATTCATTAATTACCCGACAGA AATTGACAAACCATCCCCAGCACCATCACC ACCACAC (SEQ ID NO: 125)

(continuación)

MonoAdenichinas antimiotastina	
	Secuencia de aminoácidos
2522. C09 (Secuencia del núcleo 3 de Adenictina que tiene la secuencia terminal AdCT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<u>M</u> CVSDVIPRDL <u>E</u> VVA <u>A</u> ITPT <u>S</u> LIS WEVPRGL <u>A</u> RYYR <u>I</u> TYGETGGNS PVQ <u>E</u> FTV <u>L</u> GRGSTATIS <u>G</u> LKP <u>G</u> V DY <u>T</u> TTIV <u>V</u> AVT <u>V</u> YRD <u>G</u> PLLAPISI NYR <u>T</u> E <u>D</u> KPS <u>Q</u> HHHHH (SEQ ID NO: 82)

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotisiña		
	Secuencia de aminoácidos	Secuencia
2523_G06 (Secuencia del núcleo 4 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<u>M</u> GVSDVPRDLEVVAA <u>T</u> PTSLIS WWAP <u>L</u> GLARYYR <u>T</u> TYGETG <u>N</u> S PVQE <u>F</u> I VPCIRG <u>S</u> T <u>A</u> TISGLKPGV DY <u>T</u> ITVYAV <u>T</u> HFR <u>T</u> G <u>M</u> V <u>Q</u> Y <u>D</u> PISI NYR <u>T</u> E <u>I</u> D <u>K</u> P <u>S</u> Q <u>H</u> IIIHII (SEQ ID NO: 83)	ATGGGGAG <u>T</u> CT <u>G</u> AT <u>T</u> G <u>C</u> CC <u>G</u> GG <u>A</u> CC <u>T</u> GGA <u>A</u> GT <u>G</u> GT <u>T</u> G <u>C</u> CA <u>CC</u> CC <u>A</u> CC <u>A</u> G <u>C</u> TG <u>C</u> T <u>G</u> AT <u>C</u> AG <u>C</u> T <u>G</u> GT <u>G</u> GG <u>CC</u> CC <u>G</u> T <u>G</u> GG <u>T</u> CT <u>T</u> G <u>C</u> T <u>G</u> AT <u>T</u> AT <u>A</u> CC <u>G</u> CA <u>T</u> ACT <u>T</u> AC <u>G</u> CG <u>A</u> AA <u>C</u> AC <u>G</u> GG <u>A</u> GG <u>C</u> AA <u>T</u> AG <u>C</u> C <u>T</u> GT <u>C</u> AG GAG <u>T</u> T <u>C</u> ACT <u>G</u> GT <u>C</u> CC <u>G</u> CT <u>T</u> AA <u>A</u> CC <u>T</u> GG <u>C</u> AG <u>C</u> T <u>A</u> CC <u>A</u> T <u>C</u> AG <u>G</u> GG <u>C</u> CT <u>T</u> AA <u>A</u> CC <u>T</u> GG <u>C</u> T <u>G</u> AT <u>G</u> TT <u>A</u> CC <u>A</u> TC <u>C</u> AC <u>T</u> G <u>T</u> GT <u>G</u> AT <u>G</u> C <u>T</u> GT <u>C</u> A CT <u>A</u> TC <u>T</u> CC <u>G</u> T <u>A</u> CC <u>GG</u> CA <u>T</u> GG <u>T</u> T <u>C</u> AT <u>T</u> G <u>A</u> CC <u>C</u> AA <u>T</u> TT <u>C</u> CA <u>TT</u> AA <u>T</u> AC <u>GG</u> CA <u>C</u> AG <u>A</u> A <u>AT</u> TG <u>A</u> CA <u>A</u> CC <u>A</u> TC <u>CC</u> AG <u>C</u> AC <u>AT</u> TC <u>AC</u> ACC <u>AC</u> AC (SEQ ID NO: 127)

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotostatina	
	Secuencia de aminoácidos
	Secuencia
2524_C11 (Secuencia del núcleo 5 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AchNT1 (subrayada) y AchCT1 (cursiva) con etiqueta His6) ID NO: 84)	<b>MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLIS</b> WTIPHAGL <b>AHY</b> YRITYGETGGN SPVQEFTIVPGRGVTA <b>TISGL</b> KPG VIDYITVYAVT <b>LTNSEHLY</b> KPHSI NYRTE <b>IDKPSQHIIHHII</b> (SEQ ID NO: 128)  ATGGGAGT <b>TTCTGAT</b> TGTGCCGGACCT GGAAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCC TGCCTGATCAGCTGGACTCTGCCGATGCT GGTCTTGGCACTATTACCGCATTCACCTTA CGGCCAAACAGGAGGGCAATTAGCCCTGTC CAGGAGT <b>TCACTGTGCCTGGT</b> CGTGGTGT TACAGCTACCATCAGGGGCC <b>TTAACCTG</b> GGGTGATTA <b>ACCATCAG</b> GGCCCTAAACCTG GTC <b>ACTCTGACTAATTCTGAGATTATCCTT</b> TACAAG <b>CCAAATTCCATTAA</b> TTACGGCAC AGAAATTGACAAACC <b>ATCCCAGCAC</b> ACCAC <b>ACCAC</b> (SEQ ID NO: 128)

(continuación)

	MonoAdnectinas antimiotastina	Secuencia	Secuencia de ácido nucleico
	Secuencia de aminoácidos	Secuencia	Secuencia de ácido nucleico
2524_D09 (Secuencia del núcleo 6 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6) ID NO: 85)	<u>MGVSDVPRDLEVVVAATPTSLI</u> S WYI PYPAAHMNNYRITYGETGGN SPVQE <b>TTVPGRC</b> LTATISGLKPG VDY <b>TTIVYAV</b> ILTKSQLIHRPIS INYRTE <b>IDKPSQ</b> HHHHHH (SEQ ID NO: 85)	ATGGGGAGT <b>TTCTG</b> ATGTGCGGGCGGGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGGCC TGCTTGATCAGCTGGTACCTCCCGTATCCT GGCGATATGAACATTACCGCATCAGCTTA CGGGGAACAGGAGGGAAATAGCGCTGTC CAGGAGT <b>TTCA</b> CTGTGCGCTGGGGGTCT GACAGCTACCATCAGGGGCCCTAAACCTG GCGTIGATTAA <b>CCATC</b> ACTGIGTIAIGCT GTC <b>ACTCTG</b> ACAAATCTCAGATTCTCCA TCATAGGCCAATTCCATTAAATTACCGCA CAGAAATTGACAACCATTACCGCAC CACCACCCAC (SEQ ID NO: 129)	

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotostatina	
	Secuencia de aminoácidos
2524_E10 (Secuencia del núcleo 7 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<u>M</u> GIVSDVPRDLEVVAATPT <u>S</u> LLIS <u>W</u> SLP <u>F</u> A <u>G</u> HLNY <u>Y</u> R <u>T</u> YGETGGN SP <u>Q</u> E <u>F</u> T <u>V</u> P <u>G</u> R <u>G</u> V <u>T</u> A <u>T</u> IS <u>G</u> LKPG <u>V</u> D <u>Y</u> T <u>T</u> V <u>V</u> A <u>V</u> ILTRSK <u>H</u> YMP <u>I</u> S <u>I</u> N <u>Y</u> R <u>T</u> E <u>I</u> D <u>K</u> P <u>S</u> Q <u>H</u> <u>H</u> <u>H</u> <u>H</u> <u>I</u> (SEQ ID NO: 86)

(continuación)

MonoAdnectinas antimipostatina	
	Secuencia de aminoácidos
2524_H05 (Secuencia del núcleo 8 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<p><u>MGVSDVPRD</u><u>L</u>IFVVAATPTSLIS WSLPYSGLANYRITYGETGGN SPVQEETVPGRGVATISGLKPG VDYTTIVYAVTILTHSNIRYVPISI NYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 87)</p> <p>ATGGGAGGTTCTCGATGTCGGGGGAGCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACAGGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCTTATTCCTG GCCTTGCGAACTTACCGCATCACTTAC GGCGAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC AGGAGTTCACTGTGGCCTGGTGTGGGGTT ACAGCTACTATCAGGGCCCTTAACCTGG CGTIGATTACCAATCACIGIGTATGCTGT CACTTGACTCACTCTAATAATTCCGAT ACGTGCCAATTCCATTAAATTACCGCACA GAAATTGACAACCATCCAGCACCAC CCACCAAC (SEQ ID NO: 131)</p>

(continuación)

MonoAchetinas antimiosatina		
	Secuencia de aminoácidos	
2524_H11 (Secuencia del núcleo 9 de Adneclina que tiene la secuencia terminal AdNT <sup>1</sup> (sobrayada) y AdCT <sup>1</sup> (cursiva) con etiqueta His <sup>6</sup> )	<u>M</u> GVSDVPRDLEVVAA <u>T</u> PT <u>S</u> LLIS <u>W</u> SI <u>L</u> PHAG <u>H</u> AH <u>Y</u> Y <u>R</u> I <u>I</u> Y <u>G</u> E <u>T</u> CGN <u>S</u> P <u>V</u> QE <u>K</u> T <u>V</u> P <u>G</u> RC <u>V</u> T <u>A</u> T <u>I</u> S <u>G</u> L <u>K</u> PG <u>V</u> D <u>Y</u> T <u>I</u> T <u>V</u> Y <u>A</u> V <u>T</u> V <u>S</u> S <u>T</u> K <u>V</u> V <u>I</u> L <u>P</u> S <u>I</u> N <u>Y</u> R <u>T</u> E <u>I</u> D <u>K</u> P <u>S</u> Q <u>H</u> I <u>H</u> I <u>H</u> I <u>H</u> (SEQ ID NO: 88)	Secuencia de ácido nucleico

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotostatina	
	Secuencia de aminoácidos
2525_B01 (Secuencia del núcleo 10 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<p><u>MGVSDVPRDLEVVAATPTISLIS</u> WT<sup>1</sup>PN<sup>2</sup>CLIN<sup>3</sup>YRITYGETGGNS PVQEF<sup>4</sup>TVPG<sup>5</sup>RGVTATISGLKPGV DY<sup>6</sup>TITYAVTRIK<sup>7</sup>SHYKPISINY RTEIDKPSQHIIIIII (SEQ ID NO: 89)</p>

(continuación)

	Secuencia de aminoácidos	Secuencia	Secuencia de ácido nítrico
	Nombre de la secuencia		
2525_D02	<u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSSLIS</u> <u>WILPHAGRAHYYRITYYGETGGIN</u> <u>SPVQEFTIVPGRGVATISGLKPG</u> <u>VIDYTTIVYAVTIVTTTYSVILYKPIS</u> <u>INYRTEIDKPSQHHHHHHH (SEQ</u> <u>ID NO: 90)</u>	ATGGGGAGTITCTGATGTTGCCACCCACCCAGGCC GGAAAGTGGTGGCTGGCCACCCACCCAGGCC TGGTGTGATCAGCTGGACTTGGCGOATGGCT GGTCGTGGCACTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGGGGTGT TACAGCTTACCATCAGGGGCCCTAAACCTTG GGGTGATTATAACCATCACTGGTGTATGGCT GTCACTGTGACGACAACCTCCGGTGAATCCT TTACAAGCCAATTCCATTAAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCAC CACCACCCAC (SEQ ID NO: 134)	

(continuación)

MonoAdnectinas antimitostatina	
	Secuencia de aminoácidos
2525_D05  (Secuencia del núcleo 12 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT <sup>1</sup> (subrayada) y AdCT <sup>1</sup> (cursiva) con etiqueta His6) ID NO: 91)	<u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSSLIS</u> <u>WSILPYAGHLNYYRITYGETGGN</u> <u>SPVQEFTVPGRCGVATISGLKPG</u> <u>VIDYTTTVYAVTLLTKSQLJHYMPI</u> <u>SINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ</u> <u>ID NO: 91)</u>

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotisiña	
	Secuencia de aminoácidos
	Secuencia
2525_F07 (Secuencia del núcleo 13 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT <sup>1</sup> (subrayada) y AdCT <sup>1</sup> (cursiva) con etiqueta His <sub>6</sub> )	<p><u>MGVSDVPRDLEEVVAA</u>PTSSLIS WSLPYAAHMNYYRITYYGETGGN SPVQEFIVPGRGVTAISGLKPG VDYITIVYAVTILRSQVIHYMPI SINYRTE<u>IDKPSQHIIIIH</u> (SEQ ID NO: 92)</p> <p>ATGGGGAGTTCTGATGTGGCCGGGACCT GGAAAGTGGTTGGCTGCCACCCCCACCCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGGCGTATGGCT GCTCACATGAACATTACCGCATCACTTA CGGGAAACAGGAGGCAATAAGGCCRGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGGGCCTTAACCTG GGGTGATTACCATCAGTGTTGCT GTCACTTGACTAGATCACAGGTGATTCA TTACATGCCAATTCATTAAATTACCGCAC AGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATC ACCACCCAC (SEQ ID NO: 136)</p>

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotiostatina		
	Secuencia de aminoácidos	
2987_A06 (Secuencia del núcleo 14 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (sobrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<u>M</u> CVSDVPRDLEVVAA <u>T</u> PT <u>S</u> LLIS <u>W</u> SLPHAGL <u>A</u> H <u>I</u> YYR <u>T</u> TYGET <u>G</u> GN <u>S</u> PV <u>Q</u> E <u>K</u> TVP <u>G</u> RV <u>T</u> ATIS <u>G</u> L <u>K</u> PG <u>V</u> DY <u>T</u> IVYAV <u>I</u> LTK <u>S</u> HIH <u>Y</u> MP <u>I</u> S <u>I</u> N <u>Y</u> R <u>T</u> E <u>I</u> D <u>K</u> PS <u>Q</u> HHHHH (SEQ ID NO: 93)	ATGGGTGT TAGTGATGT TCCGGTGA TCT GGAAGTTGGCAGCAACCCGACCAAGGCC TGCTGATTAGCTGGTCACTGGCGCATGCA GGTCATGCACATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTCA GGAA <u>T</u> TCACCCGTCCGGGT <u>C</u> GGTGTAA CCGCA <u>AC</u> CAATTAGCGG <u>T</u> CTGA <u>A</u> CCGGGT GT <u>T</u> GAA <u>CC</u> CAATTACCG <u>T</u> TA <u>T</u> GCAG <u>T</u> <u>A</u> CC <u>C</u> CTGAC <u>CC</u> AAAG <u>C</u> AA <u>A</u> ATT <u>T</u> TC <u>AT</u> TA <u>T</u> AT <u>G</u> CC <u>G</u> ATT <u>A</u> GC <u>AT</u> TA <u>A</u> TT <u>T</u> CG <u>C</u> AC <u>G</u> <u>A</u> A <u>A</u> TT <u>G</u> AT <u>A</u> AC <u>C</u> CG <u>A</u> GG <u>C</u> AC <u>G</u> AT <u>C</u> AT <u>C</u> AT <u>C</u> AC <u>C</u> AT <u>C</u> AT (SEQ ID NO: 137)

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotatina	
	Secuencia de aminoácidos
2987_804 (Secuencia del núcleo 15 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<u>MGVSDVPRDILEVVVAATPTSLLIS</u> <u>WSI</u> PYP <u>PGHILNY</u> YRITYGETGGN SPV <u>QELFTVPG</u> RGVTA <u>TISGL</u> KPG <u>VDYTHIVYAVII</u> TKSKIHYMPIS <u>INYRTEIDKPSQI</u> HHHHH (SEQ ID NO: 94)

	Secuencia de ácido nucleico
	ATGGGGTGT <sup>TT</sup> AGTGTATGTTCCGG'GTGATCT GGAAAGTGTGTTGGCAGCAACCCGACCAAGCC TGCTGATTAGCTGGTCACTGGCGTATCCG GGTCATCTGAATTAATCTGTATTACCTAT GGTGAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAATTCAACCGTTCCGGTGGTGTAA CCGCAACCAATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTGATTACACCATACCGTTATGCAGTT ACCTGACCAAAAGCAAATTATTCAITTA TATGCCGATTAGCATTATTATCGCACCG AAATTGATAAACCGAGCCAGCATTCAIT CACCATT (SEQ ID NO: 138)

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotostática		
	Secuencia de aminoácidos	Secuencia
2987_B09 (Secuencia del núcleo 16 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT 1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<u>MGVSDVPRDLEVVAAITPTSI</u> LIS W <u>I</u> LP <u>H</u> AGRAH <u>Y</u> YR <u>I</u> TYGETGGN SPVQ <u>E</u> FTIVPGRGV <u>T</u> ATIS <u>G</u> LI <u>K</u> PG VDY <u>T</u> ITIV <u>Y</u> AV <u>T</u> IL <u>R</u> SK <u>H</u> YMP <u>I</u> S IN <u>Y</u> R <u>T</u> E <u>D</u> K <u>P</u> S <u>Q</u> <u>H</u> HHHHI (SEQ ID NO: 95)	ATGGGTGT**TAGTGATGTTCCCGGTGGATCT GGAAGTTGTTGCAGCAACCCGGACCAGGCC TGCTGATTAGCTGGACCCCTGCCGCATGCCA GGTCGTGCACATTAATTATCGTATTACCTAT GGTGAACCCGGTGGTAATAGTCGGTCA GGAATTCA <u>CCCGT</u> TCCGGGTCGGTGGTTA CGGCA <u>ACC</u> ATTAGCGGTCTGA <u>AAAC</u> GGGT GTTGATTAC <u>CC</u> ATTAC <u>CC</u> GT <u>T</u> ATGCAGTT ACCC <u>CT</u> GA <u>CC</u> GG <u>CA</u> GG <u>AA</u> AT <u>TT</u> CCATT TATGCCGATTAGCATTAA <u>TT</u> ATCG <u>CA</u> CCG AA <u>AT</u> TGATAA <u>AC</u> CC <u>GA</u> GG <u>CC</u> AG <u>CA</u> T <u>CA</u> T CACC <u>AT</u> CA <u>AT</u> (SEQ ID NO: 139)

(continuación)

## MenoA<sup>+</sup> encodes a s-antimannosidase

2987_C02 (Secuencia del nucleo 17 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	Secuencia de aminoácidos <u>MGVSDVPRDLEEVVAATPESLJIS</u> WSLPYAGHAIYIYRITYGETGGN SPVQEFTIVPGRGVTATISGLKPG VIDYTHIIVYAVLTIKSKHIIYMPIS INYRTEIDKPSQHIIIIII (SEQ ID NO: 96)	Secuencia de ácido nucleico ATGGGGTGTAGTGTGATCTCGCGTGTGATCT GGAAGTGTGTTGCAGCAACCCGACCAGCC TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATGCA GGTCATGCACATTATTATCGTATTACCTAT GGTGAACCCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAATTACCGGTTCCGGGTCTGTTGTTA CCGCAACCCATTAGGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTAACGGTTATGCAGTT ACCCCTGACCAAAAGCAAATTATTCA TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG AAATTGATAAACCGAGCCAGGCATCAT CACCACAT (SEQ ID NO: 140)
ManoAdnectinas antimiotatina	Secuencia	Secuencia de ácido nucleico

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotostatina		
	Secuencia de aminoácidos	Secuencia
2987_D05 (Secuencia del núcleo 18 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6) ID NO: 97)	<u>M</u> GVSDVPRDLEVVAA <u>T</u> PTISLLIS WSL <u>P</u> HAGHAIHYR <u>T</u> YGETGGN SPV <u>Q</u> EFTV <u>P</u> GRCVTA <u>I</u> SGLKPG VD <u>Y</u> THIVYAV <u>T</u> LR <u>S</u> KIHYMP <u>I</u> S IN <u>Y</u> RT <u>E</u> IDK <u>P</u> S <u>Q</u> IIIIIIII (SEQ ID NO: 97)	ATGGGGTGTAGTGATGTTCCGGTGTGATCT GGAAGTTGGTGCAGCAACCCCGACCAGCC TGCTTGATTAGCTGGTCACTGGCGCATGCA GGTCATGCACATTATTACGTATTACCTAT GGTGAACCGGGTGGTAATAGTCCGGTCA GGAATTCA <u>CC</u> GTCCGGTCCGTGA <u>AA</u> CCGGGT CCGCA <u>AC</u> CAATTAGCGGTCTGA <u>AA</u> CCGGGT GTTGATTAC <u>CC</u> ATTACCGTTATGCAGTT ACCCCTGAC <u>CC</u> GGCAG <u>CC</u> AAATTATT <u>CC</u> ATT TAT <u>CC</u> GGATTAG <u>CC</u> ATTAAATT <u>CC</u> ACCG AAATTGATAAAC <u>CC</u> GAG <u>CC</u> AG <u>CC</u> AT <u>CC</u> AT CACC <u>CC</u> ATCAT (SEQ ID NO: 141)

(continuación)

	MonoAdrenerginas antimastisárias	Secuencia	Secuencia de ácido nucleico
	Secuencia de aminoácidos	Secuencia	Secuencia de ácido nucleico
2987_E03	<u>M</u> GVSDVPRD <b>L</b> I <b>E</b> V <b>V</b> A <b>A</b> T <b>P</b> T <b>S</b> LLIS <u>W</u> SLPYP <b>P</b> GHILNY <b>Y</b> R <b>I</b> TY <b>G</b> ET <b>G</b> N <b>SP</b> V <b>Q</b> EF <b>I</b> IVP <b>G</b> RV <b>T</b> AT <b>I</b> S <b>G</b> LI <b>K</b> PG <b>V</b> D <b>Y</b> T <b>I</b> TV <b>V</b> Y <b>A</b> V <b>T</b> L <b>T</b> RS <b>K</b> II <b>H</b> Y <b>M</b> PIS <b>I</b> N <b>Y</b> R <b>T</b> <i>E</i> <b>M</b> D <b>K</b> P <b>S</b> Q <b>U</b> HHHHH (SEQ ID NO: 98)	ATGGGGTGTATTAGTGATGTTCCCCG'CG'TGATCT GGAAGTTGTTGCAAGCAACCCGGACCAGGCC TGCTTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATCCG GGTCATCTGAATTATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAAATTCA <b>CC</b> GTTC <b>CC</b> GGGTCTGA <b>AA</b> AC <b>CC</b> GGGT <b>CC</b> GA <b>AC</b> CA <b>CC</b> ATTAG <b>CC</b> GG <b>CT</b> GA <b>AA</b> AC <b>CC</b> GGGT <b>GT</b> TGATTAC <b>CC</b> ATTAC <b>CC</b> GT <b>TT</b> AT <b>GC</b> AG <b>TT</b> <b>AC</b> CC <b>CT</b> GA <b>CC</b> GG <b>CA</b> <b>AG</b> CA <b>AA</b> AT <b>AT</b> TC <b>CA</b> TTA <b>T</b> AT <b>G</b> CC <b>G</b> ATTAG <b>C</b> ATTAA <b>AT</b> AT <b>CG</b> CA <b>CC</b> GG <b>AA</b> ATT <b>G</b> ATA <b>AC</b> CG <b>AG</b> CC <b>AG</b> CA <b>TC</b> AT <b>C</b> AT <b>C</b> AT <b>C</b> AC <b>CA</b> <b>TC</b> AT <b>C</b>	

(continuación)

ManoAdnectinas antimiotiñina	
	Secuencia de aminoácidos
2987_E08 (Secuencia del núcleo 20 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6) ID NO: 99)	<u>MGVSDVPRDLEVVAA</u> PTSLIS WTI <sup>1</sup> PHAGRAHYYRITYGETGGN SPVQEFTVYPGRGVYTAIISGLKPG VDYTTIVYA <sup>2</sup> VTSSTKVIHYKPI INYRTEID <sup>3</sup> KPSQHIIHHH (SEQ ID NO: 99)

(continuación)

	MonoAdnectinas antimiotilina	
	Secuencia	Secuencia de ácido nucelico
2987_F01	<b>MGVSDVPRDLEVVAAITPTSLIS</b> WSI_PYAGH_AHY_YRITYGETGGN SPVQEFTIVPGRGVITATISGLKPG VDYTTIVYAVTILTRSKIIHYMPIS INYRTEIDKPSQHIIIIIIH (SEQ ID NO: 100)	ATGGGGTGTAGTGTGATGTTCCGGCGTGTGATCT GGAAAGTTGGTGCAGCAACCCGACCAAGCC TGCTGATTAGCTGGTCACTGGCGTATGCA GGTCATGCACATTATTATCGTATTACCTAT CGTGAACCGGGTGGTAATAGTCCGGGTCA GGAAATTCCACCGGTCCGGGTCTGGGTGTTA CGGAAACCAATTAGCGGTCTGAAACGGGT GTTGATTACACCAATTACCGTTATGCAGTT ACCCCTGACCCGGAGCAAATTATTCCATTAA TATGCCGATTAGCAATTATTATOGCACCG AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT CACCATCAT (SEQ ID NO: 144)

(continuación)

	MonoAdnectinas antimiotistañas	
	Secuencia de aminoácidos	Secuencia
2987_F06 (Secuencia del núcleo 22 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdMr1 (subrayada) y AdCt1 (cursiva) con etiqueta His6)	<u>M</u> GVSDVPRD <u>L</u> LEVVAATPT <u>S</u> LLIS <u>W</u> SL <u>P</u> HAG <u>H</u> YY <u>Y</u> R <u>I</u> TY <u>Y</u> ET <u>G</u> GN <u>S</u> P <u>Y</u> Q <u>E</u> FT <u>I</u> V <u>P</u> G <u>R</u> G <u>V</u> T <u>A</u> TIS <u>G</u> L <u>K</u> PG <u>V</u> D <u>Y</u> T <u>I</u> IV <u>V</u> Y <u>A</u> VT <u>I</u> LT <u>K</u> SK <u>V</u> I <u>H</u> Y <u>M</u> PI <u>S</u> IN <u>Y</u> R <u>T</u> E <u>I</u> D <u>K</u> P <u>S</u> Q <u>H</u> HHHH (SEQ ID NO: 101)	ATGGGTGTAGTGTGATGTTCCCGCGTGTGATCT GGAAGTGTGAGCAACCCGACCCAGCC TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCCGAATGCA GGTCA <u>T</u> GCACAT <u>T</u> ATTATCGTATTACCTAT GGTGA <u>A</u> ACCCGGTGGTA <u>A</u> TAGTCCGGTCA GGAA <u>T</u> TCACCGT <u>T</u> CCGGGTGGTGTGA <u>CCG</u> CA <u>ACC</u> ATTAG <u>CCG</u> G <u>T</u> CTGA <u>AA</u> AC <u>CC</u> GGGT GTTGATTAC <u>CC</u> ATTAC <u>CC</u> GT <u>T</u> ATGCAGTT ACCCTGAC <u>CC</u> AA <u>AG</u> CA <u>AA</u> AG <u>CC</u> AA <u>AG</u> TG <u>G</u> ATT <u>CC</u> ATTA TAT <u>GC</u> CGATT <u>AG</u> CA <u>TT</u> A <u>TT</u> AT <u>CG</u> CA <u>CC</u> G AAATTGATA <u>A</u> AC <u>CG</u> G <u>AC</u> CC <u>AC</u> G <u>AT</u> TC <u>AT</u> CAC <u>CA</u> T <u>TC</u> AT (SEQ ID NO: 145)

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotastina	
	Secuencia de aminoácidos
2987_G04 (Secuencia del núcleo 23 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AgN <sup>1</sup> (subrayada) y AdC <sup>1</sup> (cursiva) con etiqueta His6) ID NO: 102)	<p><b>MGVSIDVPRDLEVVAAATPTSSLIS</b>  <u>WSLPPYPQGHILNY</u>YRITYGETGGN  SPVQ<b>ELTIVPGRGV</b>TATISGLKPG  VDTY<b>TIVVAVT</b>LTKS<b>KV</b>HYMPI  SIN<b>YRTEIDKP</b>SQ<b>QHIIIIII</b> (SEQ</p> <p>ATGGGTGT<sup>1</sup>TAGTGT<sup>2</sup>AGTGT<sup>3</sup>CCCGGTGATCT  GGAAAGTTGT<sup>1</sup>GGCAGCAACCCGGACCCAGCC  TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATCCG  GGTCATCTGAATTATTACGTATTACCTAT  GGTGAAACCCGGTGGTAATAGTCCGGTCA  GGAAATTCAACCGT<sup>1</sup>CCGGGTGGTGGTAA  CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT  GTTGATTACCAATTACCGTTATGCAGTT  ACCTTGACCAAAAGCAAGTGAATTCAATT  TATGCCGATTAGCATTAAATTATCGCACCG  AAATTGATAAACCGAGGCCAGCATCATCAT  CACCATCAT (SEQ ID NO: 146)</p>

(continuación)

		MonoAdnectinas antimiotistatina	
		Secuencia	Secuencia de ácido nucleico
298L...G09	<u>MGVSDVMPRDILEVVAATPTSLIS</u> <u>WTIPLPHAGRRAHYYRITYGETGGN</u> <u>SPVQEFTVPPGRGVATATISGLKPG</u> <u>VDYTTIVYAVTVSSSTKVVVYLPIIS</u> <u>INYRTIEDKPSQHIIIIIIH (SEQ</u> <u>ID NO: 103)</u>	ATGGGGTGTAGTGATGTTCCCGGTGATCT GGAAGTTGTTGCAAGCAACCCGGACCGCC TGCTGATTAGCTGGACCCCTGCCCATGCA GGTCGTGCACTATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGGTGTAAATAGTCGGGTCA GGAATTCAACCGTTCGGGTCTGAAACCGGGT CCGCAACCATAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACCCATTACCGTTATGCAGTT ACCGTTAGCAGGACCAAGTTATTGGTTA TCTGCCGATTAGCAATTATCGCACCG AAATTGATAAACCGAGCCAGCAGCATCAT CACCATCAT (SEQ ID NO: 147)	

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotostatina	
	Secuencia de aminoácidos
2987_H02 (Secuencia del núcleo 25 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<b>MGVSDVPRDLEVVAATPPTSLIIS</b> <u>WSI PYAGHAAHYYRITYGETGGN</u> <b>SPVQEITVPGRGVVTATISGLKPG</b> <b>VDYTTIVYAVTLLIKSKVH YMPI</b> <b>SINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 104)</b>

	Secuencia	Secuencia de ácido nucleico
		ATGCCGTGTITAGTGTATGTTCCGCGTGTCT GGAAGTGTGGCAGCAACCCGACCAGCC TGCIGATTAGCTGGICACIGCCGTATGGCA GGTCATGCACATATTATCGTATTACCTAT GGTGAACCGGGTGGTAAATAGTCGGGTCA GGAATTCAACCGTTCCGGGTCCGTGGTGTAA CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGGT GTTGATTACCCATTACCGTTATGCCAGTT ACCCCTGACCAAAGCAAAAGTGATTCCATTAA TATGCCGATTAGCATTAAATTATCGCACCG AAATTGATAACCGAGCCAGCATCATCAT CACCATCAT (SEQ ID NO: 148)

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotostatina		
	Secuencia de aminoácidos	Secuencia
2987_H07 (Secuencia del núcleo 26 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT 1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta H1s6)	<b>MGVSDVPRDLEVVAAITPISLLIS</b> WILPHIAGRAHYYRITYGETGGN SPVQEFTIVPGRCVTATISOLKPG VIDY <sup>H</sup> ITIVYAVTIVT <sup>C</sup> IKVIHYKPI SINYRTEIDKPSQHIIIIII (SEQ ID NO: 105)	ATGGGTGTAGTGTAGCTCCGGCTGTGATCT GGAAGCTTGTGGCAGCAACCCGGACCAAGCC TGCTGATTAGCTGGACCTTGCCGCAATGCA GGTCGTGCACATTATTACGTATTACCTAT GGTGAACACCGGTGGTAATAGTCGGTTCA GGAATTCAACCGTCCGGTCTGGTGTAAACCGGGT CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATACCGTTATGCGAGTT ACCGTTACCAACCAAGTGGATTCAATTAA TAAACCGATTAGCATTAAATTATCGCACCG AAATTGATAAACCGAGGCCAGCATCAT CACCATCAT (SEQ ID NO: 149)

(continuación)

	MonoAdreclinas antimiotística
	Secuencia
3006_A10 (Secuencia del núcleo 27 de Adreclina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<p>Secuencia de aminoácidos</p> <p>MGVSDVPRDLEVVAAATTSSLIS WDAPGGGLARYYRITYGETGGNS PVQEFIVIGRGSTATISGLKPGVD YTTIVYAVTIDRDGVNHFAPSIN YRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 106)</p> <p>Secuencia de ácido nucleico</p> <p>ATGGGGAGTITCTGATGTGCCGGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCC TGCTTGATCAGCTGGGAGGGCTCCGGGTGGT CTGGCTCGATATTACCCGATCACTTACGG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTGATCGGTCGTGGTAGCAC AGCTACCATCAGGGGCTTAACACCTGGCG TIGATTATAACATCACTGTGTATGCTGTCA CTATCGACCGTGACGGTGTCAACCCTTC GCCCAATTCCATTAAATTACCGCACAGA AATTGACAAACCATCCCCAGCACCATCACC ACCACCAC (SEQ ID NO: 150)</p>

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotostatina		
	Secuencia de aminoácidos	Secuencia
3007_B08 (Secuencia del núcleo 28 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<b>MGVSDVPRDLEVVAAATPTISLIS</b> WSIPTPG <b>LAHYRYRITYGETGGNS</b> PV <b>QETTIVPGRGVTAATISGLKPGV</b> DY <b>TITVYAVTVTHIGVIGYKPISI</b> NY <b>RTEIDKPSQIHHHHHH</b> (SEQ ID NO: 107)	ATGGGAGTTCTGATGTGCCGGCGACCT GGAAGTGGTTGCCACCCACCCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTTGCGACTCCA GGTCTCGCCATTATTACCGCATCACTTAC GGCGAACAGGAGGCAAATAGCCCTGCC AGGAGTTCACTGTCCTGGTCGGTGT ACAGCTACCATCAGGGGCCTAAACCTGG CGTTGATTATACCATCAGCTGGTATGCTGT CACTGTCACTCATCAGGGCGTCATCGGCT ACAAACCAATTCCATTAAATTACCCACCA GAAATTGACAACCATCCCAGCACCAC CCACCCAC (SEQ ID NO: 151)

(continuación)

MonoAdnectinas antiinostatina		Secuencia	Secuencia de ácido nucleico
	Secuencia de aminoácidos		
3007_C09	<u>MGVSDVPRDLEVVVAATPTISLLIS</u> WSIPLPHRGVANYYRITYGETGGN SPVQLEFTIVPGRGVATISGLKPG DYITITVYAVTIVTNTGVIYKPI NYRTEIDKPSQHHHHH (SEQ ID NO: 108)	ATGGGAGTTCTGATGTGCCCCGGGACCT GGAAGTGGTTGGCTGCCACCCCCACAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCCCACCGT GGTGTGGCCAATTATTACCGCATCACTTA CGGGAAACAGGAGGCAATAGCCCCGTC CAGGAGTTCACTGTGCTTGCTGGTGT TACAGCTACCATCAGGGCCTTAACCTG GGGTGTGATTACCATCAGCTGGTGTATGCT GTCACTCTCACTGGAGCGAACGTCATCAT CTACAAACCAATTTCGATTACCGCA CAGAAATTGACAACCATCCCCAGCACCATT CACCACCCAC (SEQ ID NO: 152)	
3007_C10	<u>MGVSDVPRDLEVVVAATPTISLLIS</u> WSIPLSSGVAHYRITYGETGGNS PVQLEFTIVPGRGVATISGLKPGV DYITITVYAVTIVTNTGVIYKPSI NYRTEIDKPSQHHHHH (SEQ ID NO: 109)	ATGGGAGTTCTGATGTGCCCCGGGACCT GGAAGTGGTTGGCTGCCACCCCCACAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCCCACCGC GGTGTGGCCAATTACCGCATCACTTA CGGGCAAAACAGGAGGCAATAGCCCCGTC CAGGAGTTCACTGTGCTGGCTGGTGT TACAGCTACCATCAGGGCCTTAACCTG GGGTGTGATTACCATCAGCTGGTGTATGCT GTCACTCTCACTGGAGCGAACGTCATCAT CTACAAACCAATTTCGATTACCGCA CAGAAATTGACAACCATCCCCAGCACCATT CACCACCCAC (SEQ ID NO: 153)	

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotastina			
	Secuencia de aminoácidos	Secuencia	Secuencia de ácido nucleico
3008_A03 (Secuencia del núcleo 31 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT <sup>1</sup> (subrayada) y AdCT <sup>1</sup> (cursiva) con etiqueta His6)	<u>M</u> GVSDVPR <u>D</u> I <u>E</u> VVA <u>A</u> T <u>P</u> TS <u>L</u> IS WS <u>I</u> LP <u>H</u> I <u>G</u> F <u>G</u> H <u>Y</u> Y <u>R</u> ITY <u>Y</u> GETGGN SPV <u>Q</u> E <u>F</u> T <u>V</u> P <u>G</u> R <u>G</u> V <u>T</u> A <u>T</u> S <u>G</u> LI <u>K</u> PG V <u>D</u> Y <u>T</u> IT <u>V</u> Y <u>A</u> V <u>T</u> V <u>T</u> A <u>T</u> G <u>H</u> I <u>Y</u> K <u>P</u> ISI NYR <u>T</u> E <u>D</u> K <u>P</u> S <u>Q</u> H <u>H</u> H <u>H</u> H <u>H</u> (SEQ ID NO: 110)	ATGGGGAG <u>G</u> TT <u>T</u> C <u>T</u> GAT <u>G</u> T <u>G</u> CC <u>G</u> GG <u>G</u> AC <u>C</u> GG <u>A</u> AG <u>T</u> G <u>G</u> G <u>T</u> GG <u>T</u> GG <u>C</u> CA <u>CCCC</u> AC <u>CC</u> AG <u>CC</u> TG <u>C</u> T <u>G</u> AT <u>C</u> AG <u>C</u> T <u>G</u> G <u>T</u> C <u>T</u> G <u>GG</u> CA <u>T</u> C <u>A</u> TC <u>A</u> GG <u>T</u> TT <u>C</u> GG <u>G</u> CC <u>A</u> T <u>T</u> ATT <u>AC</u> CG <u>C</u> A <u>T</u> C <u>A</u> CT <u>T</u> AC <u>T</u> GG <u>G</u> GA <u>A</u> AC <u>AG</u> GG <u>AG</u> GA <u>A</u> AT <u>AG</u> CC <u>CT</u> GT <u>T</u> CC AG <u>G</u> AG <u>T</u> TC <u>A</u> CT <u>G</u> T <u>G</u> G <u>C</u> CT <u>G</u> T <u>G</u> G <u>T</u> G <u>T</u> AC <u>A</u> G <u>C</u> T <u>A</u> CC <u>A</u> T <u>C</u> AG <u>G</u> G <u>G</u> CC <u>T</u> TA <u>A</u> AC <u>C</u> T <u>G</u> CG <u>T</u> TG <u>A</u> T <u>A</u> CC <u>A</u> T <u>C</u> AC <u>T</u> G <u>T</u> G <u>T</u> TA <u>G</u> C <u>T</u> G <u>T</u> CA <u>T</u> GT <u>C</u> ACT <u>G</u> C <u>T</u> AC <u>GG</u> GG <u>G</u> AT <u>C</u> AT <u>C</u> A <u>T</u> C <u>T</u> AC <u>A</u> AA <u>CC</u> AA <u>A</u> TT <u>C</u> ATT <u>A</u> TT <u>A</u> CC <u>G</u> C <u>A</u> G <u>A</u> AA <u>A</u> TT <u>G</u> AC <u>A</u> AA <u>CC</u> AT <u>CC</u> AC <u>G</u> AC <u>CC</u> AT <u>C</u> A CC <u>A</u> CC <u>CC</u> AC <u>C</u> (SEQ ID NO: 154)	

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotostatina		
	Secuencia de aminoácidos	Secuencia
3008_B08 (Secuencia del núcleo 32 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<u>M</u> GVSDVPRDLEVVAATPTSLIIS WSLPHAGDAHYYRITYGETGGN SPVQELTVPGRGVTA <u>I</u> ISCLKPG V <u>D</u> YITTVYAVT <sup>V</sup> TRAGFYRYKPI SIN <u>Y</u> RT <u>E</u> DKPS <u>Q</u> HHHHHH (SEQ ID NO: 111)	ATGGGGAG <u>T</u> CTGATGTGCCGGGGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCCAGCC TGCTGATCAGCTGGCTCTGCTCTGGCCACGGCC GGTGACGGCCATTATTACCGCATCCTTA CGGGCGAAACAGGAGGCAATA <u>G</u> CCCTGTC CAGGAGT <u>T</u> CACTGTGCCTGGTGGTGT TACAGCTACCA <u>T</u> CA <u>G</u> CCGGCCTTAACCTTG GCGTGTGATTATA <u>CC</u> ATC <u>AC</u> TGGTGTATGGT GTC <u>ACT</u> TGT <u>T</u> ACTAGAGGGGGTTCTACCG CTACAA <u>AC</u> CA <u>AT</u> T <u>CC</u> ATTAA <u>TT</u> ACCGCA CAGAA <u>AT</u> TGACAA <u>AC</u> CA <u>AT</u> CCCAGCACCAC CACCACACCAC (SEQ ID NO: 155)

(continuación)

	Secuencia de aminoácidos	Secuencia	Secuencia de ácido nucelico
3008_D04 (Secuencia del núcleo 33 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdN1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<u>M</u> GVSDVPRDLE <u>V</u> VAA <u>T</u> PT <u>L</u> IS W <u>S</u> I <u>P</u> H <u>I</u> NG <u>V</u> AI <u>H</u> Y <u>R</u> ITY <u>Y</u> GET <u>G</u> N SP <u>V</u> Q <u>E</u> FTV <u>P</u> G <u>R</u> GV <u>T</u> AT <u>I</u> SL <u>K</u> PG V <u>D</u> Y <u>T</u> IV <u>V</u> V <u>A</u> T <u>V</u> T <u>R</u> EE <u>V</u> IS <u>Y</u> K <u>P</u> IS IN <u>Y</u> R <u>T</u> E <u>I</u> D <u>K</u> P <u>S</u> Q <u>H</u> II <u>H</u> II <u>H</u> II <u>H</u> II (SEQ ID NO: 112)	ATGGGGAGTTTCCTGATGTGCCGGGGACCT GGAAAGTGGTTGGCTGCCACCCCCACCCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTTGCCCCATAAT GGTGTGCCCATATTACCGCATCACITA GGCGAAACAGGAGGCAATAAGCCCCGTGTC CAGGAGTTCACITGGCTGGTGGTGT TACAGCTACCATCAGGGCCCTTAACCTCG GGGTTGAITTACCACTCACTGTTGTTATGCT GTCAC TGTCAC TCGGGAGGAAGTCAATCAG CTACAAACCAATTCCATTAAATTACCGCA CAGAAATTGACAACCATCCAGCACCAC CACCACCCAC (SEQ ID NO: 156)	

(continuación)

	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de ácido nucleico
3008_F01 (Secuencia del núcleo 34 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His <sup>6</sup> )	<u>MGVSDVPRDILEVVAATPTSLIS</u> WSI <u>PRQGL</u> ANYRITYGETGGN SPV <u>QEFT</u> VP <u>PGRGVTA</u> ISGLKPG VDY <u>YITV</u> YAVTVAAGVHVKPIS INY <u>RTIEDKPSQHIIHII</u> (SEQ ID NO: 113)	ATGGGGAGTTTCTTGATGTGCCGGGCC GGAAAGTGGTTGCTGCCACCCACCCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTGGGGGTGTCAG GGTC <u>TCG</u> CCAATTATTACCGCATCAGTTA CGGGGAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTC <u>ACTG</u> TGGCTGGTGGTGT TACAGCTACCATCAG <u>GGC</u> TTAAACCTTG GG <u>GTG</u> ATTACCA <u>TC</u> ACTGCTGTATGCT GTC <u>ACTG</u> TCACTGCTGCTGGGGTCATCAT CTACAA <u>ACCA</u> ATTCCATTAA <u>TTACCGCA</u> CAGAA <u>AT</u> TGACAA <u>ACCA</u> T <u>CCCAGC</u> CCAT CACCACCCAC (SEQ ID NO: 157)

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotistatina	
	Secuencia de aminoácidos
3008_G01 (Secuencia del núcleo 35 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNf1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<b>MGVSDVPRDLEVVAAATPISLLIS</b> <u>WSLPGPGHIFHYRITYGETGGNS</u> <b>PVQEFTIVPGRCVVTATISGLKPGV</b> <b>DYTTIVYAVTVTANQPIIYKPII</b> <b>NYRTEIDKPSQHIIHHII</b> (SEQ ID NO: 114)

(continuación)

	MonoAdnectinas antimiotastina
	Secuencia
3008_G03 (Secuencia del núcleo 36 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNTR1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<p>Secuencia de aminoácidos</p> <p><u>M</u>GVSDVPRD<u>L</u>EVVAATPT<u>S</u>LIS WSI<u>P</u>IP<u>G</u>LI<u>G</u>HI<u>G</u>HY<u>R</u>ITY<u>G</u>ER<u>G</u>GN SPV<u>Q</u>E<u>I</u>FTIVPG<u>R</u>GV<u>T</u>AT<u>T</u>S<u>G</u>L<u>K</u>PG VD<u>Y</u>TH<u>T</u>IV<u>V</u>AV<u>T</u>II<u>T</u>P<u>E</u>T<u>I</u>V<u>Y</u>K<u>P</u>ISI NYR<u>T</u>E<u>I</u>D<u>K</u>P<u>S</u>Q<u>H</u>HHHH (SEQ ID NO: 115)</p> <p>Secuencia de ácido nucleico</p> <p>ATGGGAGT<u>T</u>TCTGAT<u>T</u>TCTGAT<u>T</u>GCCGGCGACCT GGAA<u>G</u>GTGG<u>T</u>TG<u>C</u>CC<u>AC</u>CC<u>AC</u>CC<u>AC</u>CC<u>AC</u>CC TGCT<u>G</u>AT<u>C</u>AGCT<u>G</u>GT<u>T</u>CTG<u>C</u>CC<u>AC</u>CC<u>AC</u>CC GG<u>T</u>CT<u>C</u>GG<u>CC</u>AT<u>T</u>ATT<u>A</u>CC<u>G</u>C<u>A</u>T<u>C</u>ACT<u>T</u>A CG<u>G</u>CG<u>AA</u>AC<u>AG</u>GG<u>AA</u>AT<u>A</u>GG<u>CC</u>GA<u>A</u>AT<u>A</u>GG<u>CC</u>CT<u>G</u>TC CAG<u>G</u>AG<u>T</u>CA<u>T</u>CT<u>G</u>CC<u>T</u>GG<u>T</u>CG<u>T</u>GG<u>T</u>GT TAC<u>A</u>GG<u>C</u>T<u>A</u>CC<u>A</u>T<u>C</u>AG<u>GG</u>GG<u>C</u>CT<u>A</u>AC<u>C</u>CT<u>G</u> G<u>C</u>GT<u>T</u>GA<u>T</u>AT<u>A</u>CC<u>A</u>T<u>C</u>ACT<u>G</u>T<u>G</u>T<u>T</u>AT<u>G</u>CT G<u>T</u>CA<u>C</u>TA<u>T</u>CA<u>T</u>CC<u>GG</u>AA<u>AC</u>GG<u>A</u>T<u>C</u>AT<u>T</u>CG<u>T</u> CT<u>A</u>CA<u>AA</u>AC<u>CC</u>AA<u>T</u>TT<u>C</u>CA<u>TT</u>AA<u>TT</u>AC<u>CC</u>GA CAG<u>AA</u>AT<u>T</u>G<u>A</u>CA<u>A</u>AC<u>CC</u>AT<u>CC</u>AG<u>CC</u>AC<u>CC</u>AT CACC<u>AC</u>CC<u>AC</u> (SEQ ID NO: 159)</p>

(continuación)

MonoAdnectinas artimiosistina	
	Secuencia de aminoácidos
3115_D04 (Secuencia del núcleo 37 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6) ID NO: 116)	<b>MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLIS</b> WDAPRG <b>LARYYRITYGETGGNS</b> PVQE <b>ITVFGRCITATISGLIKPGV</b> DYTITVYAVTIDRDGTRSFDPISI NYRT <b>EIDKPSQHIIIIII</b> (SEQ ID NO: 116)

	Secuencia de ácido nítrico
	ATGGGAGCTTCTGATGTGCCGGCGACCT GGAAGTGGTTGGCTGCCACCCACCAAGCC TGCTGATCAGCTGGGACGGCTCGAGAGGT CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTTCCGGCTCGTGGTACCCAC AGCTACCATTAGGGCCCTAAACCTGGCG TTGATTATACCATCACITGTATGCTTGCA CTATCGACCCGTGACGGTACCCGGAGCTTC GACCCAATTTCCATTAAATTACCGCACAGA AATTGACAAACCATCCCCAGCACCATCACC ACCACAC (SEQ ID NO: 160)

(continuación)

MonoAdnectinas antimisostalina	
	Secuencia de aminoácidos
3115_E06 (Secuencia del núcleo 38 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<p><u>MGVSDVPRDLEVVAAITPTSLIIS</u> WDAPAGLARYYRITYGETGGNS PVQEFTTVVGRGNNTATISGLKPGV DYITIVYAVTIFRDGPVIVWDPISI NYRTEIDKPSQHIIIIII (SEQ ID NO: 117)</p> <p>ATGGGGAGTIICTGATGTGCCGGCGAACCT GGAAGTGGTGGCTGCCACCCACCCAGGCC TGCTGATCAGCTGGGACGCTCGGGCTGGT CTGGCTCGATAATTACCGCATCACTTACGG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTGGTGGTCGGTICGTGGTAACAC AGCTACCATCAGGGCCCTAACCTGGCG TIGAIIITACCAIICACTGTGTATGCTGICA CTATCTTCCGTGACGGTCCGTCACCTGG GACCAATTCCATTAAATTACCGCACAGA AATTGACAAACCATCCCCAGCACCATCACC ACCAAC (SEQ ID NO: 161)</p>

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotastina	
	Secuencia de aminoácidos
3116_A06 (Secuencia del núcleo 39 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<b>MGVSDVPRDLLEVVAATTPTISLLIS</b> <u>WSLPHQGKANYRITYGETGGN</u> <b>SPVQEFTVPGRGVATISGLKPG</b> <b>VDY<sup>TTT</sup>VYAVIVDTGYLKVKPI</b> <b>SINYRTEIDKPSQIHHHHH</b> (SEQ ID NO: 118)

	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de ácido nucleico
		ATGGGGAGTTTCCTGATGTGCGCGGACCT GGAAGTGGTTGGCTGCCACCCCCACAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCCACAA GGTAAGCCAATTATTCACCGCATTCACITA CGGGAAACAGGAGGGCAATAGGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGCTGGTGTGT TACAGCTACCATCAGGGCCTTAACCTTG GCGTGTGATTACCA <sup>T</sup> CAC <sup>T</sup> GTATGCT GTCACTGTACTGATA <sup>T</sup> CAGGGTACCTCAA GTACAAACCAATTTCACATTACUGCA CAGAAATTGACAACCATTCCAGCACCAC CACCACCCAC (SEQ ID NO: 162)

(continuación)

	MonoAdnectinas antimiotiostatina
	Secuencia de aminoácidos
3116_A07 (Secuencia del nucleo 40 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdCT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)  ID NO: 119)	<p><b>MGVSDVPRDLEVVAA</b>TPTSLIIS WDAPK<u>CILARY</u>YRITYGETGGNS PVQEFTVVGGRGNTATISGLKPGV DYTTIVYAVTIIFRDGPTVTWDPISI NYRTE<u>IDKPSQHIIHHIIH</u> (SEQ ID NO: 119)</p> <p>Secuencia de ácido nucleico</p> <p>ATGGGAGTTTCTGATTTGGCCGGGACCT GGAAAGTGGTTGCCACCCCCACCAAGCC TGCTTGATCAGCTGGGGACGGCTCCGAAGGGT CTGGCTCGATATTACCCGATCACTTACCG CGAAACAGGAGGGCAATTAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTGGTGGTGTGGTAACAC AGCTACCATCAGGGCCITAACCTGGCG TTGATTATACCATCAGCTGTTGCTATGCTGTCA CTATCTTCCCGTGA<u>CGGTCCCGT</u>CACCTGG GACCCAA<u>TTCCATTAA</u>TTACCGCACAGA AATTGACAAACCATCCAGCACCATCACC ACCACAC (SEQ ID NO: 163)</p>

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotístina	
	Secuencia
3116_C01 (Secuencia del núcleo 41 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His6)	<p>Secuencia de aminoácidos</p> <p><u>MGVSDVPRDLEVVAATP</u>TSILLIS WSLPNPGIAHYYRITYGETGGNS PVQEFTVPGRGVATISGLKPGV DYTITVYAVVLTGSDTIFYKPISI NYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 120)</p> <p>Secuencia de ácido nucleico</p> <p>ATGGGGAGTTCTGATGTGCCCCGGGACCT GGAAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCGGAATCCC GGTATCGGCCATTACCGCATCACTTA CGGCCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCCTGGTGTGTGT TACAGCTACCATCAGGGGCCCTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTTGATGCT GTCACTCTCACTGGCAGTGACACCATCTT CTACAAACCAATTCCATTAAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCCCAGCACCAC CACCACCCAC (SEQ ID NO: 164)</p>

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotostatina			
	Secuencia de aminoácidos		
3116_C06 (Secuencia del núcleo 42 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNT <sup>1</sup> (subrayada) y AdCT <sup>1</sup> (cursiva) con etiqueta His <sub>6</sub> )	<u>MGVSDVPRDLEVVAA</u> TPTSLIIS <u>WSI</u> PRPGNAHYYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGVVTATISGLKPG VDYTITVYAVTVTGTGKDVIKYKPI <u>SINYRTEIDKPSQ</u> HHHHHH (SEQ ID NO: 121)	ATGGGAGGTTCCTGATGTGCCGGCGGACCT GGAAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGGCGGGCCG GGTAACGGCCATTACCGCATCACTTA CGGGAAACAGGAGGCAATAGGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCCTGGTCTGTGT TACAGCTACCATCAGGGGCCCTAAACCTG GCGTTGATTAACCATCACTGTTGTTGCT GTCACTGTTACTGGCAAAGATGTCACTCAA GTACAAACCAATTTCATTAATTACCGCA CAGAAATTGACAACCATTCCAGCACCAC CACCACCCAC (SEQ ID NO: 165)	Secuencia de ácido nucleico

(continuación)

Monoadreclinas antimiotastatina		
	Secuencia de aminoácidos	
	Secuencia	
3116_H06 (Secuencia del núcleo 43 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdN <sup>r</sup> 1 (subrayada) y AdCT1 (cursiva) con etiqueta His <sup>6</sup> )	<u>MGVSDVPRDLEVVAAATPTSSLIS</u> WDAPAGLARYYRITYGETGGNS PVQEFTVVGRGNNTATISGLKPGV DYTITYVAVTIFRDGVVNYGPISI NYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 122)	ATGGGGAGTTCTGATGTGCCGGGGACCT GGAAAGTGGTTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGT CTGGCTCGATATTACGGCATCACTTACGG CGAACAGGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTGGTGGCTCGTGGTAACAC AGCTTACCATCAGCGGCGTTAAACCTGGCG TTGATTATACCATTCACTGTGTATGCTGTC CTATCTTCCGTGACGGTGTGGTCAACTAC GGCCAATTCCATTAAATTACCGCACAGA AATTGACAAACCATCCAGCACCATTACCC ACCACAC (SEQ ID NO: 166)

(continuación)

MonoAdnectinas antimiotostatina		
	Secuencia de aminoácidos	Secuencia
3146_A08 (Secuencia del núcleo 44 de Adnectina que tiene la secuencia terminal AdNt1 (subrayada) y AdCt1 (cursiva) con etiqueta (His6) ID NO: 123)	<u>MGVSDVPRDLEVVAAIPTSLIS</u> WSLPNPGNAHYYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGVTATISGLKPG VDYTITVYAVTVTVDTGFTITYKPIIS INYRTEIDKPSQHHHHH (SEQ ID NO: 123)	ATGGGAGTTCTGATGTGCCCCGGGACCT GGAAAGTGGTGTGCTGCCACCCCCACCCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTGCCGAATCCG GGTAACGCCCCATTACCGCATTCACCTTA GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTGTGT TACAGCTACCATCAGGGGCCCTAAACCTG GCGTTGATTACCCATCACTGTTCTAC GTCACTGTTACTGACACAGGTTCATCAC GTACAAACCAATTTCATTAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCAC CACCACCCAC (SEQ ID NO: 167)

***Adnectinas en competición cruzada y/o Adnectinas que se unen al mismo sitio de unión de Adnectina***

Además, en el presente documento se describen Adnectinas que compiten (por ejemplo, compiten de forma cruzada) por la unión a miostatina con las Adnectinas antimiostatina particulares descritas en el presente documento. Dichas

5 Adnectinas competitivas pueden identificarse basándose en su capacidad para inhibir competitivamente la unión a miostatina de las Adnectinas descritas en el presente documento en ensayos de unión a miostatina convencionales. Por ejemplo, pueden usarse ensayos ELISA convencionales en los cuales una proteína miostatina recombinante se inmoviliza sobre la placa, una de las Adnectinas se marca fluorescentemente y se evalúa la capacidad de las

10 Adnectinas no marcadas para competir por la unión de la Adnectina marcada.

10 Puede realizarse un formato ELISA competitivo para determinar si dos Adnectinas antimiostatina se unen a sitios de unión de Adnectina superpuestos en la miostatina. En un formato, la Adnectina n.º 1 se recubre sobre una placa, que después se bloquea y se lava. A esta placa se le añade miostatina sola o miostatina preincubada con una concentración saturada de Adnectina n.º 2. Después de un período de incubación adecuado, la placa se lava y se sonda con un anticuerpo policlonal antimiostatina, al como un anticuerpo policlonal biotinilado de cabra antimiostatina (R&D Systems), seguido de la detección con conjugado de estreptavidina-HRP y procedimientos convencionales de desarrollo de tetrametilbencidina. Si la señal de DO es la misma con o sin preincubación con Adnectina n.º 2, entonces las dos Adnectinas se unen independientemente una de otra y sus sitios de unión de Adnectina no se superponen. Si, sin embargo, la señal de DO para los pocillos que recibieron miostatina sola, entonces se confirma que la unión de Adnectina n.º 2 bloquea la unión de Adnectina n.º 1 a miostatina.

25 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 la superficie de un chip SPR, seguido de inyecciones de miostatina sola o miostatina preincubada con una concentración de saturación de Adnectina n.º 2. Si la señal de unión para las mezclas de miostatina/Adnectina n.º 2 es igual o mayor que la de la miostatina sola, entonces las dos Adnectinas se unen independientemente una de otra y sus sitios de unión de Adnectina no se superponen. Si, sin embargo, la señal de unión para las mezclas de miostatina/Adnectina n.º 2 es menor que la señal de unión para la miostatina sola, entonces se confirma que la unión de Adnectina n.º 2 bloquea la unión de Adnectina n.º 2 a miostatina.

30 Una característica de estos experimentos es el uso de concentraciones saturadas de Adnectina n.º 2. Si la miostatina no está saturada con Adnectina n.º 2, entonces las conclusiones anteriores no se sostienen. Pueden usarse experimentos similares para determinar si dos proteínas de unión a miostatina se unen a sitios de unión de Adnectina superpuestos.

35 Ambos ensayos ejemplificados anteriormente también pueden realizarse en orden inverso donde se inmoviliza Adnectina n.º 2 y se añade miostatina-Adnectina n.º 1 a la placa. Como alternativa, la Adnectina n.º 1 y/o n.º 2 puede sustituirse por un anticuerpo monoclonal y/o una proteína de fusión receptor-Fc soluble.

40 La competición también puede determinarse mediante un ensayo sándwich HTRF, como se describe en el Ejemplo 4.

40 La Adnectina competitiva puede ser una Adnectina que se une al mismo sitio de unión de Adnectina en la miostatina que una Adnectina antimiostatina particular descrita en el presente documento. Las técnicas de mapeado convencionales, tales como mapeado de proteasas, análisis mutacional, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional, pueden usarse para determinar si una Adnectina se une al mismo sitio de unión de Adnectina que una Adnectina de referencia (véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

50 Las Adnectinas antimiostatina candidatas que compiten pueden inhibir la unión de las Adnectinas antimiostatina de la invención a la miostatina en al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %. El % de competición puede determinarse usando los métodos descritos anteriormente.

55 Las moléculas que compiten con las Adnectinas antimiostatina de la invención no necesitan ser una Adnectina, sino que pueden ser cualquier tipo de molécula que se una a la miostatina, tales como, pero no limitado a, un anticuerpo, una molécula pequeña, un péptido y similares.

60 Las Adnectinas de la invención se unen a un sitio de unión discontinuo de Adnectina en la miostatina. Los polipéptidos de la invención se unen dentro de dos regiones, aminoácidos 85-101 y 55-66, de la miostatina (SEQ ID NO: 3).

60 Los polipéptidos de la invención no compiten por la unión a la miostatina con ActRIIB. Los polipéptidos de la invención compiten por la unión a miostatina con ALK4 y/o ALK5.

**II. Secuencias de extensión**

65 En determinadas realizaciones, las moléculas de Adnectina antimiostatina pueden modificarse para comprender una

- secuencia de extensión N-terminal y/o una extensión C-terminal. Por ejemplo, puede colocarse una secuencia MG en el extremo N del <sup>10</sup>Fn3 definida por SEQ ID NO: 4. La M normalmente se escindirá, dejando una G en el extremo N. Las moléculas de Adnectina antimiotstatina de acuerdo con la invención comprenden una G en el extremo N (SEQ ID NO: 281). Como alternativa, los primeros 10 aminoácidos de las Adnectinas antimiotstatina mostradas en la Tabla 2
- 5 pueden reemplazarse por una secuencia N-terminal alternativa, denominadas en el presente documento extensiones N-terminales, como se muestra en la Tabla 7. Además, una M, G o MG también pueden colocarse en el N-terminal de cualquiera de las extensiones del N-terminal que se muestran en la Tabla 7. Las Adnectinas antimiotstatina descritas en el presente documento también pueden comprender secuencias de cola C-terminal alternativas, denominadas en el presente documento secuencias de extensión C-terminal. Por ejemplo, las secuencias de Adnectina antimiotstatina
- 10 mostradas en la Tabla 2 pueden truncarse en la treonina correspondiente a T94 de SEQ ID NO: 4 (es decir, truncarse después de la porción INYRT (SEQ ID NO: 168) de la secuencia). Dicha versión truncada puede usarse como moléculas terapéuticas en la forma truncada o pueden añadirse extensiones C-terminales alternativas después del resto de treonina. En la Tabla 7 se muestran secuencias de extensión C-terminal ilustrativas. Las Adnectinas antimiotstatina ilustrativas que comprenden secuencias de extensión C-terminal se muestran en la Tabla 2 como SEQ
- 15 ID NO: 80-123. Por ejemplo, SEQ ID NO: 80 (clón 1979\_B06) comprende la extensión C-terminal natural EIDKPSQ (SEQ ID NO: 211) seguida de una etiqueta His6 (SEQ ID NO: 328). Sin embargo, debe entenderse que la etiqueta His6 es completamente opcional.
- En determinadas realizaciones, las secuencias de extensión C-terminal (también llamadas "colas"), comprenden
- 20 restos E y D, y pueden tener una longitud de entre 8 y 50, 10 y 30, 10 y 20, 5 y 10 y 2 y 4 aminoácidos. En algunas realizaciones, las secuencias de cola incluyen enlazadores basados en ED en los cuales la secuencia comprende repeticiones en tandem de ED. En realizaciones ilustrativas, la secuencia de la cola comprende 2-10, 2-7, 2-5, 3-10,
- 25 3-7, 3-5, 3, 4 o 5 repeticiones de ED. En determinadas realizaciones, las secuencias de la cola basadas en ED también pueden incluir restos de aminoácidos adicionales, tales como, por ejemplo: EI, EID, ES, EC, EGS y EGC. Tales secuencias se basan, en parte, en secuencias conocidas de la cola de Adnectina, tales como EIDKPSQ (SEQ ID NO: 211), en 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 DE. Las moléculas de Adnectina antimiotstatina de acuerdo con la invención comprenden restos EI en el extremo C (SEQ ID NO: 281).
- 30 En otras realizaciones, las secuencias N- o C-terminales pueden combinarse con secuencias enlazadoras conocidas (por ejemplo, SEQ ID NO: 181-227 en la Tabla 4) según sea necesario al diseñar una molécula de fusión de Adnectina antimiotstatina. En algunas realizaciones, las secuencias pueden colocarse en el extremo C del dominio <sup>10</sup>Fn3 para facilitar la unión de un resto farmacocinético. Por ejemplo, puede añadirse un enlazador que contiene cisteína tal como GSGC (SEQ ID NO: 189) al extremo C para facilitar la PEGilación dirigida al sitio sobre el resto de cisteína. Las
- 35 Adnectinas antimiotstatina ilustrativas que comprenden un enlazador que contiene cisteína se muestran en la Tabla 5 como SEQ ID NO: 228-239.

### III. Restos farmacocinéticos

- 40 En un aspecto, la solicitud proporciona Adnectinas antimiotstatina que comprenden además un resto farmacocinético (PK). La farmacocinética mejorada puede evaluarse de acuerdo con la necesidad terapéutica percibida. A menudo es deseable aumentar la biodisponibilidad y/o aumentar el tiempo entre dosis, posiblemente aumentando el tiempo que una proteína permanece disponible en el suero después de la dosificación. En algunos casos, es deseable mejorar la continuidad de la concentración sérica de la proteína a lo largo del tiempo (por ejemplo, disminuir la diferencia en la concentración sérica de la proteína poco después de la administración y poco antes de la siguiente administración).
- 45 La Adnectina antimiotstatina puede estar unida a un resto que reduce la tasa de eliminación del polipéptido en un mamífero (por ejemplo, ratón, rata o humano) en más del doble, más de tres veces, más de cuatro veces o más de cinco veces con respecto a la Adnectina antimiotstatina no modificada. Otras medidas de farmacocinética mejorada pueden incluir la semivida en suero, que a menudo se divide en una fase alfa y una fase beta. Cualquiera o ambas fases pueden mejorarse significativamente mediante la adición de un resto apropiado. Por ejemplo, la fracción PK
- 50 puede aumentar la semivida en suero del polipéptido en más del 5, el 10, el 20, el 30, el 40, el 50, el 60, el 70, el 80, el 90, el 100, el 120, el 150, el 200, el 400, el 600, el 800, el 1000 % o más con respecto al dominio Fn3 solo.
- 55 Los restos que retardan la eliminación de una proteína de la sangre, denominados en el presente documento "restos PK", incluyen restos de polioxialquieno (por ejemplo, polietilenglicol), azúcares (por ejemplo, ácido siálico) y restos proteicos bien tolerados (por ejemplo, Fc y fragmentos y variantes del mismo, transferrina o seroalbúmina). La Adnectina antimiotstatina también puede fusionarse con albúmina o un fragmento (porción) o variante de albúmina como se describe en la Publicación de EE.UU. N.º 2007/0048282, o puede fusionarse con una o más Adnectina que se une a seroalbúmina, como se describe en el presente documento.
- 60 Otros restos PK que pueden usarse en la invención incluyen aquellos descritos en Kontermann *et al.*, (Current Opinion in Biotechnology 2011;22:868-76). Tales restos PK incluyen, pero no se limitan a, fusiones de seroalbúmina humana, conjugados de seroalbúmina humana, quelantes de seroalbúmina humana (por ejemplo, Adnectina PKE, AlbulAb, ABD), fusiones XTEN, fusiones PAS (es decir, miméticos de PEG recombinantes basados en los tres aminoácidos prolina, alanina y serina), conjugados de carbohidratos (por ejemplo, hidroxietilalmidón (HES)), glucosilación, conjugados de ácido polisiálico y conjugados de ácidos grasos.

En consecuencia, en algunas realizaciones, la invención proporciona una Adnectina antimiotestatina fusionada a un resto PK que es un azúcar polimérico. En algunas realizaciones, el resto PK es un resto de polietilenglicol o una región Fc. En algunas realizaciones el resto PK es una proteína de unión a seroalbúmina tales como aquellas descritas en las publicaciones de EE.UU. N.º 2007/0178082 y 2007/0269422. En algunas realizaciones, el resto PK es seroalbúmina humana. En algunas realizaciones, la fracción PK es transferrina.

*Polietilenglicol*

10 En algunas realizaciones, la Adnectina antimiotestatina comprende polietilenglicol (PEG). PEG es un polímero hidrosoluble bien conocido que está disponible en el mercado o puede prepararse por polimerización de apertura de anillo de etilenglicol de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica (Sandler y Karo, *Polymer Synthesis*, Academic Press, Nueva York, Vol. 3, páginas 138-161). El término "PEG" se usa ampliamente para incluir cualquier molécula de polietilenglicol, independientemente del tamaño o la modificación en un extremo del PEG y puede representarse por la fórmula: X-O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n-1</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, donde n es de 20 a 2300 y X es H o una modificación terminal, por ejemplo, un alquilo C<sub>1-4</sub>. El PEG puede contener grupos químicos adicionales que son necesarios para las reacciones de unión, que resultan de la síntesis química de la molécula; o que actúan como espaciador para una distancia óptima de partes de la molécula. Además, dicho PEG puede consistir en una o más cadenas laterales de PEG que están enlazadas entre sí. Los PEG con más de una cadena de PEG se denominan PEG multibrazo o ramificados. Los PEG ramificados se describen en, por ejemplo, la Solicitud publicada europea N.º 473084A y la Pat. de EE.UU. N.º 5.932.462.

25 Una o más moléculas de PEG pueden estar unidas en diferentes posiciones de la proteína y dicha unión puede lograrse mediante reacción con aminas, tioles u otros grupos reactivos adecuados. El resto amina puede ser, por ejemplo, una amina primaria encontrada en el extremo N de un polipéptido o un grupo amina presente en un aminoácido, tales como lisina o arginina. En algunas realizaciones, el resto PEG está unido en una posición del polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: a) el extremo N; b) entre el extremo N y la cadena beta o cadena similar a beta más N-terminal; c) un bucle colocado en una cara del polipéptido opuesta al sitio de unión a la diana; d) entre el extremo C y la cadena beta o cadena similar a beta más C-terminal; y e) en el extremo C.

30 30 La PEGilación puede lograrse mediante PEGilación dirigida al sitio, en donde se introduce un grupo reactivo adecuado en la proteína para crear un sitio donde se produce preferentemente la PEGilación. En algunas realizaciones, la proteína se modifica para introducir un resto de cisteína en una posición deseada, permitiendo la PEGilación dirigida al sitio en la cisteína. Pueden introducirse mutaciones en una secuencia codificante de proteínas para generar restos de cisteína. Esto podría lograrse, por ejemplo, mutando uno o más restos de aminoácidos a cisteína. Los aminoácidos preferidos para mutar a un resto de cisteína incluyen serina, treonina, alanina y otros restos hidrófilos. Preferentemente, el resto que se va a mutar a cisteína es un resto expuesto en la superficie. Los algoritmos son bien conocidos en la técnica para predecir la accesibilidad a la superficie de restos basándose en una secuencia primaria o una proteína. Como alternativa, los restos de superficie pueden predecirse comparando las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de unión, dado que la estructura cristalina del marco, basándose en qué polipéptidos de unión se diseñan y evolucionan, se ha resuelto (véase Himanen *et al.*, *Nature* 2001;414:933-8) y, por lo tanto, los restos expuestos en la superficie se han identificado. La PEGilación de restos de cisteína puede llevarse a cabo usando, por ejemplo, PEG-maleimida, PEG-vinilsulfona, PEG-yodoacetamida o disulfuro de PEG-ortopiridilo.

45 45 El PEG normalmente se activa con un grupo activador apropiado para acoplarse a un sitio deseado en el polipéptido. Los métodos de PEGilación son bien conocidos en la técnica y se describen con más detalle en Zalipsky, S., *et al.*, "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" en *Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J. M. Harris, Plenus Press, Nueva York (1992) y en Zalipsky (1995) *Advanced Drug Reviews* 16: 157-182.

50 50 El PEG puede variar ampliamente en peso molecular y puede ser ramificado o lineal. Normalmente, el peso molecular promedio en peso de PEG es de aproximadamente 100 Dalton a aproximadamente 150.000 Dalton. Los pesos moleculares promedio en peso ilustrativos para PEG incluyen aproximadamente 20.000 Dalton, aproximadamente 40.000 Dalton, aproximadamente 60.000 Dalton y aproximadamente 80.000 Dalton. En determinadas realizaciones, el peso molecular del PEG es 40.000 Dalton. También pueden usarse versiones ramificadas de PEG que tienen un peso molecular total de cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, el PEG tiene dos ramas. En otras realizaciones, el PEG tiene cuatro ramas. En otra realización, el PEG es un bis-PEG (NOF Corporation, DE-200MA), en el cual se conjugan dos Adnectinas (véase, por ejemplo, Ejemplo 1 y ATI-1341 de la Tabla 5).

60 60 Pueden usarse técnicas de separación y purificación convencionales conocidas en la técnica para purificar Adnectinas antimiotestatina PEGiladas, tales como exclusión por tamaño (por ejemplo, filtración en gel) y cromatografía de intercambio iónico. Los productos también pueden separarse mediante SDS-PAGE. Los productos que pueden separarse incluyen Adnectinas mono-, di-, tri-, poli- y no PEGiladas, así como PEG libre. El porcentaje de conjugados mono-PEG puede controlarse agrupando fracciones más amplias alrededor del pico de elución para aumentar el porcentaje de mono-PEG en la composición. Aproximadamente el 90 % de los conjugados mono-PEG representan un buen equilibrio entre rendimiento y actividad.

En algunas realizaciones, las Adnectinas antimiostatina pegiladas retendrán preferentemente al menos aproximadamente un 25 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 % de la actividad biológica asociada a la Adnectina antimiostatina no modificada. En algunas realizaciones, la actividad biológica se refiere a su capacidad para unirse a la miostatina, según lo evaluado por  $K_D$ ,  $K_{on}$  o  $K_{off}$ . En algunas realizaciones, la Adnectina antimiostatina PEGilada muestra un aumento en la unión a la miostatina en relación con la Adnectina antimiostatina no PEGilada.

En la Tabla 5 se muestran ejemplos de Adnectinas antimiostatina modificadas con PEG.

#### 10 ***Dominio Fc de inmunoglobulina (y fragmentos)***

En algunas realizaciones, la Adnectina antimiostatina está fusionada a un dominio Fc de inmunoglobulina, o un fragmento o variante del mismo. Como se usa en el presente documento, una "región Fc funcional" es un dominio Fc o fragmento del mismo que conserva la capacidad de unirse a FcRn. En algunas realizaciones, una región Fc funcional se une a FcRn, pero no posee función efectora. La capacidad de la región Fc o fragmento de la misma para unirse a FcRn puede determinarse mediante ensayos de unión convencionales conocidos en la técnica. En otras realizaciones, la región Fc o fragmento de la misma se une a FcRn y posee al menos una "función efectora" de una región Fc nativa. Las "funciones efectoras" ilustrativas incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por defecto de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B; BCR), etc. Tales funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, una Adnectina antimiostatina) y pueden evaluarse usando diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar dichas funciones efectoras de anticuerpos.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de aquella de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido original, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido original. La región Fc variante en el presente documento preferentemente poseerá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido original, y más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con la misma, más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con la misma.

En una realización ilustrativa, el dominio Fc deriva de una subclase IgG1, sin embargo, otras subclases (por ejemplo, IgG2, IgG3 e IgG4) también pueden usarse. A continuación se muestra la secuencia de un dominio Fc de inmunoglobulina IgG1 humana:

**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY**  
**VDGVEVHN~~AK~~TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE**  
**KTISKAKGQP~~REPQ~~VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN**  
**YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**  
**K (SEQ ID NO: 169)**

La secuencia de bisagra central está subrayada y las regiones CH2 y CH3 están en texto normal. Debe entenderse que la lisina C-terminal es opcional.

La fusión puede formarse uniendo una Adnectina antimiostatina a cualquiera de los extremos de la molécula de Fc, es decir, disposiciones Adnectina Fc-anti-miostatina o Adnectina anti-miostatina-Fc. En determinadas realizaciones, el Fc y la Adnectina antimiostatina se fusionan mediante un enlazador. Las secuencias enlazadoras ilustrativas incluyen GAGGGGSG (SEQ ID NO: 181), EPKSSD (SEQ ID NO: 182), D, ESPKAQASSVPTAQPAEGLA (SEQ ID NO: 183), ELQLEESAAEAQDGELD (SEQ ID NO: 184), QGPDEPGGS (SEQ ID NO: 185), GGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 186), ELQLEESAAEAQEGELE (SEQ ID NO: 187), GSGSG (SEQ ID NO: 188), GSGC (SEQ ID NO: 189), AGGGGSG (SEQ ID NO: 190), GSGS (SEQ ID NO: 191), QPDEPGGS (SEQ ID NO: 192), GSGSGS (SEQ ID NO: 193), TVAAPS (SEQ ID NO: 194), KAGGGGSG (SEQ ID NO: 195), KGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 196), KQPDEPGGS (SEQ ID NO: 197), KELQLEESAAEAQDGELD (SEQ ID NO: 198), KTVAAPS (SEQ ID NO: 199), KAGGGGSGG (SEQ ID NO: 200), KGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 201), KQPDEPGGSG (SEQ ID NO: 202), KELQLEESAAEAQDGELDG (SEQ ID NO: 203), KTVAAPSG (SEQ ID NO: 204) AGGGGSGG (SEQ ID NO: 205), AGGGGSG (SEQ ID NO: 206), GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 207), QPDEPGGSG (SEQ ID NO: 208) y TVAAPSG

(SEQ ID NO: 209).

En algunas realizaciones, la región Fc usada en la fusión de Adnectina antimiostatina comprende la región bisagra de una molécula de Fc. Como se usa en el presente documento, la región "bisagra" comprende los restos de bisagra central que abarcan las posiciones 1-16 de SEQ ID NO: 169 (DKTHTCPPCPAPELLG; SEQ ID NO: 170) de la región Fc de IgG1. En determinadas realizaciones, la fusión antimiostatina Adnectina-Fc adopta una estructura multimérica (por ejemplo, dímero) debido, en parte, a los restos de cisteína en las posiciones 6 y 9 de SEQ ID NO: 169 dentro de la región bisagra. En otras realizaciones, la región de bisagra como se usa en el presente documento, puede incluir además restos derivados de las regiones CH1 y CH2 que flanquean la secuencia bisagra central, como se muestra en SEQ ID NO: 169. En aún otras realizaciones, la secuencia bisagra es GSTHTCPPCPAPELLG (es decir, secuencia bisagra para PRD-932; SEQ ID NO: 180).

En algunas realizaciones, la secuencia bisagra, puede incluir sustituciones que confieren propiedades farmacocinéticas, biofísicas y/o biológicas deseables. Algunas secuencias de bisagra ilustrativas incluyen

EPKSSDKHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO: 171; región bisagra central subrayada), EPKSSDKHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 172; región bisagra central subrayada), EPKSSGSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 173; región bisagra central subrayada), DKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO: 174; región bisagra central subrayada) y DKHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 175; región bisagra central subrayada). En una realización, el resto P en la posición 18 de SEQ ID NO: 169 se ha reemplazado por S para eliminar la función efectora de Fc; este reemplazo se ejemplifica en bisagras que tienen una cualquiera de las SEQ ID NO: 172, 173 y 175. En otra realización, los restos DK en las posiciones 1-2 de SEQ ID NO: 169 se han reemplazado por GS para eliminar un posible sitio de clip; este reemplazo se ejemplifica en SEQ ID NO: 173. En otra realización, la C en la posición 103 de SEQ ID NO: 176, que corresponde a la región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana (es decir, dominios CH1-CH3), se ha reemplazado por S para evitar la formación inadecuada de enlaces de cisteína en ausencia de una cadena ligera; este reemplazo se ejemplifica en SEQ ID NO: 171-173.

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS  
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 176)

En determinadas realizaciones, una fusión Adnectina antimiostatina-Fc puede tener las siguientes configuraciones: 1) Adnectina antimiostatina-bisagra-Fc o 2) bisagra-Fc-Adnectina antimiostatina. Por tanto, cualquier Adnectina antimiostatina de la presente invención puede fusionarse a una región Fc que comprende una secuencia bisagra según estas configuraciones. En algunas realizaciones, puede usarse un enlazador para unir la Adnectina antimiostatina al resto bisagra-Fc, por ejemplo, una proteína de fusión ilustrativa puede tener la configuración Adnectina anti-miostatina-enlazador-bisagra-Fc o bisagra-Fc-enlazador-Adnectina anti-miostatina. Adicionalmente, dependiendo del sistema en el que se produce el polipéptido de fusión, puede colocarse una secuencia líder en el extremo N del polipéptido de fusión. Por ejemplo, si la fusión se produce en un sistema mamífero, puede añadirse una secuencia líder tal como

METDTLLLWVLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 177) al extremo N de la molécula de fusión. Si la fusión se produce en *E. coli*, la secuencia de fusión irá precedida por una metionina.

La siguiente secuencia ejemplifica una construcción Adnectina antimiostatina-bisagra-Fc (ejemplo de referencia):

**GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTLPHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATI**  
SGLKPGVDYTITVYAVTVTTKVIHYKPISINYRTEIEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF  
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT**KPREEQYN**  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT  
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (PRD-1171; SEQ ID NO: 253).

La secuencia líder está en negrita, la secuencia de Adnectina antimiostatina está en cursiva y la región bisagra está subrayada. Debe entenderse que la lisina C-terminal es opcional.

Aquí, el dominio Fc comprende las regiones CH2 y CH3 de IgG1 humana de la siguiente manera:

VFLPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
NYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 178) y la  
secuencia bisagra DKHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 170).

5 La siguiente secuencia ejemplifica una construcción de Fc-Adnectina antimiotiostatina de acuerdo con la invención:  
DKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY

10 VDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIE  
KTISKAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLT  
VDKSRWQQGNVFCSVHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 179) y la  
secuencia bisagra DKHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 170). La región bisagra está subrayada, la secuencia líder está en negrita y la secuencia de  
15 Adnectina antimiotiostatina está en cursiva.

15 Aquí, el dominio Fc comprende las regiones CH2 y CH3 de IgG1 humana de la siguiente manera:

VFLPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
20 NYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 179) y la  
secuencia bisagra DKHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 170).

25 En la Tabla 6 se muestran ejemplos de fusiones de Adnectina antimiotiostatina-Fc y fusiones de Fc-Adnectina  
antimiostatina (SEQ ID NO: 252-273). Las fusiones ilustrativas de Adnectina antimiotiostatina-Fc y fusiones Fc-Adnectina  
antimiostatina de la invención se exponen en SEQ ID NO: 264, 269 y 273. Todas las secuencias pueden comenzar  
con una metionina o una secuencia líder de mamífero (por ejemplo, SEQ ID NO: 177).

### **Adnectinas**

30 En algunas realizaciones el resto PK es otra Adnectina específica, por ejemplo, a una proteína sérica (por ejemplo, seroalbúmina humana), como se describe en el documento US 2012/0094909. Otros restos PK que pueden usarse con las Adnectinas de la invención se describen en Kontermann *et al.* (Current Opinion in Biotechnology 2011;22:868-76) como se analizó anteriormente. A modo de ejemplo, dichos restos PK basados en Adnectina pueden unirse directa o indirectamente a una Adnectina antimiotiostatina a través de un enlazador polipeptídico. Los enlazadores adecuados para unir dominios Fn3 son aquellos que permiten que los dominios separados se plieguen independientemente entre sí y formen una estructura tridimensional que permite una unión de alta afinidad a una molécula diana. Los enlazadores polipeptídicos ilustrativos incluyen PSTSTST (SEQ ID NO: 210), EIDKPSQ (SEQ ID NO: 211) y enlazadores GS, tales como GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 213) y multímeros de los mismos. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador basado en glicina-serina. Estos enlazadores comprenden restos de glicina y serina y pueden tener una longitud de entre 8 y 50, 10 y 30 y 10 y 20 aminoácidos. Los ejemplos incluyen enlazadores que tienen una secuencia de aminoácidos (GS)<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 215), G(GS)<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 216) y G(GS)<sub>7</sub>G (SEQ ID NO: 217). Otros enlazadores contienen ácido glutámico e incluyen, por ejemplo, (GSE)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 218) y GGSEGGSE (SEQ ID NO: 219). Otros enlazadores de glicina-serina ilustrativos incluyen (GS)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 212), (GGGGS)<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 220), (GGGGS)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 221) y (GGGGS)<sub>3</sub>G (SEQ ID NO: 222). En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador basado en glicina-prolina. Estos enlazadores comprenden restos de glicina y prolina y pueden tener una longitud de entre 3 y 30, 10 y 30 y 3 y 20 aminoácidos. Los ejemplos incluyen enlazadores que tienen una secuencia de aminoácidos (GP)<sub>3</sub>G (SEQ ID NO: 223), (GP)<sub>5</sub>G (SEQ ID NO: 224) y GPG. En otras 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. Los ejemplos de enlazadores basados en prolina alanina incluyen, por ejemplo, (PA)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 225), (PA)<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 226) y (PA)<sub>9</sub> (SEQ ID NO: 227). La longitud óptima del enlazador y la composición de aminoácidos pueden determinarse mediante experimentación rutinaria en vista de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. En algunas realizaciones, una Adnectina antimiotiostatina está enlazada, por ejemplo, a una Adnectina anti-HSA a través de un enlazador polipeptídico que tiene un sitio de proteasa que es escindible mediante una proteasa en la sangre o tejido diana. Tales realizaciones pueden usarse para liberar una Adnectina antimiotiostatina para una mejor administración o propiedades terapéuticas o una producción más eficiente.

55 Los enlazadores o espaciadores adicionales, pueden introducirse en el extremo N o C de un dominio Fn3 entre el dominio Fn3 y el enlazador polipeptídico.

60 En algunas realizaciones, una Adnectina antimiotiostatina puede estar unida directa o indirectamente, por ejemplo, a una Adnectina anti-HSA a través de un enlazador polimérico. Pueden usarse 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 proteicos cuando se une a una proteína de interés, 2) mayor estabilidad o solubilidad de la proteína, 3) disminución de la agregación de proteínas y 4) mayor avidez o afinidad general de la proteína.

En algunas realizaciones, una Adnectina antimiostatina está enlazada, por ejemplo, a una Adnectina anti-HSA, 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. Tales realizaciones pueden usarse para liberar una Adnectina antimiostatina para una mejor administración o propiedades terapéuticas o una producción más eficiente.

5

En la Tabla 3 se presenta un resumen de las monoAdnectinas y sus correspondientes formas modificadas del resto PK (por ejemplo, fusiones PEGiladas y Fc).

10

Tabla 3

<b>MonoAdnectina<sup>a</sup></b>	<b>Mutante de cisteína [modificación]<sup>b</sup></b>	<b>X-enlazador-Fc<sup>c</sup></b>	<b>Fc-enlazador-X<sup>d</sup></b>
1979_B06 (SEQ ID NO: 80)	ATI-1107 (SEQ ID NO: 229) [40k 2-br]		
2062_G02 (SEQ ID NO: 81)	ATI-1106 (SEQ ID NO: 228) [40k 2-br]		
2522_C09 (SEQ ID NO: 82)			
2523_G06 (SEQ ID NO: 83)			
2524_C11 (SEQ ID NO: 84)			
2524_D09 (SEQ ID NO: 85)	ATI-1275 (SEQ ID NO: 231) [NEM]; ATI-1276 (SEQ ID NO: 231) [40k 2-br]		
2524_E10 (SEQ ID NO: 86)			
2524_H05 (SEQ ID NO: 87)			
2524_H11 (SEQ ID NO: 88)			
2525_B01 (SEQ ID NO: 89)			
2525_D02 (SEQ ID NO: 90)	ATI-1267 (SEQ ID NO: 230) [NEM]; ATI-1266 (SEQ ID NO: 230) [40k 2-br]		
2525_D05 (SEQ ID NO: 91)	ATI-1277 (SEQ ID NO: 232) [NEM]; ATI-1278 (SEQ ID NO: 232) [40k 2-br]		PRD-932 [L1] (SEQ ID NO: 252)
2525_F07 (SEQ ID NO: 92)			
2987_A06 (SEQ ID NO: 93)			
2987_B04 (SEQ ID NO: 94)			
2987_B09 (SEQ ID NO: 95)			
2987_C02 (SEQ ID NO: 96)			
2987_D05 (SEQ ID NO: 97)			
2987_E03 (SEQ ID NO: 98)			
2987_E08 (SEQ ID NO: 99)			
2987_F01 (SEQ ID NO: 100)			
2987_F06 (SEQ ID NO: 101)			
2987_G04 (SEQ ID NO: 102)			

(continuación)

<b>MonoAdnectina<sup>a</sup></b>	<b>Mutante de cisteína [modificación]<sup>b</sup></b>	<b>X-enlazador-Fc<sup>c</sup></b>	<b>Fc-enlazador-X<sup>d</sup></b>
2987_G09 (SEQ ID NO: 103)			
2987_H02 (SEQ ID NO: 104)			
2987_H07 (SEQ ID NO: 105)	ATI-1310 (SEQ ID NO: 233) [ninguno]; ATI-1340 (SEQ ID NO: 233) [NEM]; ATI-1338 (SEQ ID NO: 233) [40k 2-br]; ATI-1359 (SEQ ID NO: 233) [sin His, 40k 2-br]; ATI-1339 (SEQ ID NO: 233) [40k 4-br]; ATI-1341 (SEQ ID NO: 233) [20k bis-PEG]	PRD-1171[L2] (SEQ ID NO: 253); PRD-1173[L3] (SEQ ID NO: 254); PRD-1174[L4] (SEQ ID NO: 255)	PRD-1175[L1] (SEQ ID NO: 256); PRD-1177[L5] (SEQ ID NO: 257); PRD-1178[L6] (SEQ ID NO: 258); PRD-1180[L7] (SEQ ID NO: 259); PRD-1471[L8] (SEQ ID NO: 270)
3006_A10 (SEQ ID NO: 106)			
3007_B08 (SEQ ID NO: 107)			
3007_C09 (SEQ ID NO: 108)			
3007_C10 (SEQ ID NO: 109)			
3008_A03 (SEQ ID NO: 110)			
3008_B08 (SEQ ID NO: 111)			
3008_D04 (SEQ ID NO: 112)			
3008_F01 (SEQ ID NO: 113)			
3008_G01 (SEQ ID NO: 114)			
3008_G03 (SEQ ID NO: 115)			
3115_D04 (SEQ ID NO: 116)	ATI-1375 (SEQ ID NO: 235) [40k 2-br]	PRD-1301[L2] (SEQ ID NO: 265)	PRD-1284[L5] (SEQ ID NO: 260)
3115_E06 (SEQ ID NO: 117)	ATI-1376 (SEQ ID NO: 236) [40k 2-br]	PRD-1302[L2] (SEQ ID NO: 266)	PRD-1285[L5] (SEQ ID NO: 261); PRD-1472[L8] (SEQ ID NO: 271)
3116_A06 (SEQ ID NO: 118)	ATI-1379 (SEQ ID NO: 239) [40k 2-br]; ATI-1523 (SEQ ID NO: 239) [NEM]	PRD-1305 [L2] (SEQ ID NO: 269)	PRD-1288[L5] (SEQ ID NO: 264); PRD-1474[L8] (SEQ ID NO: 273)
3116_A07 (SEQ ID NO: 119)	ATI-1377 (SEQ ID NO: 237) [40k 2-br]	PRD-1303 [L2] (SEQ ID NO: 267)	PRD-1286[L5] (SEQ ID NO: 262); PRD-1473 [L8] (SEQ ID NO: 272)
3116_C01 (SEQ ID NO: 120)			
3116_C06 (SEQ ID NO: 121)			
3116_H06 (SEQ ID NO: 122)			
3146_A08 (SEQ ID NO: 123)	ATI-1378 (SEQ ID NO: 238) [40k 2-br]	PRD-1304[L2] (SEQ ID NO: 268)	PRD-1287[L5] (SEQ ID NO: 263)

(continuación)

MonoAdnectina <sup>a</sup>	Mutante de cisteína [modificación] <sup>b</sup>	X-enlazador-Fc <sup>c</sup>	Fc-enlazador-X <sup>d</sup>
<sup>a</sup> Las monoAdnectinas no modificadas tienen una secuencia central de Adnectina precedida por una secuencia de extensión N-terminal (MGVSDVPRDL; SEQ ID NO: 306) y seguida de una cola C-terminal (EIDKPSQHHHHHH; SEQ ID NO: 325), como se muestra en la Tabla 2. La secuencia central de Adnectina corresponde a la secuencia de monoAdnectina que carece de las secuencias de extensión N-terminal y de cola C-terminal.			
<sup>b</sup> Las Adnectinas con mutantes de cisteína tienen la secuencia central de Adnectina de la monoAdnectina en la primera columna y están precedidas por una secuencia de extensión N-terminal (MGVSDVPRDL; SEQ ID NO: 306) y seguidas de una cola C-terminal (GSGC [Modificación] HHHHHH; SEQ ID NO: 326 o EGSGC[Modificación]HHHHHH; SEQ ID NO: 327), como se muestra en la Tabla 5.			
<sup>c</sup> Las Adnectinas con un resto Fc en el extremo C tienen la secuencia central de Adnectina de la monoAdnectina en la primera columna, que está precedida por una secuencia de extensión N-terminal (GVSDVPRDL; SEQ ID NO: 307) y seguida de una cola C-terminal (EI), que va seguida de una secuencia enlazadora (Tabla 4) y la secuencia de la región Fc, como se describe en la Tabla 6.			
<sup>d</sup> Las Adnectinas con un resto Fc en el extremo N tienen una secuencia de región Fc que está precedida por una secuencia bisagra N-terminal y seguida de un enlazador (Tabla 4) y la secuencia central de Adnectina de la monoAdnectina en la primera columna, que en sí misma está precedida por una secuencia de extensión N-terminal (GVSDVPRDL; SEQ ID NO: 307) y seguida de una cola C-terminal (EI), como se muestra en la Tabla 6.			

Las SEQ ID NO de enlazadores ilustrativos de la invención se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4

SEQ ID NO.	ENLAZADOR	SECUENCIA
181	L1	GAGGGGSG
182	L2	EPKSSD
---	L3	D
183	L4	ESPKAQASSVPTAQPQAEGLA
184	L5	ELQLEESAAEAQDGELD
185	L6	GQPDEPGGS
186	L7	GGSGSGSGSGSGS
187	L8	ELQLEESAAEAQEGELE
<b>ENLAZADORES ILUSTRATIVOS ADICIONALES</b>		
188	L9	GSGSG
189	L10	GSGC
190	L11	AGGGGSG
191	L12	GSGS
192	L13	QPDEPGGS
193	L14	GSGSGS
194	L15	TVAAPS
195	L16	KAGGGGSG
196	L17	KGSGSGSGSGSGS
197	L18	KQPDEPGGS
198	L19	KELQLEESAAEAQDGELD
199	L20	KTVAAAPS
200	L21	KAGGGGSGG
201	L22	KGSGSGSGSGSGSG
202	L23	KQPDEPGGSG
203	L24	KELQLEESAAEAQDGELDG
204	L25	KTVAAAPSG
205	L26	AGGGGSGG
206	L27	AGGGGSG
207	L28	GSGSGSGSGSGSG
208	L29	QPDEPGGSG
209	L30	TVAAPSG
210	L31	PSTSTST
211	L32	EIDKPSQ
212	L33	GSGSGSGS

(continuación)

<b>ENLAZADORES ILUSTRATIVOS ADICIONALES</b>		
213	L34	GSGSGSGSGS
214	L35	GSGSGSGSGSGS
215	L36	GSGSGSGSGSGSGS
216	L37	GGSGSGSGSGSGS
217	L38	GGSGSGSGSGSGSG
218	L39	GSEGSEGSEGSE
219	L40	GGSEGGSE
220	L41	GGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGS
221	L42	GGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGS
222	L43	GGGGSGGGGSGGGGSG
223	L44	GPGPGPG
224	L45	GPGPGPGPGPG
---	L46	GPG
225	L47	PAPAPA
226	L48	PAPAPAPAPAPAPA
227	L49	PAPAPAPAPAPAPAPAPA

Las SEQ ID NO de Adnectinas antimiotatina PEGiladas ilustrativas descritas en el presente documento se presentan en la Tabla 5.

**Tabla 5**  
Adnectinas antimiotiastina PEGiladas

Adnectinas antimiotiastina PEGiladas		
Clón	Secuencia de aminoácidos	Secuencia
		Secuencia de ácido nítrico
ATI-1106 [40K PEG de 2 ramas]	MGVSDVPRDLEVAATPTSSLIS WVSPRGRARYYRITYGETGGNS PVQEFTVPGRGSTATISGLKPGV DYTITVYAVTIYRDGMSSHHDPISI NYRTGSGC [Modificación] HHHHH H (SEQ ID NO: 228)	ATGGGGAGTTCTGATGTGCCGGGGACCT GGAAGTGGTCTGGCTGCCACCCCCACAGCC TGCTGATTCAGCTGGTTCTCGGCTGGT CGTGCTCGATAATTACCGCATCACTACCG CGAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCAG GAGTTCACTGTGGCTGGTGGTTCTAC AGCTACCATCAGGGGCCCTAACCTGGCG TTGATTATACCATCAGCTGTATGGTGTCA CTATCTACCGTGACGGTATGTCATCAT GACCCATTTCATTAAATTACCGCACAGG TAGGGGGTTGCCACCATCACCACTCAC (SEQ ID NO: 240)
ATI-1107 [40K PEG de 2 ramas]	MGVSDVPRDLEVAATPTSSLIS WSLPHAGHVNYYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGVTAATISGLKPG VDYITVYAVTIKTSQMHHYMPI SINYRTGSGC [Modificación] HHHHH HH (SEQ ID NO: 229)	ATGGGGAGTTCTGATGTGCCGGGGACCT GGAAGTGGTCTGGCTGCCACCCCCACAGCC TGCTGATTCAGCTGGTCTCTGGCATGCT GGTCATGTGAACATATTACCGCATCACTTA CGGGGAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGGCTGGTGGTGT TACAGCTACCATCAGGGCCTAACACCTG GGCTTGATTATACCATCAGCTGTATGCT GTCACCTGACTAAATCTCAGATGATCCA TTACATGCCAATTTCATTAAATTACCGCAC AGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACTAC AC (SEQ ID NO: 241)

(continuación)

Adneclinas antimiotastina PEGiladas			
Ción	Secuencia de aminoácidos	Secuencia	Secuencia de ácido nítrico
ATI-1266 [40K PEG de 2 ramas] ATI-1267 [N-eliminada]	MGVSDVPRDLEVVAAITPSLLIS WTLPHAGRAHYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGVATISGLKPG VDYTTITVYAVTVTITTSVILYKPLS INYRTEGSGC [Modificación] HHHHH III (SEQ ID NO: 230)	ATGGGGAGTTCTGATGTTGCGCCGGGACCT GGAAGTGGTTGGACTTGGCCACCCCCACCCAGCC TGCTGATCAGCTGGACTTACCCCATCACTTA CGGGGAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGGGGGGTGT TACAGGCTACCATCAGCGGCCCTAAACCTG GGGTGATTACCATCAGCTGGGTATGCT GTCACCTGTGACGGACAACCTCGGTGATCCCT TACAAGCCAATTTCATTAATTACCGCA CAGAAGGGTAGGGTTGCCACCATCAC CATCAC (SEQ ID NO: 242)	
ATI-1275 [N-eliminada] ATI- 1276 [40K PEG de 2 ramas]	MGVSDVPRDLEVVAAITPSLLIS WYLPPYPAHMNYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGVATISGLKPG VDYTTITVYAVTILTSQLIHRPIS INYRTEGSGC [Modificación] HHHHH III (SEQ ID NO: 231)	ATGGGGAGTTCTGATGTTGCGCCGGGACCT GGAAGTGGTTGGACTTGGCCACCCCCACCCAGCC TGCTGATCAGCTGGTACCTCCCGTATCCT GGGCATATGAACTTACCCCATCACTTA CGGGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGGGGGGTGT GACAGCTACCATCAGGGCCTAAACCTG GGGTGATTACCATCAGCTGGGTATGCT GTCACCTGTGACAAAATCTCAGATTCTCCA TCATAGGGCCAATTTCATTAATTACCGCA CAGAAGGGTAGGGTTGCCACCATCAC CATCAC (SEQ ID NO: 243)	

(continuación)

## Annectinas antimiotastina PEGiladas

Secuencia			
Clon	Secuencia de aminoácidos	Secuencia	Secuencia de ácido nítrico
ATI-1277 [N-ethylmaleimida] ATI-1278 [40K PEG de 2 ramas]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSSLIS WSLPPYAGHLNYYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGVTAATISGLKPG VDYTHIVYAVILTKSQLIHYMPI SINYRTEGSGC [Modificación] HHH HHH (SEQ ID NO: 232)	ATGGGGAGTTCTGTGATGTCGGCGGACCT GGAAGTGGTGTGCTGCCACCCCCACAGGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTCCCTATGCTTG GTCATCTAACTATTACCGCATCACCTTAC GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC AGGAGTTCACCTGCGCTGGTCGTGGTGTG ACAGGCTACCATCAGGGGCCCTAAACCTGG CGTGTGATTTACCATCAGCTGGTATGCTGT CACTCTGACTAAGTCTCAGCTGATACATT ACATGCCAATTCCATTAAATTACGGCACA GAAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCCACCA TCAC (SEQ ID NO: 244)	ATGGGGAGTTCTGTGATGTCGGCGGACCT GGAAGTGGTGTGCTGCCACCCCCACAGGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTCCCTATGCTTG GGTCGTGGCACATTATTCGGTATTACCTAT GGTGAACCCGGTGGTAATAGTCCGGTTC GGAATTACCGGTCCGGTGGTGTGTTA CCGCAACCATAGGGCTCGAAACCCGGGT GTGATTACACCATACCGTTATGCGATT ACCGTACACCCACCAAGTGATTCATTAA TAAACCGAATTCCATTAAATTACCCGACAG AAGGTTAGCGGGTGGCCACCATCACCCACCA CAC (SEQ ID NO: 245)
ATI-1310 [Cys libre] ATI-1338 [40K PEG de 2 ramas] ATI-1339 [40K PEG de 4 ramas] ATI-1340 [N-ethylmaleimida] ATI-1341 [20K Bis-PEG]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSSLIS WILPHAGRAHYYYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGVTAATISGLKPG VDYTHIVYAVIVVTTIKVIIHYMPI SINYRTEGSGC [Modificación] HHH HHH (SEQ ID NO: 233)	ATGGGGAGTTCTGTGATGTCGGCGGACCT GGAAGTGGTGTGCTGCCACCCCCACAGGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTCCCTATGCTTG GGTCGTGGCACATTATTCGGTATTACCTAT GGTGAACCCGGTGGTAATAGTCCGGTTC GGAATTACCGGTCCGGTGGTGTGTTA CCGCAACCATAGGGCTCGAAACCCGGGT GTGATTACACCATACCGTTATGCGATT ACCGTACACCCACCAAGTGATTCATTAA TAAACCGAATTCCATTAAATTACCCGACAG AAGGTTAGCGGGTGGCCACCATCACCCACCA CAC (SEQ ID NO: 245)	ATGGGGAGTTCTGTGATGTCGGCGGACCT GGAAGTGGTGTGCTGCCACCCCCACAGGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTCCCTATGCTTG GGTCGTGGCACATTATTCGGTATTACCTAT GGTGAACCCGGTGGTAATAGTCCGGTTC GGAATTACCGGTCCGGTGGTGTGTTA CCGCAACCATAGGGCTCGAAACCCGGGT GTGATTACACCATACCGTTATGCGATT ACCGTACACCCACCAAGTGATTCATTAA TAAACCGAATTCCATTAAATTACCCGACAG AAGGTTAGCGGGTGGCCACCATCACCCACCA CAC (SEQ ID NO: 245)

(continuación)

Adenectinas antimicistámina PEGiladas			
Clón	Secuencia de aminoácidos	Secuencia	Secuencia de ácido nucleico
ATI-1359 [40K PEG de 2 ramas]	MGVSDVPRDLEVAATPTSLIIS WTLPHAGRHYYRITYGETGGN SPVQEFIVPGRGVTAHSGLKPG VDYTTIVYAVTIVTITKVIHYKPI SINYRTEGSGC [Modificación] HHII HHII (SEQ ID NO: 234)	ATGGGGTGTAGTGAATGTTCCGGTGTGATCT GGAAGTGTGTTGGACCCAACCCCCGACCCAGCC TGCTGATTAGCTGGACCTTGCGCATGCA GGTCGTGCACATTATTACCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGTGGTAATAAGTCCGGTTCA GGAATTCACCGTTCCGGGTCTGGTGGTGTAA CCGCAACCATAGCCGTCTGAAACCCGGGT GTTGATTACCCATTACCGTTTATGCGAGTT ACCGTTACCAACCCAAAGTGATTCAATTAA AACCGATTCCATTAAATTACCGAACAG AAGGTAGCGGGTTC (SEQ ID NO: 246)	
ATI-1375 [40K PEG de 2 ramas]	MGVSDVPRDLEVAATPTSLIIS WDAPRGLARYYRITYGETGGNS PVQEFIVTGRGTTATISGLKPGV DYTITIVYAVTIDRDGTRSFDPISI NYRTEGSGC [Modificación] HHII HH (SEQ ID NO: 235)	ATGGGGAGGTTCCTGATGTTGCGCCGGGACCT GGAAGTGGTTGGCCACCCCCACCCAGCC TGCTGATCAGCTGGACGCTCCGAGAGGT CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG CGAACAGGAGGCAATTAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTTTCGGTGGTACCAAC AGCTACCATCAGGGCCTTAAACCTGGCG TGTGATTACCCATCAGCTGTGTATGCTGTCA CTATCGACCGTGAACGGTACCCGGAGCTTC GACCCAAATTCCATTAAATTACCGCACAGA AGGTAGCGGGTGGCACCACCAAC AC (SEQ ID NO: 247)	

(continuación)

Acnecinas antimicostátna PEGiladas			
Cón	Secuencia de aminoácidos	Secuencia	Secuencia de ácido nítrico
ATI-1376 [40K PEG de 2 ramas]	MGVSDVPRDILEVVAATPTSSLIS WDAPAGLARYYRITYGETGGNS PVQEFTIVVGRGNATATISGLKPGV DYTIVVYAVTIFRDGPVTWDPISI NYRTEGSCC [Modificación] IHHHH III (SEQ ID NO: 236)	ATGGGAGGTTCTGATGTTGCGCGGACCT GGAAGTGGTTGGCTGCCACCCCCACAGCC TGCTGATCAGCTGGGACGGTCCGGCTGGT CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACCG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTTGTGGTGGCTGGTAACAC AGCTACCATCAGGGCCTTAACCTGGCG TTGATTATACCATCAGCTGTATGCTGTCA CTATCTTCCGIGACGGTCCCGTCACCTGG GACCCAAATTCCATTAAITACCGCACAGA ACGGTAGCGGTGCCACCATCACCACATC AC (SEQ ID NO: 248)	ATGGGAGGTTCTGATGTTGCGCGGACCT GGAAGTGGTTGGCTGCCACCCCCACAGCC TGCTGATCAGCTGGGACGGTCCGGCTGGT CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACCG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTTGTGGTGGCTGGTAACAC AGCTACCATCAGGGCCTTAACCTGGCG TTGATTATACCATCAGCTGTATGCTGTCA CTATCTTCCGIGACGGTCCCGTCACCTGG GACCCAAATTCCATTAAITACCGCACAGA ACGGTAGCGGTGCCACCATCACCACATC AC (SEQ ID NO: 249)
ATI-1377 [40K PEG de 2 ramas]	MGVSDVPRDILEVVAATPTSSLIS WDAPKGGLARYYRITYGETGGNS PVQEFTIVVGRGNATATISGLKPGV DYTIVVYAVTIFRDGPVWTWDPISI NYRTEGSCC [Modificación] IHHHH HH (SEQ ID NO: 237)	ATGGGAGGTTCTGATGTTGCGCGGACCT GGAAGTGGTTGGCTGCCACCCCCACAGCC TGCTGATCAGCTGGGACGGTCCGGCTGGT CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACCG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTTGTGGTGGCTGGTAACAC AGCTACCATCAGGGCCTTAACCTGGCG TTGATTATACCATCAGCTGTATGCTGTCA CTATCTTCCGIGACGGTCCCGTCACCTGG GACCCAAATTCCATTAAITACCGCACAGA ACGGTAGCGGTGCCACCATCACCACATC AC (SEQ ID NO: 249)	

(continuación)

Adehictinas antimiotiñina PEGiladas			
Cion	Secuencia de aminoácidos	Secuencia	Secuencia de ácido nucelico
AT-1378 {40K PEG de 2 ramas}	MGVSDVPRDLEVAATPTSLIIS WSLPNPGNAHYYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGVTATISGLKPG VDYTITVYAVTVTDTGFITYKPI SINYRTEGSGC [Modificación] HHHH HH (SEQ ID NO: 238)		ATGGGGAGTTCTGATGTGCGCGGGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGAATCCG GGTAACGCCATTATTACCGCATCACTTA CGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGGCTGGTGTGGTGT TACAGCTACCATCAGGGCCTAAACCTG GGGTGATTATACCATCACCTGTTGCT GTCACTGTTACTGACACAGGTTTCATCAC GTACAAACCAATTCCATTAAATTACCGCA CAGAAGGGTAGCGGTTGCCACCACATCACCAC CATCAC (SEQ ID NO: 250)
AT-1379 {40K PEG de 2 ramas} AT-1523 {N-elimina imida}	MGVSDVPRDLEVAATPTSLIIS WSLPHQGKANYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGVTATISGLKPG VDYTITVYAVTVTDTGYLKYP SINYRTEGSGC [Modificación] HHHH HHH (SEQ ID NO: 239)		ATGGGGAGTTCTGATGTGCGCGGGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCACCAA GGTAAGCCATTATTACCGCATCACTTA CGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGGCTGGTGTGGTGT TACAGCTACCATCAGGGCCTAAACCTG GGGTGATTATACCATCACCTGTTGCT GTCACTGTTACTGACACAGGTTACCTCAA GTACAAACCAATTCCATTAAATTACCGCA CAGAAGGGTAGCGGTTGCCACCACATCACCAC CATCAC (SEQ ID NO: 251)

Las SEQ ID NO de Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc ilustrativas descritas en el presente documento y Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc ilustrativas de la invención (véase PRD-1288, PDR-1474, PRD-1305) se presentan en la Tabla 6.

5

Tabla 6

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Enlazador	Secuencia	
				Dominio C-terminal	Secuencia de ácido nucleico
PRD-932	EFKGSGSTHTC PPCPAPPELLEAG SSVFLPPPKEK DTLMISKITPEV TCVVVVDVSHED PEVKENWTVDS VEVHNAKITKPR EQYVNSTYRIVV SVLTVLHQDWL NGKEYECKVSN KALPAPIERTI SKANGQPRREPQ VYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFTPSDIAVE WESNGQFENNY KTFPPVLDGDC SPFLYSKLTVD KSRWQQGNVFS CEVMHEALHNH YTQKSLSLSPG AGGGGGGGVBD VPRDLEVVAAAT PTSLTISWSLP YAGHLNYYRIT YGETGGNGFVQ EFTVPGRGVTA TISGLKPGVDY TITVYAVTILK SQLIHYSPISI NVRTEI (SEQ ID NO: 252)	EFKGSGSTHTC PPCPAPPELLEAG SSVFLPPPKEK DTLMISKITPEV TCVVVVDVSHED PEVKENWTVDS VEVHNAKITKPR EQYVNSTYRIVV SVLTVLHQDWL NGKEYECKVSN KALPAPIERTI SKANGQPRREPQ VYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFTPSDIAVE WESNGQFENNY KTFPPVLDGDC SPFLYSKLTVD KSRWQQGNVFS CEVMHEALHNH YTQKSLSLSPG AGGGGGGGVBD VPRDLEVVAAAT PTSLTISWSLP YAGHLNYYRIT YGETGGNGFVQ EFTVPGRGVTA TISGLKPGVDY TITVYAVTILK SQLIHYSPISI NVRTEI (SEQ ID NO: 252)	GAGGGGGSG (SEQ ID NO: 181)	GVSDFVFDLEVA APFTSLLISWSLP YAGHLNYYRITYC ETGGGNSIPVQEFIV PGRGVIRATISCLK PGVDYTTITVYAVT LTKSQQLIHYMPIS INVRTEI (SEQ ID NO: 282)	GACCCCAAATCTAGCGGGTC GACTCACACATGCCACGCT CCCCAACACCTGAACCTCTG GGGGGAAGTCAGTCCTCT CTTCCTGACAAACCCAAAGC ACACCTCTGATGATCTCCCG ACCCCTGAGGTACATGCGG GCGCTGTCAGGTCACATGCG AAGACCTGAGGTCAAGTC AACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCTATAAGCCAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAAACGCACGTACCCGTG GGTCAAGCTGCTCAGCTCC TGCACCAAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGGATCAAGTGCAG GGTCTCTACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCGAGAACCAACAGCTG ACACCCCTGCCCCAACCTCCGG GATGAGCTGACCAAGAACCA GGTCAGCTGACCTGGCTGG TCAAAGGCTCTATCCCGC GACATGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGGCCGGAGA ACAACCTACAAGACACCGCT CCCGTCTGGACTCCGACGG CTCTCTCTCTCTCACAGCA AGCTCACCGTGGACAGAGC AGGTGGCAGCAGGGAAACGT CTTCTCATGCTCCGIGATGC ATGAGGCTCTGCAACACRC TACACCCAGAGGAGCTC CCTGTCCTCCGGCGCCGGAG GGGGCGATCCGGTGGAGCT TCTGATGTCGGCGCGGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCC CCACGAGCTGCTGATCAGC TGGTCTCTCCCTATGCTGG TCATCTAAACTATTACCGCA TCACCTTACGGCGAAACAGGA GGCAATAGCCCTGTCCAGGA GTTCACTGTGCCCTGGCTG GTGTSACAGCTACCATCAGC GGCCTTAACTCTGGGCTTGA TTATACCATCACTGTATG CTGTCACTCTGACTAAAGTCT CAGCTTACATTACATGCG AATTCCATTATTAACCGCA CCGAAATC (SEQ ID NO: 284)

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Enlazador	Dominio C-terminal	Secuencia de ácido nucleico
PRD-1171	GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WTLPHAGRAHY YRITYGETGGN SPVQEFITVPSR GVATATISGLKP GVDTITVYAV TVTTTKVJHYK FISINYRTEIE PKSSDKTHTCP PCPAPELLGGP SVFLFPPPKEKD TLMISRTPEVT CVVVDVSHESDF EVKFINNYVGV EVHNAKTKPRE EQYINSTYRVS VLTVLBQDRLN GKEYKCKVSNK ALPAPIEKTI KAKGQPREPQV YTLPPGRDELT KNQVSLTCLVK GFYPSRIAVEW EENQQPENNYK TTPPVLDSDG FFLYSKLTVDK SRWQQRNIVPSC SVMHEALHNNY TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 253)	GVSDVPRDLEVY AATPTSLLIESWT LPHAGRAHYYRI TYGETGGNSPVQ EFTVPGRGVAT ISGLKPGVVDYTI TVYAVTVTTKV IHYPKISINYRT EX (SEQ ID NO: 275)	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	KTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKP RDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEV KPNWYVDGVEVHM AKTKFREEQYNST YRVVSVLTVLHQD WLMGKEYKCKVSN RALP2EIEKTI SK ANGQPREFQVYTL PPSRDELTKNQVS LTCLVKGEFYPSDI AVEWESNGQPEHN YKTTIPVLDSDG FFLYSKLTVDKER WQQGNVFSGSVNH EALHNNYQTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 283)	GGCGTGAGCGACGTGCCCG GGATCTAGAAGTGGTGCGCTG CTACCCCCCAAGCTTGCTG ATCTCTGGACACTGCTCA CGCTGGCGGGCTCATTA ATAGAATTACCTACGCGAG ACAGGGGGAACTCTCCCGT GCAGGAATTCAACCGTGCTG GAGGGCGTGACTGCACCC ATCAGTGGGCTGAAGCCAGG AGTGGACTACACATTACCG TGTACGTGTGACTGTGACC ACAACATAAGTGATCACTA CARACCCATCTCTATTAA ATCGACCGAAATTGAGCT AAGAGCTCGACAAACCCCA CACATGCCACCTGTGCCCC CCCCGAACTGCTGGGCC CCTTCAGTCCTCCCTTCCC CCCCAAACCCAAAGGACACCC TCATGATCTCCCGACCCCT GAGGTACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGGCCACGAGACC CTGAGGGTCAGTTCACTGG TACGTGGCGGCCTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGC CGUGGGGGAGCAAGTACAC AGCACCTTCCGTGTGGTCA CGTCTTCACCGTCTGCCCC AGGACTGGCTGAATGCCAAG GAGTACACGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCCCTCCGACCC CCATCGAGAAAAACATCTCC AAAGCCAAGGGCAAGCCCC AGAACACACGGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCCAGAACCAAGGTCA CCTGACCTGGCTGGTCAGG GCTTCTATCCCAGGACACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAA TGGGCAGCCGGAGAAACAT ACAAGACCAACGCCCTCCCGTG TTGGACTCCGACGGCTCTT CTTCCTCTACAGGAAAGCTCA CCGTTGGCAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTCTC ATGCTCCGTGATGCAAGGAG CTCTGCAACACCACTACACCG CAGAASAGGCTCTCCCTGTC TCCCCGGAAA (SEQ ID NO: 285)

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Enlazador	Secuencia	
				Dominio C-terminal	Secuencia de ácido nucleico
PRD-1173	GVSDVPRDLEW VAATPTSLLIS WTIPLHAGRAY TRITYGETGGS SPVQEFTVPGK GVATATISGLRP GVDTIITVYAV TVTTTKVIIHYN PISINYRTEID KTHTCPPCPAP ELGGGSPVPLF PFKFKDELMS RTPEVTCVVD VSHEDPPEVKFW WYVDGVEVHNA KTKPREEYQNS TYRVSVLTVL HQDWLNGKEYR CKVSNKALPAP IEKTIKAKRQ PREPQVYTLPP SFDELTKRQVS LTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTTTPPV LDSDGSFFFLYS KLTVDKSRWQQ GNVFSCGVRIHE ALHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 254)	GVSDVPRDLEW AATPTSLLIS WTIPLHAGRAY TRITYGETGGS SPVQEFTVPGK GVATATISGLRP GVDTIITVYAV TVTTTKVIIHYN PISINYRTEID KTHTCPPCPAP ELGGGSPVPLF PFKFKDELMS RTPEVTCVVD VSHEDPPEVKFW WYVDGVEVHNA KTKPREEYQNS TYRVSVLTVL HQDWLNGKEYR CKVSNKALPAP IEKTIKAKRQ PREPQVYTLPP SFDELTKRQVS LTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTTTPPV LDSDGSFFFLYS KLTVDKSRWQQ GNVFSCGVRIHE ALHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 254)	D	KTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPK KDTLMISRTIPEVT CVVVDVSHEDPEV KFTWYVGDVEVH ARTEPPEEQYINST YRVVSVLTVLHQD WLNCKEYRCKVSN KALPAPIEKTIK AKGQPREFQVYTL PPSRDELTQNQV3 LTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQFENN YNTTFFPVLDGDS FFLYGKLIVDKSR WQQGNVFSCSVNH EALHNHYTQKSL3 LSPGR (SEQ ID NO: 283)	GGCGTGAGCCACGTGCCCCG GGATCTAGAAGTGGTGGCTG CTACCCCCACAGCTTGTCTG ATCTCTGGACACTGCCTCA CGCTGGCCGGCTCATTACT ATAGAATTACCTACGGGGAG ACAGGGGGAACTCTCCCGT CCAGGAATTCAACGGCTG GAAGGSGCTGACTGCCACC ATCAGTGGGCTGAAGCCAGG ACTGGACTACACATTACCG TGTACCTGTGACTGTGACC ACAACTAACGTGATCCACTA CAAACCCATCTCTTAATT ATCGGACTGAAATTGACRAG ACCCACACATGCCAACCTTG TCCAGCCCCCGAGCTGCTGG GCGGCCCTCAGTCTTCTC TTCCCCCRAAAACCCAAGGA CACCTCTGATCTCCCGA CCCCCTGAGGTCAACATGCTG GTTGGGACGTGAGCCACGA AGACCTGAGGTCAAGTICA ACTGTTACGTGGACGCCCTG GAGGTCTATAATGCCAAGAC AAACCCCCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCTCTCTCACCGTCT GCACCAAGGACTGGCTGARTG GCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCCTCCARCAAAGCCCTCC AGCCCCCATCGAGAAACCA TCTCCAAGGCCAACGGCAG CCCCCTGAGGACACAGCTTA CACCTCTCCCCCATCCCCGG ATGAGCTGACCAAGAACAG GTCAGCTGACCTGCTGGT CAGGGCTCTATCCCCAGCG ACATTCGCGTGGAGTGGAG ACCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCAACGCTC CCGTGTTGGACTCGACGGC TCCTTCTCTCTCACGCAA GCTCACCGTGGACAAAGACCA GGTGGCAGCAGGGGACGTC TTCCTDAIGCTCCGTGATCCA TGAGGCTCTGCACAAACACT ACACGCAAGAGGACCTCTCC CTGTCCTCCGGAA (SEQ ID NO: 285)

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Enlazador	Secuencia	
					Secuencia de ácido nucleico
PRD-1174	GVSDVPRDLEVV VAATPTSLLIS WTIPLHAGGRHY YRITYGETGGW SPVQEFTVPGK GVYATISGLKP GVYDIIITVYAV TVTTTKVHYN PISINYRTELE SPKAQASSVPT AQFQAEGLAKT HTCPPCPAPEL LGGPSVFLFFF KPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFHWY VDGVEVHNART KPFREEQYNGTY RUVGVLTVLNQ DWLNGKEYKCK VENKALPAPIE KTIISKAKGQPR EPQVYTLPPE DELTIKUQVSLT CLVKGFYPSEI AVEWESNGQPE NUYKTEFPVLD SDG3FFLYSFL TVDKSRWQQGU VPSCSVMHEAL HNNYTTQK3L3L SPGK (SEQ ID NO: 255)	GVCDVPRDLEVV AATPTSLLISWT LPRAGRAHYRYRI TYGETGGNCPVQ EFTVPGRGVTAT ISGLKPGVYDVTI TVYAVTVTTTAV IHYKPISEINYRT EI (SEQ ID NO: 275)	ESPKAQASG VPTAQPQAE GLA (SEQ ID NO: 183)	KTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFFF KDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEV KFTWYVDGVEVMH ARTKPREEQYNIET YRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYKCNVS KALPAPIEKTISK AKGQPREPVYTL PPGRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSEI AVEWESNGQPEM YRTTPVLDSDGS FFLYSKLTVYDKSR WQQHUVFSCSVMH EALHNHYTQK3L3L LSPGK (SEQ ID NO: 283)	GGCGTGAGCGACGTCGCCCG GGATCTAGAAGTGGTGGCTG CTACCCCCACAAAGCTTCTG ATCTCCTGGACACTGCCTCA CGCTGGCCGGCTCATTTCT ATAGAATTACCTACGGGGAG ACAGGGGGAACTCTCCCGT GCAGGAATTCAACCTGCCTG GAAGGGGGCTGACTGCACCC ATCAGTGGGCTGAAGCCAGG AGTGGACTACACAATTACCG TGTACGCTGTGACTGTGACC ACAACATTAAGTGTACCACTA CAAACCCATCTCTATTAAATI ATCGGACCGRAATTGASTCT CCAAGGCTCAGGGCACGTC CGTGCCTACCGCTCAGCCAC AGGCTGAGGGCCTGCTCTAAG ACCCACACATGCGCCCTCTG TCCAGCTCCCGAACCTGCTGG GGGGGCTTCAGTCTTCTC TTCCCCCCTAAACCCCTAGGA CACCCCTCATGATCTCCCGA CCCCCTGAGGTACACATGCTG GTGGTGGACGTGAGGCCAGA AGACCCCTGAGGTCAACTTCA ACTGGTACGTGGACGCCGTG GAGGTGATTAATGCCAAGAC AAAGCCGGGGAGGGAGCACT ACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGCTCAGCGTCCT GCACCAAGGACTGGCTGAACTG GCAAGGACTACAAAGTGTCAAG GTCTCGAACAAAGGCTCC AGCCCCCATCGAGAAAAACCA TCTCCAAAGCCAAGGGCAG CCCCGAGAACACAGGTGTA CACCCCTGCCCCCATCCCCGG ATGAGCTGACCAAGAACCTG GTCAGCGCTGACCTGCTGGT CAAAGGCTTCATCCCCAGCG ACATGCCGTTGGAGTGGGAG ASCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACBAGACCAAGGCTC CCGGTCTGGACTCGACCGG TCCCTTCTCCCTCAACGCAA GCTCACCGTGGACAAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGGCTGTCACAAACCACT ACACGCAGAAGAGGCCCTCC CTGTCCTCCCCGGGAA (SEQ ID NO: 287)

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Enlazador	Secuencia	
					Secuencia de ácido nucleico
PRD-1175	DRTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDILM GRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKEF HWYVGVEVH AKTKPREEQYN STYRVVSVLTV LRQDWLNGKEY KCKVSKNKA PIEKTISKANG QPREPQVTLP PSRDELTKNQV SLTCLVKGFPYP SDIAVEWEGNG QOPENNYKTPPP VLSDSDGSFFLY SKITVOKSRWQ QGNVFSCGVMR EALHMHYTQKS LSLCPGAGGGG SGGVSDVPRDL EVVAATPTSSL ISWTLPHAGRA HYYRITYSETG GUSPVQEFTVP GRGVVTATISGL KPGVDYTIIVY AVTVTTTKVIIH INPISINYRT I (SEQ ID NO: 256)	DRTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDILM GRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKEF HWYVGVEVH AKTKPREEQYN STYRVVSVLTV LRQDWLNGKEY KCKVSKNKA PIEKTISKANG QPREPQVTLP PSRDELTKNQV SLTCLVKGFPYP SDIAVEWEGNG QOPENNYKTPPP VLSDSDGSFFLY SKITVOKSRWQ QGNVFSCGVMR EALHMHYTQKS LSLCPGAGGGG SGGVSDVPRDL EVVAATPTSSL ISWTLPHAGRA HYYRITYSETG GUSPVQEFTVP GRGVVTATISGL KPGVDYTIIVY AVTVTTTKVIIH INPISINYRT I (SEQ ID NO: 256)	GAGGGGSG (SEQ ID NO: 181)	GVSDFPRDLEVVA ATPTISLLISWTLPL HAGRAHYVRITYG ETGGGNSPVQEFTV PGRGVVTATISGLK PGVDTITVYAVT VTTTRVIVHYKPI INYRTEI (SEQ ID NO: 275)	GACAAACTCACACATGCCC ACCGTCCCCAGCACCTGAAAC TCCCTCTCCCCCAAAACC CAAGGACACCCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTGACA TGCCTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCCTGAGGTCA AGTTCACTGGTACAGTGAC GGCGTGGAGGTGCAATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGC ACGAGTACACAGCAGCTAC CGTGTGTCAGCGTCTCAC CGTCTGCAACAGGACTGGC TGAATGGCAAGGASTACAG TGCAGGGTCTCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCATCGAGA AAACCACTCCAAGGCCAA GGGAGCCCCCGAGAACACA GGTGTACKACOCTGGCUCCAT CCCCGGATGAGCTGACCRAG AACCAAGTCAGGCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTCTAIC CCAGCGACATGCCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGCAGCC GGAGAACAACTACAAAGACCA CGCCTCCGGTGGACTCC GACGGCTCTCTCTCTCTA CAGCAAGCTCACCGTGGAC AGAGCAGSTGGCACGAGGG AACGCTCTCTCATGCTCGT GATGCAATGAGGCTCTCACA ACCACTACACGGAGAACGC CTCTCTCTCTCTCCGGGCG CGGAGGCGGGGATCCGGTC GCGTGTCCGACGTGCCCCGG GATCTAGAAGTGGTGGCTGC TACCCCCACAAGCTTGCTGA TCCTCTGGACACTSCCTAC GCTGGCGGGGCTCAATTACTA TAGAAATTACCTACGGGAGA CAGCCGGGAACCTCCCGTG CAGGAATTACCGTGCCTGG AAGGGCGTGACTGCGACCA TCAGTGGGCTGAAGCCAGGA GTGGACTACACAATTACCGT GTACGGTGTGACTGTGACCA CAACTAAAGTGTACCTAC AAACCCATCTCTATTAAATT TCGGACCGAAATC (SEQ ID NO: 288)

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Enlazador	Secuencia	
					Secuencia de ácido nucleico
PRD-1177	DNTHTCPPCPA PELGGPSVFL FPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVGVEVRN AKTKPREEQYI STYRVVSVLTV LHQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIERTISKARG QPREPQVYTLR PSRDELTKNQVS SLTCCLVKGFYP SDIAVEREGNG OPENNYKTTFP VLDSDGSEFFLY SKLTVDKSERWQ QGNVFGCCGVMH EALRNNYQTQNS LSLSPELQLEE SAAEAQDGELD GV3DVPDLEV VAATPTELLIS WILPHAGRABY YRITYGETGGN SPVQEFTVPGK GVATATIGSLKP GVDYTTITVYAV TVTTTKVIHYK PIGINYRTEI (SEQ ID NO: 257)	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDITLMI9RT PEVTCVVVDVSH EDPEVKFENWYVD GVEVHNAKTEKPR EEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNG KEYRKOKVSINKAL PAPIEKTISSKAK GQPREPQVYTLR PSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPED IAVEWESNGQPE NWYKTTTPPVLDL DGSEFFLYSKLTV DK3DRWQQGIVF3 CGVMMHEALEKHY TQKSLSLSP (SEQ ID NO: 276)	ELQLEESAA EAQDGELD (SEQ ID NO: 184)	GV3DVPDLEVVA ATPTISLLISWTLR HAGRAHYVRITYG ETGGNSPVQEFTV PGRGVATISGLK PGVNTITVYAVT VTTTRVIHYKPIIS INYRTEI (SEQ ID NO: 275)	GACAAACTCACACATGGCC ACCGTGCCCCAGCACCTGAC TCCCTGGGGGACCGTCAGTC TTCCTCTTCCCCCAAAACC CAAGGACACCCCTCAATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCA TCCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACCAAGACCCCTGAGGTCA AGTCACTGGTAQGIGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGGGGAGG ACGAGTACACAGCACCTAC CGTGTGGTGGCCTGCTC CGTCCCTGCACCAAGACTGGC TGAATGCCAAGGAGTACAG TGCAAGGTCTCAAACAAAGC CCTCCCGACCCCCATCGAGA AAACCATCTCAAAGGCTAA GGGCAAGCCCCGAGAACCC GGTGTACACCCCTGCCCCAT CCCGGGATGAGCTGACCTAG AACCAAGTCAGGCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCATTC CCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGCGACGCC GGAGAAACATACAAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCTTCTCTCTCTA CAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAAGGG AACGTCTTCATGCTCGT GATGCAATGAGGCTCIGCACA ACCACATACAGCAGAACAGC CTCTCCCTGTCCTGGAGCT GCAGCTGGAGGAAAGCCCG CTGAGGCTCAGGACGGAGAA CTGGAAISCGTGAACGCGT GCCACGGGATCTGAGGTGG TGGCTGCTACCCCCAAGC TTCGCTGATCTCTGGACACT GCCCTCACCGCTGGCGGGCTC ATTACTTAAAGATTACCTAC GGGGAGACAGGGCGGAACTC TCCCGTGCAGGAATTCAACCG TGCCTGGAGGGGGCTGACT GCCACCAATCAGTGGGCTGAA GCCAGGGAGTGGACTACACAA TTACCGTGTACGCTGTGACT GTGACCAACTAAAGTGAT CCACTACAAACCCATCTCTA TTAATTATCGGACCGAATT (SEQ ID NO: 289)

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Enlazador	Secuencia	
					Secuencia de ácido nucleico
PRD-1178	DKTHTCPPCPA FELLGGPSVFL FPPKPKDILM SRTPEVTCVV DVSHEDPEVKF HWYDGVVEV AKTKPREEQY STYRVSISV LRQDWLNG KCKVSNKAL PIEKTISK QPREPQVYTL PGRDELTKNQ SLTCLVKG SDIAVEW QPNMNYK VLD LSLCPGP GGSGV LEV LIS AH GGN PGR LKP YAV HYP EI (SEQ ID NO: 258)	DKTHTCPPCPAP FELLGGPSVFLFP PKPKDILMISRT PEVTCVVVDVSH EDPEVKEFNWYD GVEVHN AKTKPREEQY STYRVSISV LRQDWLNG KCKVSNKAL PIEKTISK QPREPQVYTL PGRDELTKNQ SLTCLVKG SDIAVEW QPNMNYK VLD LSLCPGP GGSGV LEV LIS AH GGN PGR LKP YAV HYP EI (SEQ ID NO: 258)	GQPDEPGGS (SEQ ID NO: 185)	GVSDVPRDLEVVA ATPTISLLISWILP HAGRAHYRITYG ETGGGSPVQEFTV PGRGVATISGLK PGVDTITVYAVT VTTKVIHYKPI INYRTEI (SEQ ID NO: 275)	GACAAACTCACACATGGCC ACCGTGCCCCAGCACCTGAAAC TCCCTGGGGGACCGTCAGTC TTCCCTTCTCCCCCAAARACC CAAGGACACCCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGGTACA TGCCTGGTGGGAGCCTGAG CCACGAAAGCCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCAATATGC CAAGACARACCCGGGGAGG AGCAGTACAACACGACCTAC CGTGTGGTCAGCGCTTCAC CGTCTGCACCAAGGACTGAG TGAATGCCAAGGAGTACAAAG TGCAAGGTCCTCAACAAAGC CCTCCCAAGCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAGGCAA GGCAGCCCCGAGAACCCACA GGTGTACACCCCTGGCCCCAT CCCGGAGTGAGCTGACCTAG AACCAAGTCAGGCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTCTATC CCAGGACATCGCCGCTGGAG TGGAGAGGCAATGGCAGCC GGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCTCTCTCCCTTA CAGCAAGCTACCCGTGGACA AGAGCAGCTGGCACCAAGGG AACGTTCTCATGCTCG GATGCACTGGCTCTGCACA ACCACATACACGCAAGAGAC CTCTCCCTGCTCTCCGGCA GCGGAGGAGCCCTGGGGGA GCGGCGTGAGCGACCTGCGCA CGGGATCTAGAAGTGGTGGC TGCTACCCCCACAAAGCTGC TGATCTCTGGACACTGCCT CACGCTGGCCGGGCTCAITTA CTATAGAATTACCTACCGGG AGACAGGGGGAACTCTCC GTGCAGGAATTACCGCTGCC TGGAAAGGGCGTGACTGCC CCATCACTGGGCTGAAGGCC GGAGTGGACTACACAAATTAC CGTGTACCTGTTGACTGTGA CCACACATAAGTGAAC TACAAACCCATCTTATTAA TTATCGGACCGAAATT (SEQ ID NO: 298)
PRD-1180	DKTHTCPPCPA FELLGGPSVFL FPPKPKDILM SRTPEVTCVV DVSHEDPEVKF HWYDGVVEV AKTKPREEQY STYRVSISV LRQDWLNG KCKVSNKAL PIEKTISK	DKTHTCPPCPAP FELLGGPSVFLFP PKPKDILMISRT PEVTCVVVDVSH EDPEVKEFNWYD GVEVHN AKTKPREEQY STYRVSISV LRQDWLNG KCKVSNKAL PIEKTISK QPREPQVYTL	GGGGGGGGGS GSGS (SEQ ID NO: 186)	GVSDVPRDLEVVA ATPTISLLISWILP HAGRAHYRITYG ETGGGSPVQEFTV PGRGVATISGLK PGVDTITVYAVT VTTKVIHYKPI INYRTEI (SEQ ID NO: 275)	GACAAACTCACACATGGCC ACCGTGCCCCAGCACCTGAAAC TCCCTGGGGGACCGTCAGTC TTCCCTTCTCCCCCAAARACC CAAGGACACCCCTCAIGATCT CCCGGACCCCTGAGGGTACA TGCCTGGTGGTGGACTGAG CCACGAAAGCCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCAATATGC CAAGACAAAGCCGGGGAGG

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Secuencia		
			Enlazador	Dominio C-terminal	Secuencia de ácido nucleico
	QPREPQVYTLF PSRDELTKNQV SLTCLVKGFYFP SDIAVEWESNG QPEUNYKTTPP VLDSDGEGFLY SKLTVDKSRWQ QGNVFSCGVNH EALHNHYTQNS LSLSPGGSSEGG SGSGSGSGVSD VPRDLEVVAAAT PTSLLEWTLF HAGRKYRYIT YGETGGHSPVQ EFTPGRGVTA TISGLKPGWVDF TIVVYAVTVTT TKVIIHYKPISI NYRTEI (SEQ ID NO: 259)	PSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLD3 DGSFFLYSKLT DKDRWQQGNVFG CSVMHEALHNHY TQKSLSLSP (SEQ ID NO: 276)			AGCAGTACACATCACGCTAC CGTGTGTCAGCGTCTCAC CGTCCTGCACCGAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAGGGTCTCCAAACAAGC CTTCCCAGCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAA GGSCAGGCCCCGAGAACCCAA GGTGTACACCCGTGCCCCAT CCCCGGATGAGCTGACCAAG AACAGGTCAGGCTGACCTG CTTGGTCAAAGGTTCTATC CCAGGACACATCGCOCTGGAG TGGGAGAGCAATGGCAGGCC GGAGAACACTACAAAGACCA CGCCTCCCGTGTGGACTCC GACGGTCTCTCTCTCTCTA CAGCAAGCTCACCGTGGACCA AGAGCAGGTGGCAGGCAGGGG AACGTCTTCATGCTCGT GATGATGAGGCTCTGCACAA ACCACTACACGCAAGAACAGC CTCTCCCTGCTCCCCGGGG CAGCGGCTCTGGATCTGGCA GTGGGAGCGGCTCTGGCTG AGCCACGTCCCCACGGCATCT AGAAATGGTGGCTCTAACCC CCACAACTTGCTGATCTCC TGGACACTGCGTCAACCTGG CCGGGCTCATTACTATAGAA TTACCTACGGGGAGACAGGC GGGAACCTCTCCCGTGCAGGA ATTCAACCGTGCCTGGAGGG GGGTGACTGCCACATGAGT GGGCTGAGGCCAGGAGTGGG CTACACAAATTACCGTGTACG CTGTGACTGTGACCAACACT AAAGTGTGCACTACAAACC CAICCTATIAATIATCGGA CCGAAATT (SEQ ID NO: 291)
PRD-1284	DTHHTCPPCPA PELGGPSVFL FPFPKPKDTLM SRTPEVTCVV DVSHEDPEVKF NWYVVDGVEVHN AKTKPREEQYH GTYRVVGVLT LHQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISAKG QPREPQVYTLF PSRDELTKNQV SLTCLVKGFYFP SDIAVEWESNG QPEUNYKTTPP VLDSDGEGFLY SKLTVDKSRWQ QGNVFSCGVNH EALHNHYTQNS LSLSPELQLEE	DKTHHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PRPRDTLMISRT PEVTCVVVDVSH EDPEVKFNNWYVD GVEVHNAAKTKPR EQQYINSTYRVVS VLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKAL PAPIEKTIISAK QPREPQVYTLF PSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLD3 DGSFFLYSKLT DKDRWQQGNVFG CSVMHEALHNHY TQKSLSLSP (SEQ ID NO: 276)	ELGLEESSAA EAQDGELD (SEQ ID NO: 184)	GVGDSVPRDLEVVA ATPTSLLISWDAP RGLARYYRITYGE TGGNSEVQEFTVF GRGITATISGLKP GVDYTTITVYAVTT DHDGTRAFDPISI NYRTEI (SEQ ID NO: 277)	GACAAACACTCACACATGCC ACCGTGGCCAGCACCTGAC TCCCTGGGGGACCGCTCTGC TTCCTCTCCCCCAAAACCC CAAGGACACCCCTATGATCT CCCGGACCCCTGAATGACCA TGGGTGTTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCTGAGCTCA AGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCAAAATG CAAGACAAAGCCCGGGCGAG AGCAATACAAACAGCACCTAC CGTGTGGTCAGCGTCTCAC CGTCCTGCACCCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAGGGTCTCCAAACAAGC CCTCCAGGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAA GGCGAGGCCCCGAGAACCCAA GGTGTACACCCGTGCCCCAT CCCCGGATGAGCTGACCAAG

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Secuencia		
			Enlazador	Dominio C-terminal	Secuencia de ácido nucleico
	SAAEAQDGELD GVSDVPRDLEV VAATPTSELLIS WDAPRGLARYY RITYGETGGNS PVQEFTVFGRG TTATISGLKPG VDYITIVYAVT IFRDGPTR3FDP ISINYRTEI (SEQ ID NO: 260)				AACCAAGTCAGCCCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCATC CCAGGACATCGCCGTCGAG TGGGAGAGCAATGGCAGCC GGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCCTCTCCCTCA CAGCAAGCTCACCGTGGACCA AGAGCAGGTGGCAGCAGGG AACGTCTCTCATGCTCCGT GATGCAAGGGCTGTCACA ACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGAGCT GCAGCTGGAGGAAAGCAGCG CTGAGGCTCAGGACGGAGAA CTGGATGCCGTGACCCACGCT GCCACGGATCTAGAAGTGG TGGCTGTACCCCCAACAGC TIGCTGATCAGCTGGGACGC TCCGAGAGGCTGGGCTCGAT ATTACCCATCACTTACCGC GAAACAGGAGGCAATAGCCC TGTCCAGGAGTCACTGTGT TCGGTGTGGTACACAGCT ACCATCAGCGGCCTTARACC TGGCGTTGATTATAACCATCA CTGCTGTGCTGTCATCTAC GACCGTGCCTGGTACCCCGAG CTTCGACCCAATTICCATTA ATTACCGGACCGAAATT (SEQ ID NO: 292)
PRD-1285	DKTHTCPPCPA PELIGGPBVFL FPPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHN AKTPKPREEQYH STYRVVSVLTV LHQDWLNGKEY KCKVGNKALPA FIEKTISKAKG QPPEPQVYTLF PERDELTQNQV SLTCLVKGVYP SDIAVEWESNG QPEQNYKTTFF VLDSDGSEFFLY SKLTVDKSRWQ QGNVFSCCVMH EALHHRHYTQRS LSLSPLELOEE SAAEAQDGELD GVSDVPRDLEV VAATPTSELLIS WDAPAGLARYY RITYGETGGNS PVQEFTVFGRG TTATISGLKPG VDYITIVYAVT IFRDGPVTDWDP ISINYRTEI (SEQ ID NO:	DKTHTCPPCPAP ELLOGPSVFLFP PKPKDTLMIQRT PEVTCVVVDVSH EDPEVKFNUWYVD GVEVHMAKTEPR EEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNG REYKCKVSVNNAL PAPIEKTSKAK QPPEPQVYTLF PERDELTQNQV LTCLVKGVYP IAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLD DGGFFLYSKLTV DKDRWQOQHVE CSVNHEALEHY TOKSISLSP (SEQ ID NO: 276)	ELQLEESAA EAQDGELD (SEQ ID NO: 184)	GVSDVPRDLEVVA ATPTSELLISWDAP ACLARYYTRITYGE TGGNPSVQEFTV GRGNTATISGLKP GVDYITIVYAVT FROGPVTDWDP ISINYRTEI (SEQ ID NO: 278)	GACAAGACTCACACATGCC ACCGTCCCCAGACCTGAAAC TCCCTGGGGGACCGCTGACTC TICCTCTTCCTCCCAAAACC CAAGGACACCCCTCATGATCT CCCGGACCCCCCTGAGGTCA TGGCTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAAGACCCCTGAGCTCA AGTTCAACTGGTACCTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCG CAAGACAAAGCCGGCGAGG AGCAGTACACACAGCACGCTAC CGTGTGGTCAGCGTCCCTAC CGTCTGCAACCGAGGACTGGC TGAATGGCAAGGGATACARAG TGCAGGCTCTCCAAACAAAGC CCTCCAGCCCCCATGAGA AAACCACTCCAAAGCCAA GGGCAGCCCCGAGAACCRCA GGTGTACACCCCTGGCCCAT CCCGGGATGAGCTGACCGAG AACCAAGCTGAGCCCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCATC CCAGGACACATCGCCGTCGAG TGGGAGAGCAATGGCAGCC GGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCCTCTCTCTCA CAGCAAGCTCACCGTGGACCA AGAGCAGGTGGCAGCAGGG AACGTCTCTCATGCTCCGT GATGCAAGGGCTCTGCACCA

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Enlazador	Secuencia	
				Dominio C-terminal	Secuencia de ácido nucleico
	261)				ACCCATACACGCCAAGGAGC CTGACGCCCTGCTCAGGAGCT GCAAGCTGGAGGAAAGCCCG CTGAGGCTCAGGACGGGAGAA CTGGATGGCGTGAGGAGACGT GCCACGGATCTAGAAGCTGG TGGCTGCTACCCCCACARGC TTCCTGATCAGCTGGGAGCC TCCGGCTGGCTGGGCTGAT ATTACCGCATCACTTACGGC GAACAGGAGGGCATAGCCC TGTCTAGGAGTTCTAGTGG TCCGTCGTGGTAACACAGCT ACCATCAGCCGCGTAAACC TGGCGTGTATTATACATCA CTGTGTTATGCTGTCACTATC TTCGGTGAACGGTCGCTCAC CTGGGACCCATTTCGATTA ATTACCGGACCGAAATT (SEQ ID NO: 261)
PRD-1286	DNKHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPFPKPKDTLM SRTPEVTCVV DVSHEDPEVKP NWYVDGVVEVHN AKTKPREEQYH STYRVVSVLTV LHQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISKARG QFREPQVYILP PSRDELTKNQV SLTCLVKGFYIP SDIAVEREGNG QPNINNYKTTPP VLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQ QGNVFGCCVWR EALHNHYTQNC LELSPELQEE SAREAQDGELO GVSDVPRDLEV VRAIPTSLIIS WDAPKGLARYY RITYGETGNS PVQEEFTVVGRG UTATISGLEPG VDYTTITVYAVT IPRDGPVTWDP ISINYRTEI (SEQ ID NO: 262)	DKHTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMIGRT PEVTCVVVDVSH EDPEVKFENWYD GVEVHNAKTKEF EEQYNSTYRVVB VLTVLHQDWLNG REYKCKVSNKAL PAPIEKTIKAK GQPREPQVYILP PSRDELTKNQVS LTCLVKGFYIPSD IARVEWESNGQPE MNYKTTPPVLDI DGSFFLYSKLTV DKSRWQQGVNFS CSVMHEALHNHY TQKQLSLQP (SEQ ID NO: 276)	ELQLEESAA EAQDGELO (SEQ ID NO: 184)	GVEDVPRDLEVVA ATPTISLLISWDAP KGLARYYKITYGE TGGNSPVQEFTVV GRGNTATIEGLMP GVDYLTIVIATVY FRDGPVTWDPISI NYRTEI (SEQ ID NO: 279)	GACAAAATCACACATGCC ACCGTSCCCAGCACCTGAAAC TCCCTGGGGGGACCGTCAGTC TTCCTCTCCCCCAAAACC CAAGGACACCCCTCATGATCT CCGGGACCCCTGAGGTCACA TGGCTGGTGGGGACGTCAG CCACGAAGACCCCTGAGGTC AGTTCACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCTATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCACTACACAGCAGCTAC CGTGTGGTCAGCGCTCTCAC CGTCCTGACCCAGGAGTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAAACAAGC CCTCCCGAGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCAAAGCCAAA GGGAGGKICCGAGAACTACA GGTGTACACCCCTGGCCCCAT CCCGGGATGAGCTGACCGAG AACCAAGGTCAGGCTGACCTG CCTGGTCAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGAGGCC GGAGAACAACTACAAAGACCA CGCCCTCCCTGCTGGACTCC GACGGCTCTTCTCTCTCA CAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGGTGGCAGCAGGG AACGTCCTCTCATGCTCCGT GATGCAATGAGGCTCTGCACA ACCACATACACGGCAAGAGC CTCTCTCTGCTCTCGAGGCT GCAGCTGGAGGAAAGCCCG CTGAGGCTCAGGACGGGAGAA CTGGATGGCGTGAGGAGACGT GCCACGGATCTAGAAGCTGG TGGCTGCTACCCCCACAAAGC TTGCTGATCAGCTGGGAGCC TCCGAAGGGCTGAGCTGAG ATTACCGCATCACTTACGGC

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
			Secuencia		
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Enlazador	Dominio C-terminal	Secuencia de ácido nucleico
					GAAACAGGAGGCCAATAGCCCC TGTCCAGGAGTTCACCTGTGG TCCGGTCTGGTAAACACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACC TGGCGTGTGATTAACCATCA CTGTGTATGCTGTCACATTC TTCCGTGACGGTCGGTAC CTGGGACCCAATTTCATTA ATTACCGACCGAAATT (SEQ ID NO: 284)
PRD-1287	DKTHTCPPCPA PELGGPSVFL FPPKPKDILMI SRTEPEVTEVVV DVSHEDPEVKE NWYVVDGVVEVRN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTV LHQDWLNGKEY KCKVSNKALPA FIERTISKARG QPPEPQVYTLR PERDEUTKKNQV SLTCLVKGFP SDIAVERMEQNG QPEUNYKTTFP VLDSDGSEFFLY SKLTVDKSRWQ QGNVFGCSVMM EALHINHYTQRE LSLSPELQLEE SAAEAQDGELD GVSDVPRDLEV VRAIPTSLLIS WGLPNPGNARY YRITYGETGDN SPVQEFTVPG GVTATISGLP GVYDTITVYAV TVTDTGFITYK PISINYSTEI (SEQ ID NO: 263)	DKTHTCPPCPA PELGGPSVFLFP PKPKDILMISRT PEVTOVVVDVSH EDPEVKEUNVYD GVEVHNAAKTKPR EEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNG KEVKCKVSNKAL PAPIEKTISKAK GQFREPQVYTLR PERDEUTKKNQV LTCLVKGFP IAVEWEENGQPE MNYKTTPPVLDG DGSFFLYSKLTV DKGRWQQGINVFS CSVMHEALHNHY TQK3LSLSF (SEQ ID NO: 276)	ELQLEESAA SAQDGELD (SEQ ID NO: 184)	GVEDVPRDLEVVA ATPTSLLLISWELP NPGNARHVRITYG ETCGGNSEPVQEFITV PGRGVATATISGLK PGVDTITVYAVT VTDTCFITYKPIE INYRTEI (SEQ ID NO: 280)	GACAAAACCTCACACATGCC ACCGTGCCCAGCACCTGAAAC TCCCTGGGGGACCGTCAGTC TTCCCTCTCCCCCAAAAC CAGGACACCCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTAC TCCGTGGTGGTGGACGTCAG CCACGAAGACCCCTGAGGTCA AGTTCACTGGTACGTCAG GGCGTGGAGGTGCAATATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAAACAGCACTAC CGTGTGTCAGCGTCTTCAC CCTCTGCAACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCACAAAGC CCTCCCAGCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAGGCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCCAA GGTGTACACCCCTGCCCCAT CCCCGGATGAGCTGATCAG AACCAAGTCAGCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTCTATC CCAGGGACATTCGCGGTGAG TGGGAGAGCAATGGGAGGCC GGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTCTCCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTAC AGAGCAGGTGGCAGCAGGG AACGTCPTCTCATGCTCCTG GATGCAATGAGGCTCTCACA ACCACTACACGGCAGAAGAC CTCTCCCTGTCTCCCGACCT GCAGCTGGAGGAAGGCCCG CTGAGGGCTCAGGACGGAGAA CTGGATGGCGTGAAGCAGCT GCCACGGGATCTAGAAGTGG TGGCTCTACCCOCACAAAGC TTGCTGATCAGCTGGCTCT GCCGAATCCGGGTAACGCC ATTATMTCGGCATCACTTAC GGCGAAACAGGAGGCCATAG CCCTGTCCAGGAGTTCACTG TGGCTGGTCTGGTGTGTCAG GCTACCATCAGCGGCCTTA ACCTGGCGTTGATTAACCA TCACITGTATGCTGTCACI GTTACTGACACAGGTTTCAT CACGTACARACCAATTTC TTAATTACGGACCGAAATT (SEQ ID NO: 295)

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Enlazador	Secuencia	
				Dominio C-terminal	Secuencia de ácido nucleico
PRD-1288	DRTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKRUTLMI SRTPVEVTCVVV DVSHEDEPDKVRF IWWYVDGVEVHII AKTPKPREHQIN STYPVVEVNLIVV LHQDWLNGKEY KCKVSENNALPA PIEKTISRAKG QPREPQVYTLR PSRDELTRNQV SLTICLVRGYP SDIAVEWESNG OPENMYKTPPP VLDSDGCPFLY SKLTVDKESRWQ QGNVFGCQVMH EALRNHYTQRS LSLSPELQLEE SAEEAQUSLELD GVSDVPRDLEV VAATPTGLLIS WGLPHQGKANY YKITYGETGGN SPVQEFTVPG GVATATISLKP GVDTTITVIAV TVTDTGYLKYK PISINYRTEI (SEQ ID NO: 264)	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLF PRPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSH EDPEVKFVNWYD GVEVHNAKTKP EDQYINSTEYRVS VXQVLSQWQWNG KEYKCKVQINNAL PAPTEENTISKAK GQPREPQVYTLR PSRDELTKNQVS LICLUVKGYP IAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLD DGSFFFLYSELT DKGRWQQGUNVS CSVMHEALHNHY TQESLSSLSP (SEQ ID NO: 276)	ELQLEESAA EAQDGEILD (SEQ ID NO: 184)	GVCDVPRDLEVVA ATPTSLLISWSLP HQGKANYKITYG EESGINSVQEFTR PSRGSVATATISGLK FGVYNTITVYAVT VTDTGYLKYKPT IUYRTEI (SEQ ID NO: 281)	GACAAACTCACXACGTGCC ACCGTGCACAGCACCTGAAAC TCCCTGGGGGAGCNGTCAGTC TCCCTCTTCCCCCAAAACC CAAGGACACCCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCACA TGCCTGGTGGTGGACGCTGAG CCACGAGACCCCTGAGGTCACA AGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCTATAATGC CAAGACAAAGCCGGGGAGG AGCAGTACACAGCAGCTGAC CGTGTGGTCAGGGTCTCAC CUTCTTCACCCAGGCTGGG TSAATGSCBAGGAATACAG TGCAAGGTCTCCACACAAAGC CCFOCCCGGCCCCCTGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAA GGCCAGCCCCGAGGACACCA GGTGTACACCCCTGCCCCCAT CCCGGGATCAGGTCACCAAG AACCAGGTCAAGGCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTCTATC CCAGCGACATGCGCTGGAG TGGGAGAGCAATGGGAGAC GSAGACAAACTACAGACCA CGCCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCTCTCTCTCTA CAGCAAGGTACACGGTGGACA AGACGAGTGGGAGACGGG AACGTCCTCATGGGCTCGT CATGCGATGAGGCTCTGACA ACCACATACACGGCAGAAGAGC CTCTCCCTCTCTCCCCAGCT CCAGCTGGAGGAACGGCCG CTGAGGCTCAGGACGGAGAA CTGGAAAGCCGTCAGGAGCT GCCACGGGATCTAGGACTGG TGGCTGCTACCCCCACAAAGC TGGCTGATCAGCTGGTCTCT GCCGCAACCAAGGTAAGCCA ATTATIACCCGCACTTAC GCGGAAACAGGGAGGAAATG CCCTGTCAGGGAGTTACTG TGGCTGCTGTTGGTGTACA GCTACCATCAGCGGCCCTAA ACCTGCGCTGATATACCA TCACTGCTGATGCTGTCAC GTTACTGATAACAGGGTACCT CAGTACAAACCAATTCCA TTAATTACCGGACCGAAATT (SEQ ID NO: 296)
PRD-1301	GVSDVPRDLEV VAATPTGLLIS WDAPRGLARYY EITYGKGGGMS PVQEFTVPG TTATISGLKPG	GVSDVPRDLEV AAATPTGLLISW APRGLARYKRT YGETGGNSPVQE FVVEGRGTTATI SGLKPGVDTYTIT	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	KTMTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPK EDTLMISRTPEV CVVVDVSHEDFEV KFIWYVDGVEVHII AKTPKPREHQIN	GGCGTGGAGGCGCTGCGCCCG GGTCTAGAAGCTGGCTGCG CTACCCCCACAGGCTTGCTG ATCACGCTGGGACGCTGGAG AGGTCTGGCTCGATATTAC GCATCACTTAACGGGAAACAA

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Enlazador	Secuencia	
				Dominio C-terminal	Secuencia de ácido nucleico
	VDTTTTVYAVT IDRDGTRSPDP ISIINYRTEIEP K3CDKTHICPP CPAPELLGGPS VFLFPPPKPKDT LMISRTPPEVTC VVVVDVCHEDPE VVFNRYWVDGVE VHUAKTEPREE QYNGTYRVVGV LTVLHQWLLNG KEYKCKVSNKA LPAPTEKTIK AKGQPREPQVY TLPSPRDELTK NOVGLTCLVRC FYPSEDIAVEWR BNGQPERNNYKT TPFPVLDGCGDF FLYSRKLTVDKS RWQQGNFSCS VMHRAHLHNHYT QKSLSLGPCK (SEQ ID NO: 265)	VYAVTIDRDGTR SFDPISIINYRTE I (SEQ ID NO: 277)		YRVVSVLTVLHQD WNGKREYKNCVBN KALPAPIERTIEN AKGQPREPQVYTL PRSRDELTKNQVS LTC1VKGFYPSDI AVENEGNGQPERIN YKTTTPPVLDSDGE FFFLYSRKLTVDRSR WQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLG LSRGN (SEQ ID NO: 263)	GGAGGCCAATAGGCCCTGGTCCA GGAGTTCACTGTTGGTCCGGTC GTGGTACACAGCTTACCATC AGCISGCTTAAACCTGCGGT TGATTATAACCATCACTGTGT ATGCTGTCACATATGACCC GACGCTAACCCCGAGCTTCGA CCCAATTTCATTAAATTGCC GGACCCGAAATTGAGCTTARG AGCTCCGACAAAACCCACAC ATSCCCACCTTGTCAGCCC CGAAGCTGCTGGGCGGCCCT TCAGTCTTCCTCTTCCCTCC AAAACCCCAAGGACACCTCA TGATCTCCGGACCCCTGAG GTCACATGGCTGGTGGTCCA CGTGAACCCACGAAGACCCCTG AGGTCAGTTCAACTGGTAC GTGCAACGGCTGGAGCTTGC TAATGCGAAGACAAKRCGGC GGGAGGGCAGTACAACAGC ACGTAACCTCTGCTCACCC CCTCAACCGTCTGCAACAGG ACTGCTGTAATGGCAACGGAG TACAAGTCCAAGGTCTCCAA CRAAGCCCTCCAGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCAA GCCAAMGGCAGCTCCGAGA ACCACAGGTGTACACCTG CCCCATCCCGGGATGAGCTG ACCRAGAAGCAGGTCAAGCCT GACCTGCTGGTCAAGGGCT TCTATCCCAGGGCACATGCC GIVGMASTGGGAGAGKDAITGG GCGAGGCGAGAACAGTACA AGACCAACCCCTCCCGTGTG GACTCGACGGCTCTCTCTT CTCTACAGCAAGGTCACCG TGGAKTRAGAGCAGGTGGCAG CAGGGAAACGTCTTCATG CTCGCTGATGCAATGAGGCTC TGCACAAACCACTACACCCAG AAGAGCCTCTCCCTCTCTCC CGGGAAA (SEQ ID NO: 297)
PRD-1302	GVSDVPRDLEV VRAPTTELLIS WDAPAGLARYY RITYGRTGGHS PVQEFTVVGRG NTATISSELRPG VDTTTTVYAVT IFRDGPVTRDF ISIINYRTEIEP K3CDKTHICPP CPAPELLGGPS VFLFPPPKPKDT LMISRTPPEVTC VVVVDVCHEDPE VVFNRYWVDGVE VHUAKTEPREE QYNGTYRVVGV	GVSDVPRDLEV AATPTTELLISWD WDAPAGLARYY RITYGRTGGHS PVQEFTVVGRG NTATISSELRPG VDTTTTVYAVT IFRDGPVTRDF ISIINYRTEIEP K3CDKTHICPP CPAPELLGGPS VFLFPPPKPKDT LMISRTPPEVTC VVVVDVCHEDPE VVFNRYWVDGVE VHUAKTEPREE QYNGTYRVVGV	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	KTHTCPCCPAPEL LGGPSVFLFPPPKP KDTLMISRTPEV CVVVDVSHEDPEV KFTWVYDGVENVH AKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQD WNGKREYKNCVBN KALPAPIERTIEN AKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVS LTC1VKGFYPSDI AVENEGNGQPERIN YKTTTPPVLDSDGE FFFLYSRKLTVDRSR WQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLG	GGGGTGAGCCGAGCTGGCCCG GGATCTAGAAGTGGTGGCTG TCACCCGACAGCTTGGCTG ATCAGCTGGGACGCTCCGGC TGGTCTGGCTCGATATTAC GCACTACTAACGGGCAACAA GGAGGCAATAGGCCCTGGCA GGAGTTCACTGTTGGTCCGG GTGGTACACAGCTTACCATC AGCAGGCTTAAACCTGCGGT TGATTATAACCATCACTGTGT ATGCTGTCACATATGACCC GACGGTCCGGTCACTTGGGA CCCAATTTCATTAAATTGCC GGACCCGAAATTGAGCTTARG AGCTCCGACAAAACCCACAC ATSCCCACCTTGTCAGCCC

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Enlazador	Secuencia	
					Secuencia de ácido nucleico
	LTVLHQDRLIG KEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISK AKGQPREFQVY TLPGRDELTK HQVGLTCLVKG FYPDSIAVENE SNGQPERNYKT TPPVLDSDGCF FLYSKLTVDKSR WQQGNVFCGCS VMREALHNHYT QKSLGLSPGK (SEQ ID NO: 266)			LSPEK (SEQ ID NO: 283)	CCGACTGCTGGGCGCGCCCT TCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAAGGACACCCCTCA TGATCTCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGG CGTGAACCCACCGAAGGACCTG AGGTCAAGTTAACACGGTAC SISGACGGCTGGAGGTTGCA TAATGCCAAGCAAGACGCC GGGAGGAGCACTACACAGC ACGTAACCGTGTGGTCAAGCGT CCTAACCGTCCTGACCCAGG ACTGGCTGAATGGCAGGAG TACAAGTCCAAGGGTCTCCAA CAAGGCGCTCCAGGCCCCA TGGAGAAGACCATTTTCCAA GCCAAAGCGCAGCCCCAGA ACCNACGGTGTACACCCCTGC CCCGCTCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCGAGTGAACGCT GACCTGCCTGGTCAAGGGCT TCTATCCACGGACATGCC GTGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGGCGGAGAACAACTACA AGACCAAGGCTCCCGCTT GACTCUGACGGCTCCCTTCTT CCTCTACAGCAAGGCTCACCG TGGACAAAGAGCAGGTTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAAACCACTACACCCAG AAGGCGCTCCTCCCTGCTCC CGGGGAA (SEQ ID NO: 298)
PRD-1303	GVSDVPRGLEV VKATPTTLLIS WDAPKGLARYT RITYGETGGRS PVQRFITVVGRC NTATISGLRPC VDYITIVYAVT IFRDGPVTRDP ISIUYRTHEIEP KCSDDKTHTCPF CPAPELGGPS VFLPEPKPKDT LMISRTPEVTC VVVVDVSEHSDPE VKEFINYVDDGVE VHIAKTEPKRDEE QYNE TYRIVVSV LTVLHQDRLIG KEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISK AKGQPREFQVY TLPGRDELTK HQVGLTCLVKG FYPDSIAVENE SNGQPERNYKT TPPVLDSDGCF FLYSKLTVDKSR WQQGNVFCGCS	GVSDVPRGLEV VKATPTTLLISWD APKGLARYTIRIT YGETGGNSPVQE FTIVVG&GTATI SGLEPGVDTIT VYAVTIPRDGPV TWDPISTINYRTE I (SEQ ID NO: 279)	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	KTHTCPPCPAPEL LGGP2VFLFPPPKP KDTLMISRTPEV CVVVDVSHEDPEV KFINNVDGVEVHN AKTKPREEQYNT YRVV3VLTVLRQ WLNKREYKCEVSN KALPAPIEKTIISK AKGQPREFQVYTL PPCRDELTKHQS LTCLVKGFPSPDI AVENEGNGQPEVN YKETTPPVLDSDG FLYSKLTVDKSR WQQGNVFCGCS EALHNHYTQKSL LSPEK (SEQ ID NO: 283)	GGCGTGAGCGACGTCGCCCCG GGATCTAGAAGTGGTGGCTG CTACCCCCACAAGCTTGTG ATCAGCTGGACCGCTCCGA GGGTCTGGCTCGATATTAC GCATCACTTACGGCAAAAC GGAGGCAATAGCCCTGICCA GGAGTTCACTGTGGTCGGTC GIGGTAAACACAGCTACCATC ACCGCGCTTAAACCTGCGT TGATTATACCATCACTGTT ATGCTGTCACTATCTCGT GACGCGTCCCGTCACCTGG CCGACATTTCCTTAATTTC GGACCGAAATTGAGGCTAAG AGCTCCGACAAACCCACAC ATGCCACACCTGTCACAGCG CCGACTGCTGGGCGGCCCT TCAGCTTCTCTTCCTCC AAAACCCAAAGGACACCCCTCA TGATCTCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGG CGTGAACCCACCGAAGCCCTG AGGTCAAGTTCAACTGCTAC SISGACGGCTGGAGGTTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCCG GGGAGGAGCACTACACAGC ACGTACGGTGTGGTCAAGCGT

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Enlazador	Secuencia	
				Dominio C-terminal	Secuencia de ácido nucleico
	VMHEALHNHYT QKSLGLSPGK (SEQ ID NO: 267)				CCTCACUGTCCCTGCAACCAGG ACTGGCTGATGGCAAGGAGTCCAA TACAAGTCCAAGGTTCTCAA CAAAGCCCTCCCAAGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCGAAA GTCRAGGGCAGCCCCAGAGA ACCACAGGTGTACACCTCTGC CCCGATCCCAGGATGACCTG ACCGAAACCCAGGTCAAGCCT GACCTGCTGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAATGGGAGAGCACTGG GCACCCCGGAGAACAACTACAA AGACCAAGGCTCCGTGTTG GACTCCGACGGCTCTTCTT CCCTACAGCAAGCTCACCG TGGACAAAGGCAAGGCGAG CAGGGGAACGTCTTCTGATG CTCCGTGATGCATGAGCCTC TGCACAAACACTACACCCAG AASAGGCTCTCCCTGCTCC CGGGAAA (SEQ ID NO: 298)
PRD-1304	GVSDVPROLEV VAATPTSELLIS WELPNPGNARY YRITYGETGCM GPVQEPFTVPGN GVTATISGLKPK GVDYTITVYAV TVTDTGFIYTR PISIMYRTRNE PKSSDNTHTCP PCPAPELLGGP SVFLEPPPKPD TLMICRTPEVI CVVVDV3HEDP EVKFNWVYDGV EVINNAKTRFRE EQYINSTYRVVS VLTVLRQDWLN GKEYKCRVSNK ALFAPPIERTIS KAKSQPNRSPQV YTLPPPERDELT KNUQVELTOLVK GFYIPGDIAREW ECSNGQPNENYF TTPPVLDSDG3 FFLYGKLTIVDE SRWQZGPVFCG CVNHEALHNHY TQKSLGLSPGK (SEQ ID NO: 268)	GVSDVPROLEV AAATPTSELLISWS LPIPGNARYTRI TYGETGGGNSPVQ EFTVPGRCVTAT KSLGLKPGVQYTI TVYAVTVTDTGF ITYMPISINVRT SI (SEQ ID NO: 280)	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	KTSTCOPPCPAPEL LSCPSVFLFPPPKP RDTLMICRTPEVI CVVVDV3HEDP KFNYYVDPGEVRM AKTKEPREEQYIUST YRNVSVLTVLRQD WLNQKEYNCNVSN KALFAPPIERTISK AKGQPPEPQVYTL PFSRDELTKNQVC LTCLVKGSPYPSDI AVENEGNGQPERIN YKTTPPFVLU3DGG FFLYX8LTVDNER WQQGIVF3CSVPH EALHNHYTQKSLSI LSPGK (SEQ ID NO: 268)	GGCGTGAGGAGACGGTGCOCGG GGATCTAGAAGTSGIGGCTG CTACCCCGACAAGCTTCTG ATCAGCTCGTCTCCCGAA TCCGGGTAAACGCCCCATTATT ACCGCATCACTTACGGGAA ACAGGAGGCAATAAGCCCTCT CCAGGAGCTCACTGIGGCTG GTCGGTGTACAGGCTACC ATCAGGGGCTTAACCTGG CGTTCGTTATACCATCTCTG TGIAIGTGTCACTGTTACT GACACAGGTTCACTCACCTA CARACCAATTTCATTARTT ACCGGACCGPAAATTGACCT AAGAGCTCCGACAAACCCA CACATGCCACCTGTCAG CCCCGAACTGCTGNGGGGC CCTTCAGTCCTCTCTTICCC CCCCAAAACCCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGACCCCT GAGGTCACATGGGGTGGTGT GGACCTGAGGCCACAGACCC CTGAGGCTCAAGTTCACTGG TACGGGACGGGGTGGTGGTGT GCATAATCCAAGACAAAGC CCGCGGGAGGGAGCAGIACAAAC AGCAAGTACCGCTGTGGTCAG CGTCTTCACCGTCTGCAAC AGGACCTGGCTGAAAGCAG GAGTACAAGTGCAGAGGTC CAACACAGGCTCCACGGCC CCATCGAGRAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAAGCCCC AGAACACAGGTSTACACCC TGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAARGAACCAAGCTCAG CCTGACCTGGCTGGTCAAG GCTTCATCTCCAGGGACATC

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
			Secuencia		
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Enlazador	Dominio C-terminal	Secuencia de ácido nucleico
					GGCGTGGAGTGGGAGAGCGA TGGGAGGCCGGAGACAACT ACAAGACACACGCCCTCCCGTG TTGGACTCGACGGGTTCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAGAGAGCAGCTGG CAGCAGGGGAACGTTCTCTC AATCTCGTGTATGCAATGAGG CTCTGACACACCACTACACCG CAGAGAGCCTCTCCCTGTC TCCCGGAAA (SEQ ID NO: 300)
PRD-1305	GVSDVPRDLEVV VAATPTSLIS WELPHQKRNAY YRITYGETGGH GKVQEFITVPGK GVTATISGLKP GVYDEIUTVYV TVTDTGYLRYK FISINYRTEIE PKGSQNTHTCP FCPAPAEELLGGP SVFLFPPPKKD ELMI GREPEV CVVVDV3HROP EVKFINWYVDGV EVHNAKTEKPRE EQYINSTYRUV VLTIVLHQDWLN GKEYRCKVSNK ALFAPAPIEKTIS KAKGQPRHESFQV YTLPPECRDLYT KNUQVELTCLVK GFYPCDIAREW ESNGQPENNYK TTPPVLDSDGS FFLYGKLTIVDR SEWQQGNVFSC SVNHEALRNHY TQKCLSLSPGR (SEQ ID NO: 269)	GVSDVPRDLEVV AATPTSLIS LPHQHANAYTRI TVGETGGNSPVQ EFTVPGRGVTAT ISGLKPVGVOYTI TVYAVTVDTGY LKYKPIISINYRT EI (SEQ ID NO: 281)	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	TTTTCPPCPAPRPL LGPGPVPFLPPPKP KDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEV KFNNYVDGVEVHN AKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLNQD WINGREYKCKVSN KALFAPIEKTISK ANGQPREFQVYTL FPPERDELTKHQVS LYCLVKGKFYPGDI AVWESNGQOPENU YKTIFFVLDSDGS FFLYGKLTVDKSR WQQMVFSCEVNR RAI:HUHTQESLS LSPGE (SEQ ID NO: 283)	GGCGTGGAGCAGCTGCCCCG GGAICTAGAAGTGGGGCTG CTACCCCCACAACCTCTG ATCAGCTGGTCTCTGGCGCA CCAAAGGTAAAGCCAAATTATT ACCGCATCACTTACGGGAA ACAGGAGGCAATAGCCCTGT CCAGGGACTTCACTGCGCTG GTCGTCGTGTACGCTTACCC ATCAGCCGGCTTAAACCTGG CGTTGTTATACCATCACTG TGTATGCTGTCACTGTTACT GATACAGGGTACCTCAAGTA CAAACCAATTTCCTTAATT ACCGGACCGAAATTGACCC ARGAGCTCGGACAAACCCA CACATGCCACCTTGTCCAG CCCCCAAACTGCTGGGGCC CCTTCAGCTTCCCTCTTCCC CCCCAAACCCAGGACACCC TCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTACATGGCTGGTGGT GGAGGTGAGCCACGGACCC CTGAGGTCAGTTCACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATBATGCCAAGACAAAGC CCGGGGAGGGACAGAACAC AGCACCTACCGTGTGGTCAG CGTCTCACCCTCTGGCACC AGGACTGCTGAATGCCAAG GAGTACAAGTGCAGAGGTCT CAGACAGCCCTCCCAAGCC CCATCGAGRAAACCATCTCC AAACCCAAACGGGAGCCCCG AGAACCCACAGGTGTACCCCC TGCCCCATCCGGGGATGAG CTGACCAAGAACAGGTCTAG CCTGACCTGGCTTGGTCAG GCTTCTCTTCCCAAGGCGACCTC GCCGTGGAGTGGGAGAGCRA TGGCAACUGGAGAACBACT ACAAGACACACGCCCTCCCGTG TTGGACTCGACGGGTTCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAGAGCAGCTGG CAGCAGGGGAACGTTCTCTC AATCTCGTGTATGCAATGAGG CTCTGACACACCACTACACCG CAGAGAGCCTCTCCCTGTC TCCCGGAAA (SEQ ID NO: 301)

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Enlazador	Secuencia	
					Secuencia de ácido nucleico
PRD-1471	DQTHTCPPCPA PEIAGGGSVFL FPPPKPDKTLM GRTPEVICVV DVSHEDPEVKEF WVYDGVENIRN AKTKPREEQYH STYEVVSVLTV LHQDGLGSRDV KCKVSNKALPA PIEKTISAKG QPEEPQVYTLF PSRDELYKNQV CLTCLVKSFYP SDIAVEXEING QPEINMYRTIIP VLQSDGSEFFLY SKLTVDKSFBNQ QGNVEGCSVMH ERLKHHTYIQNS LSLSEPELQLEE SAAEAQEGELE GVGDVPRDLEV VRAATPTBLLIS WTLPHAGRAY YRITYGRTGGN SPVQEEITVPG GVATATISLKP GVDYTTIVYAV TVTTTRVIHYK PISIUYRTEX (SEQ ID NO: 270)	DETHTCPPCPA EALGGGSVFLFP PKPKDILMISRT PEVTCVVVDVSH EDPEVNRNIVD GVEVHMAKTKPR EEQYINSETYRVS VLTVLHQDWLNG KEYRKCKVSUKAL PAPIEKTISAKK GQPREPQVYTLF PSRDELYKNQV LTCLVKGFPYSD IAVEWBSNGQPE MUYKTTPPVLD DGSEFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFS CGVMHEAKLBH TQK5L5LSP (SEQ ID NO: 276)	ELQLEEDAA EAQEGELE (SEQ ID NO: 187)	GVDVPRDLEV ATPTCLLISWTLP HAGRANYYRITYG ETGGNCPYQEFITV PGRGVITATISGLK PCVDVTTIVYAVT VTTKVIHYKPIIS INVRTEI (SEQ ID NO: 275)	GAGAAGACCTGAG ACCGTCCGAGCAGCT TCCTGCGGGGACCGTC TTCCTCTTCCCCCA CAAGGACACCCCT CCGGGAAACCTGAG TCCGTGGTGGTGG CCACGAGACCCCT AGTTCAACTGGTAC GGCCTGGGGTGCATA CAAGACAAAGCC AGCAGTACACAGC CGTGTGGTACGGC CGTGTGACCCAGG TGAATGCGAGGAG TGCAASGTCCTCA CCCTGAGGCCCCAT AAACCATCTCCA GGGCAGGCCCCGAG GGTGTACACCCCT CCCGGGATGAGCT AACAGGTCAGGCT CCTGGTCAAAGGCT CCAGGACATCGC TGGGAGAGCAAT GGAGAACAACTAC CGCTCCCCCTGCT GACGGCTCTCTCT CAGCAAGCTCAC AGAGDAGGTGGC AACGTCITCTC GATGCACTGAGGCT ACCACTACCGC CTCTCCCTGCT GCAGCTGGAGGA CTGAGGCTCAGG CTGSAAGCGCTGAG GCCACCATCAGT GCCAGGACTGG TTACCGTGTAC GTGACCCACACT CCACTACRA TTAATTATCGG (SEQ ID NO: 302)

(continuación)

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Secuencia		
			Enlazador	Dominio C-terminal	Secuencia de ácido nucleico
	PIEKTICKANG QPREFPQVYTLF PSRDELTRNQVS GLTCLVKGVYP SQTIAVEWEISNG QPENNYKTTFFF VLDSDGFFFLY SKLTVDKGRWQ QGVVFSCSYMH EALHNHYTQKG LSLSPELQLEE SAAEAQEGELE GVEDVPRHLLEV VRAPTPLLIG NDAPFKGLAVY RITYGETGGRS PVQEFTVVGRG NTATISSLRPG VDYTTITVYAVT IFRDGPVTRDF ISINYRTEI (SEQ ID NO: 272)	GQPREPQVXTLFF PSRDELTRNQVS LTCLVKGVYP IAVEWEISNGQPE INNYKTTPPVLDG DGSEFFLYSRLTV DESEWQQGNVFS CSVMHEALHNHY TQKSLSLSP (SEQ ID NO: 276)			CAAGACARAGCCGCGCGAGG AGCAGTACAACAGCACCGTAC CGTGTGTCAGCGTCTTCAC CGTCTCTGACCCAGGACTGGC TGRATGGCAAGGAGTACAGAG TCCAACTGCTCCACAAACCC CCTCCAGGCCCCATCGAGA AAACCACTCTCCAAAGGCGA GGCGAGCCCCGAGAGCGACA GGTGTACACCCCTGGCCCCAT CCCGGGATGAGCTGACCGAG ACCGAGCTAGGCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTCTATC CCAGCGACATCGCCCTGGAG TGGGAGAGCACTGGCGAGC GGAGAACACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCTCTCTCCCTCTA CAGCAGACTACCGCTGACCA AGACCGGTGCGACAGAGGG AACGTCTTCATGCTCGT GATGATGAGCTCTGACACA ACCACTACACGCAAGAAGAC CTCTCCCTGCTCCCGAGCT CCAGCTGGAGGAAGGCCCG CTGAGGCTCAGGAGGAGAA CTGGAGGGCTGAGGCGACGT GCCACGGATCTAGAACTGG TGGCTCTACCCCCAACAGC TTGCTGATCAGCTGGGACCG TCCGAGGGCTGCTGGCTCGAT ATTACCGCATCACTTACGGC GAAPAGGGCAATAGCCCG TTCGCTGGAGGTTCTGCTG TCGGCTGCTGCTAACACAGCT ACCATCAGGGCTTAAACC TGGGGITGAATTAAACCTCA CTGKGATGCTGTCACIATC TTCGGTGACGGTCCTGKAC CTGGGACCCAATTCCATTAA ATTACCGGACCGAATT (SEQ ID NO: 384)
PRD-1474	DKTHTCPPCPA PELGGPSPVPL PPPCKPKDTLMI SETPEVTCVVV GVSHEDEPVERF WVYVDGVENHII AKTKPFRREEDQY STYRVVGVLT LHQDWLNGKEY KCKVSVKALPA PIEKTICKANG QPREFPQVYTLF PSRDELTRNQVS GLTCLVKGVYP SQTIAVEWEISNG QPENNYKTTFFF VLDSDGFFFLY SKLTVDKGRWQ QGVVFSCSYMH EALHNHYTQKG	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSPVPLFP PKPKDTLMI SETPEVTCVVV GVSHEDEPVERF WVYVDGVENHII AKTKPFRREEDQY STYRVVGVLT LHQDWLNGKEY KCKVSVKALPA PIEKTICKANG QPREFPQVYTLF PSRDELTRNQVS GLTCLVKGVYP SQTIAVEWEISNG QPENNYKTTFFF VLDSDGFFFLY SKLTVDKGRWQ QGVVFSCSYMH EALHNHYTQKG	ELQLEESAA (SEQ ID NO: 187)	GVGDVPRDLEVVA ATPTSLIISW3LP RQGKANYRITYG ETGGNSPVQEFTV PGRCVTATISGLK PGVDTITVYAVT VTDITGYLKNYKPI ISINYRTEI (SEQ ID NO: 281)	GACAAACCTCACAATGCC ACCGTCCCCAGCACCTGAAAC TCCCTGGGGGACCGTCAGTC TCCCTCTCCCTCCACAAACCC CAAGGACACCTCTAGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCACA TGGGTGTTGGTGGACCTGAG CCACGAAACACCTCTAGGCTCA ACTTCACCTGGTACGGTGGAC GGGGTGGAGGTGCAAAATGC CAAGACARAGCCGCGCGAGG AGCAGTACAACAGCACCGTAC CGTGTGTCAGCGTCTTCAC CGTCTCTGACCCAGGACTGGC TGRATGGCAAGGAGTACAGAG TCCAACTGCTCCACAAACCC CCTCCAGGCCCCATCGAGA AAACCACTCTCCAAAGGCGA GGCGAGCCCCGAGAGACACA GGTGTACACCCCTGGCCCCAT

(continuación)

Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc					
Clon	Secuencia de aminoácidos	Dominio N-terminal	Secuencia		
			Enlazador	Dominio C-terminal	Secuencia de ácido nucleico
	KSLGEGLQAKR SAAKAQGCELE GVSDVPRDLV YAAATTSLLIS WALPHQKANAY YPITYGEEDCN SEVQSEFTIVEGR GVATATISGLKP GVDYTTIVYAV TVTDGTYLKYK FISINYPTSI (SEQ ID NO: 273)	276)			CCTGGGATGAGCTGAGCCAAAG AACCAGGCAACCCCTGAACTG GCTGGTCAAGGCTCTCTATC CGACGGACATCCGCTCTGGAG TGGGAGACAAATGGCCAGCC CGACAAACAACTACAAAGACCA CGCCCTCCCGTGCTGGGACTCC GACCGCTCTCTCTCTCTCTCT CAGGAAAGCTCACCGCTGACAA AGACGACGGTGGCAGCGAGGG AACCGCTTCTTCANACTCCGT CATAGCAAGGCTCTCTGCTACA ACCACTACACCGAGAACAGCC CTCTCCCTGTCCTCCGGAGCT GAGAGCTGAGGAAAGGCG CTGAAAGCCGGTGAGCGAGCT GTCACCGGATCTAGAATGG TGGCTGGT&CCGGTACAG&G TTGCTGATCAGCTGGTCTCT GCCGACCAAGGTAAGGCA ATTATTACGGCTATGATAC GGCGSARACAGGAGGAAATAG GCTCTCCGAGGAGTTACTG TGCTCTGTOGTTGGGTTACG GCTTACCATCTGCGGCTTAA ACCTGGCTTGATTATACCA TCACCTGTTATGGCTGCACT GTTACCTGCT&CAAGGTTACCT CAAGTACACGACCGATTTCGA TTAATTACCCGACCGAAATT (SEQ ID NO: 305)

Las SEQ ID NO de las secuencias ilustrativas líder (extensión N-terminal) y cola C-terminal se presentan en la Tabla 7.

5

Tabla 7

Resumen de secuencias ilustrativas			
SEQ ID NO	Descripción	Nombre	Secuencia
306	Líder ilustrativo	AdNT1	MGVSDVPRDL
307	Líder ilustrativo	AdNT2	GVSDVPRDL
308	Líder ilustrativo	AdNT3	VSDVPRDL
309	Líder ilustrativo	AdNT4	SDVPRDL
310	Líder ilustrativo	AdNT5	DVPRDL
311	Líder ilustrativo	AdNT6	VPRDL
312	Líder ilustrativo	AdNT7	PRDL
---	Líder ilustrativo	AdNT8	RDL
---	Líder ilustrativo	AdNT9	DL
211	Cola ilustrativa	AdCT1	EIDKPSQ
---	Cola ilustrativa	AdCT2	EI
313	Cola ilustrativa	AdCT3	EIEPKSS
314	Cola ilustrativa	AdCT4	EIDKPC
315	Cola ilustrativa	AdCT5	EIDKP
316	Cola ilustrativa	AdCT6	EIDK
317	Cola ilustrativa	AdCT7	EIDKPS
318	Cola ilustrativa	AdCT8	EIEKPSQ
319	Cola ilustrativa	AdCT9	EIDKPSQLE
320	Cola ilustrativa	AdCT10	EIEDEDEDEDED

(continuación)

Resumen de secuencias ilustrativas			
SEQ ID NO	Descripción	Nombre	Secuencia
321	Cola ilustrativa	AdCT11	EGSGS
322	Cola ilustrativa	AdCT12	EIDKPCQ
189	Cola ilustrativa	AdCT13	GSGC
323	Cola ilustrativa	AdCT14	EGSGC
324	Cola ilustrativa	AdCT15	EIDKPCQLE
325	Cola ilustrativa	AdCT16	EIDKPSQHHHHHH
326	Cola ilustrativa	AdCT17	GSGCHHHHHHH
327	Cola ilustrativa	AdCT18	EGSGCHHHHHHH
328	Etiqueta	T1	HHHHHH

#### IV. Tecnología de fusión de ácido nucleico y proteína

- 5 En un aspecto, la invención proporciona una Adnectina que comprende dominios de fibronectina tipo III que se une a miostatina como se define en las reivindicaciones. Una forma de crear y probar rápidamente dominios Fn3 con propiedades de unión específicas es la tecnología de fusión de ácido nucleico y proteína de Adnexus, una empresa de investigación y desarrollo de Bristol-Myers Squibb. Esta divulgación utiliza la tecnología de expresión y etiquetado *in vitro*, denominada 'PROfusion' que explota fusiones de ácido nucleico y proteínas (fusiones de ARN y ADN-proteínas) para identificar nuevos polipéptidos y motivos de aminoácidos que son importantes para la unión a proteínas. La tecnología de fusión de ácido nucleico y proteína es una tecnología que acopla covalentemente una proteína a su información genética codificante. Para obtener una descripción detallada de la tecnología de fusión de ARN-proteína y los métodos de detección de bibliotecas de proteínas de andamio basadas en fibronectina véanse Szostak *et al.*, Pat. de EE.UU. N.º 6.258.558, 6.261.804, 6.214.553, 6.281.344, 6.207.446, 6.518.018 y 6.818.418; 10 Roberts *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 1997;94:12297-12302; y Kurz *et al.*, Molecules, 2000;5:1259-64.
- 15

#### V. Vectores y polinucleótidos

- 20 Los ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las diversas proteínas o polipéptidos descritos en el presente documento pueden sintetizarse químicamente. El uso de codones puede seleccionarse para mejorar la expresión en una célula. Dicho uso de codones dependerá del tipo celular seleccionado. 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 y células de insecto. Véanse, por ejemplo: Mayfield *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(2):438-442 (21 de enero de 2003); Sinclair *et al.*, Protein Expr. Purif., 26(1):96-105 (octubre de 2002); Connell, N.D., Curr. Opin. 25 Biotechnol., 12(5):446-449 (octubre de 2001); Makrides *et al.*, Microbiol. Rev., 60(3):512-538 (septiembre de 1996); y Sharp *et al.*, Yeast, 7(7):657-678 (octubre de 1991).

30 Las técnicas generales para la manipulación de ácidos nucleicos se describen en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>da</sup> edición, Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) o Ausubel, F. *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York (1987) y actualizaciones periódicas. Generalmente, el ADN que codifica el polipéptido está unido operativamente a elementos reguladores de la traducción o transcripción adecuados procedentes de genes de mamíferos, víricos o de insectos. Dichos elementos reguladores incluyen un promotor de la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitio de unión al ribosoma de ARNm adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. La capacidad de replicarse en un hospedador, habitualmente conferido por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes, se incorporan adicionalmente.

35 40 Las proteínas descritas en el presente documento pueden producirse de forma recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia de señalización u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o el polipéptido maduros. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que la célula hospedadora reconoce y procesa (es decir, escinde mediante una peptidasa de señal). Una secuencia líder N-terminal ilustrativa para la producción de polipéptidos en un sistema de mamíferos es: METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 177), que es eliminado por la célula hospedadora después de la expresión.

45 50 Para células hospedadoras procariotas que no reconocen ni procesan una secuencia señal nativa, la secuencia señal se reemplaza por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de los líderes de fosfatasa alcalina, penicilinasa, 1 pp o enterotoxina II termoestable.

Para células hospedadoras procariotas que no reconocen ni procesan una secuencia señal nativa, la secuencia señal se reemplaza por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de los líderes de fosfatasa alcalina, penicilinasa, 1 pp o enterotoxina II termoestable.

50 Para la secreción de levaduras la secuencia señal nativa puede sustituirse por, por ejemplo, un líder de invertasa de levadura, un líder de factor (incluyendo líderes de factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o un líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans* o la secuencia señal descrita en la Pat. de EE.UU. N.º

5.631.144. En la expresión en células de mamífero, están disponibles las secuencias señal de mamíferos así como líderes secretores víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN de dichas regiones precursoras puede ligarse en el marco de lectura a ADN que codifica la proteína.

- 5 Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Generalmente, en los vectores de clonación esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del hospedador e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para una diversidad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gramnegativas, el origen del plásmido de 2 micrómetros es adecuado para levaduras y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamíferos. Generalmente, el componente del origen de la replicación no es necesario para vectores de expresión de mamíferos (el origen de SV40 puede usarse normalmente solo porque contiene el promotor temprano).
- 10 15 Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección normales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o traciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa de bacilos.
- 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y está unido operativamente al ácido nucleico que codifica la proteína de la invención, por ejemplo, una proteína de andamio basada en fibronectina. Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor PhoA, sistemas promotores de beta-lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor tan. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica la proteína de la invención. Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases en dirección 5' del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases en dirección 5' del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas es una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.
- 35 Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores de la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceroldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.
- 40 La transcripción a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero puede estar controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus del polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y más preferentemente virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.
- 45 50 55 La transcripción de un ADN que codifica la proteína de la invención por eucariotas superiores a menudo se incrementa al insertar una secuencia potenciadora en el vector. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador del polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede sufrir corte y empalme en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante del péptido, pero preferentemente se localiza en un sitio 5' del promotor.
- 60 65 Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (por ejemplo, células de levadura, de hongo, de insecto, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles a partir de las regiones 5' y, ocasionalmente 3', no traducidas de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida de ARNm que codifica la proteína desvelada en el presente documento. Un componente útil de terminación de la transcripción es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO 94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.
- 65 El ADN recombinante también puede incluir cualquier tipo de secuencia de marcador proteico que pueda ser útil para

purificar la proteína. Los ejemplos de etiquetas de proteínas incluyen, pero no se limitan a, una etiqueta de histidina, una etiqueta FLAG, una etiqueta myc, una etiqueta HA o una etiqueta GST. Los vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y mamíferos pueden encontrarse en Cloning Vectors: A Laboratory Manual, (Elsevier, Nueva York (1985)).

5 La construcción de expresión se introduce en la célula hospedadora usando un método adecuado para la célula hospedadora, como resultará evidente para un experto en la materia. Se conocen en la técnica diversos métodos para introducir ácidos nucleicos en células hospedadoras, incluyendo, pero no limitado a, electroporación; transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo de 10 microproyectiles; lipofeción; e infección (donde el vector es un agente infeccioso).

15 Las células hospedadoras adecuadas incluyen células procariotas, de levadura, de mamíferos o bacterianas. Las bacterias adecuadas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, 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 pueden emplearse diversos sistemas de cultivo de células de mamífero o insecto para expresar proteínas recombinantes. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos son revisados por Luckow *et al.* (Bio/Technology, 6:47 (1988)). Los ejemplos de líneas celulares 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 embrionario humano, HeLa, líneas celulares 293, 20 293T y BHK. Los polipéptidos purificados se preparan cultivando sistemas de hospedador/vector adecuados para expresar las proteínas recombinantes. Para muchas aplicaciones, el pequeño tamaño de muchos de los polipéptidos desvelados en el presente documento haría la expresión en *E. coli* el método preferido de expresión. Después, la proteína se purifica a partir de medios de cultivo o extractos celulares.

25 **VI. Producción de proteínas**

30 La presente invención también se dirige a líneas celulares que expresan una Adnectina antimiotatina o un polipéptido de fusión de la misma. La creación y el aislamiento de líneas celulares que producen una Adnectina antimiotatina pueden lograrse usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como aquellos descritos en el presente documento.

35 Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos en el presente documento para la producción de proteínas y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. En los ejemplos que se muestran aquí, las células hospedadoras usadas para la producción de proteínas de alto rendimiento (HTPP) y la producción a mediana escala fueron las de la cepa bacteriana HMS174.

40 Las Adnectinas de la presente invención también pueden obtenerse en forma aglicosilada produciendo las Adnectinas en, por ejemplo, células procariotas (por ejemplo, *E. coli*). De manera notable, las formas aglicosiladas de las Adnectinas de la invención exhiben la misma afinidad, potencia y mecanismo de acción que las Adnectinas glucosiladas cuando se prueban *in vitro*.

45 Las células hospedadoras usadas para producir las proteínas de la presente invención pueden cultivarse en diversos medios. Los medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), Medio mínimo esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, muchos de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enzymol., 58:44 (1979), Barites *et al.*, Anal. Biochem., 102:255 (1980), Pat. de EE.UU. N.º 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655, 5.122.469, 6.048.728, 5.672.502 o la Pat. de EE.UU. N.º RE 30.985 pueden usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco gentamicina), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro suplemento necesario en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son aquellas usadas anteriormente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión y serán evidentes para el experto en la materia.

55 60 Las proteínas desveladas en el presente documento también pueden producirse usando sistemas de traducción celular. Para dichos fines, los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido deben modificarse para permitir transcripción *in vitro* para producir ARNm y permitir la traducción sin células del ARNm en el sistema sin células particular que se está usando (eucariotas tales como un sistema de traducción sin células de mamíferos o levadura o procariotas tales como un sistema de traducción sin células bacterianas).

65 66 Las proteínas de la invención también pueden producirse mediante síntesis química (por ejemplo, mediante los métodos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, 2<sup>a</sup> edición, The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1984)).

También pueden producirse modificaciones de la proteína mediante síntesis química.

Las proteínas de la presente invención pueden purificarse mediante métodos de aislamiento/purificación de proteínas conocidas en general en el campo de la química de proteínas. Los ejemplos no limitantes incluyen extracción, recristalización, precipitación por adición de sales (por ejemplo, con sulfato de amonio o sulfato sódico), 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, los polipéptidos pueden intercambiarse en diferentes tampones y/o concentrarse mediante cualquiera de diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, filtración y diálisis.

El polipéptido purificado es preferentemente al menos un 85 % puro, o preferentemente al menos un 95 % puro, y lo más preferentemente al menos un 98 % puro. Independientemente del valor numérico exacto de la pureza, el polipéptido es suficientemente puro para su uso como un producto farmacéutico.

## 15 VII. Caracterización biofísica y bioquímica

La unión de una Adnectina antimiostatina de la invención a una molécula diana (por ejemplo, miostatina) puede evaluarse en términos de constantes de equilibrio (por ejemplo, disociación,  $K_D$ ) y en términos de constantes cinéticas (por ejemplo, constante de asociación,  $k_{on}$  y constante de disociación,  $k_{off}$ ). Una Adnectina 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 pueden tolerarse valores de  $K_D$  más altos cuando la  $k_{off}$  es suficientemente baja o la  $k_{on}$  es suficientemente alta.

### 25 *Ensayos in vitro para determinar la afinidad de unión*

Las Adnectinas antimiostatina que se unen a y antagonizan la miostatina pueden identificarse usando diversos ensayos *in vitro*. Preferentemente, los ensayos son ensayos de alto rendimiento que permiten detectar múltiples Adnectinas candidatas simultáneamente. En algunas realizaciones, BMP-11, que comparte un 90 % de identidad de aminoácidos con la miostatina, puede usarse como sustituto de la miostatina en ensayos *in vitro* cuando el ensayo se realiza en condiciones de saturación. De manera notable, las Adnectinas antimiostatina fusionadas a dominios Fc pueden unirse tanto a la miostatina como a BMP-11, mientras que las monoAdnectinas se unen preferencialmente a la miostatina. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, esto puede reflejar la mayor avidez de las Adnectinas bivalentes fusionadas con Fc en comparación con las Adnectinas monovalentes. Se observa una unión mejorada similar a BMP11 con Adnectinas PEGiladas bivalentes, tales como ATI-1341, que comprenden Adnectinas fusionadas a dos extremos de un resto PEG de 20 kDa.

Los ensayos ilustrativos para determinar la afinidad de unión de Adnectinas antimiostatina se describen en los Ejemplos más adelante, e incluyen, pero no se limitan a, métodos en fase de solución tales como el ensayo de exclusión cinética (KinExA) (Blake *et al.*, JBC 1996;271:27677-85; Drake *et al.*, Anal Biochem 2004;328:35-43), 40 resonancia de plasmón superficial (SPR) con el sistema Biacore (Uppsala, Suecia) (Welford *et al.*, Opt. Quant. Electr. 1991;23:1; Morton y Myszka, Methods in Enzymology 1998;295:268) y ensayos de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF) (Newton *et al.*, J Biomol Screen 2008;13:674-82; Patel *et al.*, Assay Drug Dev Technol 2008;6:55-68).

45 En algunas 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 fina película 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 genera constantes de tasa de asociación, constantes de tasa de disociación, constantes de disociación de equilibrio y constantes de afinidad. La afinidad de unión se obtiene evaluando las constantes de velocidad de asociación y disociación usando un sistema de resonancia de plasmón superficial Biacore (Biacore, Inc.). Se activa un chip biosensor para el acoplamiento covalente de la diana. La diana se diluye después 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 (RU) es proporcional a la masa del material inmovilizado, esto representa un rango de densidades de dianas 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, obteniendo los mejores valores de ajuste para  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  y  $R_{max}$  (respuesta máxima en saturación). Las constantes de disociación de equilibrio para la unión,  $K_D$ , se calculan a partir de mediciones de SPR como  $k_{off}/k_{on}$ .

50 En algunas realizaciones, las Adnectinas antimiostatina de la invención exhiben una  $K_D$  en el ensayo de afinidad de SPR descrito en el Ejemplo 6 de 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, 200 nM o menos, 150 nM o menos, 100 nM o menos, 90 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 60 nM o menos, 50 nM o menos, 40 nM o menos, 30 nM o menos, 20 nM o menos, 15 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos o 1 nM o menos. Preferentemente, la  $K_D$  es 15 nM o menos. Más preferentemente, la  $K_D$  es 2,0 nM o menos.

55 En algunas realizaciones, las Adnectinas antimiostatina de la invención exhiben una CI50 en el ensayo de HTRF descrito en el Ejemplo 4 de 5 nM o menos, 4 nM o menos, 3 nM o menos, 2,5 nM o menos, 2 nM o menos, 1,5 nM o

menos, 1 nM o menos, 0,5 nM o menos, 0,2 nM o menos o 0,1 nM o menos. Preferentemente, la CI50 es 1,5 nM o menos. Más preferentemente, la CI50 es 0,5 nM o menos.

5 En algunas realizaciones, las Adnectinas antimiostatina de la invención exhiben  $K_D$  en el ensayo de exclusión cinética descrito en el Ejemplo 7 de 2 nM o menos, 1,5 nM o menos, 1 nM o menos, 900 pM o menos, 850 pM o menos, 800 pM o menos, 750 pM o menos, 700 pM o menos, 650 pM o menos, 600 pM o menos, 550 pM o menos, 500 pM o menos, 450 pM o menos, 400 pM o menos, 350 pM o menos, 340 pM o menos, 330 pM o menos, 300 pM o menos, 250 pM o menos, 200 pM o menos, 150 nM o menos o 100 nM o menos. Preferentemente, la  $K_D$  es 850 pM o menos.

10 Debe entenderse que los ensayos descritos anteriormente en el presente documento son ilustrativos, y que cualquier método conocido en la técnica para determinar la afinidad de unión entre proteínas (por ejemplo, transferencia basada en fluorescencia (FRET), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas y ensayos de unión competitiva (por ejemplo, radioinmunoensayos)) pueden usarse para evaluar las afinidades de unión de las Adnectinas antimiostatina de la invención.

15 **Ensayos *in vitro* para la actividad antagonista**

La capacidad de las Adnectinas antimiostatina para antagonizar la actividad de la miostatina puede determinarse fácilmente usando diversos ensayos *in vitro*. Preferentemente, los ensayos son ensayos de alto rendimiento que permiten detectar múltiples Adnectinas candidatas simultáneamente. En algunas realizaciones, los efectos antagonistas de las Adnectinas antimiostatina sobre la actividad de la miostatina pueden determinarse en ensayos de indicador de luciferasa del elemento sensible a la activina (ARE) basados en células, como se describe en el Ejemplo 3. En determinadas realizaciones, las Adnectinas antimiostatina de la invención disminuyen la actividad ARE-luciferasa inducida por miostatina en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o más con respecto a un control al coincubar miostatina con una Adnectina antimiostatina antes de estimular las células con la mezcla. Una reacción de control ilustrativa implica tratar células con miostatina sola o miostatina preincubada con un exceso de un inhibidor de miostatina de referencia tal como Human Activin RIIB Fc Chimera (R&D Systems) o ActRIIb-Fc como se describe en Morrison *et al.* (Experimental Neurology 2009; 217:258-68). En otras realizaciones, las Adnectinas antimiostatina de la invención inhiben la actividad indicadora de ARE-luciferasa con una CI50 de 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, 200 nM o menos, 100 nM o menos, 50 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 1 nM, 0,5 nM o menos, 0,4 nM o menos, 0,3 nM o menos, 0,2 nM o menos o 0,10 nM o menos, como se describe en el Ejemplo 3.

35 En otras realizaciones, los efectos antagonistas de las Adnectinas antimiostatina sobre la actividad de la miostatina pueden determinarse midiendo el grado de fosforilación de SMAD en células tratadas con miostatina, como se describe en el Ejemplo 5. En determinadas realizaciones, las Adnectinas antimiostatina de la invención disminuyen la fosforilación SMAD inducida por miostatina en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 97 % o más en relación con un control al coincubar miostatina con una Adnectina antimiostatina antes de estimular las células con la mezcla. Una reacción de control ilustrativa implica tratar células con miostatina sola o miostatina preincubada con un exceso de un inhibidor de miostatina de referencia tal como Human Activin RIIB Fc Chimera (R&D Systems) o ActRIIb-Fc como se describe en Morrison *et al.* (Experimental Neurology 2009; 217:258-68). En algunas realizaciones, las Adnectinas antimiostatina de la invención inhiben la fosforilación de SMAD con una CI50 de 1 nM o menos, 0,8 nM o menos, 0,6 nM o menos, 0,4 nM o menos, 0,3 nM o menos, 0,2 nM o menos o 0,1 nM o menos en una respuesta de inhibición de 12 puntos o 4 puntos, como se describe en el Ejemplo 5. En otras realizaciones, las Adnectinas antimiostatina de la invención a 10 nM inhiben la fosforilación SMAD por la miostatina en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 % o al menos un 98 % o más, como se describe en el Ejemplo 5.

50 Adicionalmente, se conocen varios sistemas modelo *in vitro* que usan células, cultivo de tejidos y métodos histológicos para estudiar la enfermedad de la motoneurona. Por ejemplo, un corte organotípico de médula espinal de rata sometido a excitotoxicidad por glutamato es útil como sistema modelo para probar la eficacia de las Adnectinas antimiostatina en la prevención de la degeneración de las motoneuronas. Corse *et al.*, Neurobiol. Dis. (1999) 6:335 346. Para un análisis de sistemas *in vitro* para su uso en el estudio de ELA, véanse, por ejemplo, Bar, P. R., Eur. J. Pharmacol. (2000) 405:285 295; Silani *et al.*, J. Neurol. (2000) 247 Supl 1:128 36; Martin *et al.*, Int. J. Mol. Med. (2000) 5:3 13.

60 Debe entenderse que los ensayos descritos en el presente documento son ilustrativos y que cualquier método conocido en la técnica que pueda servir como lectura de la actividad de la miostatina es adecuado para su uso para probar los efectos antagonistas de la miostatina de las Adnectinas antimiostatina de la invención (por ejemplo, RT-PCR en tiempo real de ARNm de genes diana de SMAD (por ejemplo, Smad 7; Ciarmela *et al.*, Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2011;96:755-65) o ARNm de genes que contienen ARE).

65 **Modelos *in vivo***

Existen diversos modelos animales reconocidos en la técnica que recapitulan los síntomas de enfermedades,

trastornos y afecciones asociados a la atrofia muscular asociada, por ejemplo, a trastornos musculares, neuromusculares, neurológicos y metabólicos. Estos modelos pueden usarse para probar la eficacia de las Adnectinas antimiotatina de la invención.

- 5 Por ejemplo, los ejemplos no limitantes de tales modelos animales incluyen, por ejemplo, el modelo de ratón con distrofia muscular ligada al cromosoma X (mdx) (documento US2011/0008375, Gehrig *et al.*, *Nature* 2012;484:394-8), que incluye 4 cepas adicionales de ratón *mdx* *mdx2cv*, *mdx3cv*, *mdx4cv* o ratón *mdx5cv* (Phelps *et al.*, *Human Molecular Genetics*. 1996;5(8):1149-1153), el ratón *mdx* con ablación adicional del homólogo de distrofina utrofina (*mdx/utr<sup>-/-</sup>*) (Deconinck *et al.*, *Cell*. 1997;90(4):717-727), el ratón C57BL/6 nulo alfa-SG (Duclos *et al.* (1998) *J. Cell Biol.* 142, 1461-1471) y aquellos revisados recientemente en Nakamura *et al.*, (*J Biomed Biotechnol*. 2011; N.º de ID de artículo: 184393), por ejemplo, el ratón *mdx52*, en el cual se elimina el exón 52 del gen DMD murino, el modelo de distrofia muscular del Golden Retriever (GRMD), la distrofia muscular canina ligada al cromosoma X (CXMD<sub>i</sub>) y el modelo de hipertrofia de distrofia muscular felina (HFMD) (por ejemplo, Shelton *et al.*, *Neuromuscular Disorders*. 2005;15(2): 127-138).
- 10 15 Los modelos animales para el estudio de trastornos de motoneuronas tales como ELA son ratones transgénicos con un gen mutante de superóxido dismutasa (SOD1) Cu/Zn ligado a ELA (mSOD1G93A y/o mSOD1G37R). Estos ratones desarrollan un trastorno paralítico de aparición en la edad adulta, de herencia dominante, con muchas de las características clínicas y patológicas de la ELA familiar. (por ejemplo, Gurney *et al.*, *Science* (1994) 264:1772 1775; Nagano *et al.*, *Life Sci* (2002) 72:541 548). Otros modelos animales incluyen dos modelos murinos naturales para la neuronopatía motora progresiva (pmn) y el tambaleo (Haeggeli y Kato, *Neurosci. Lett.* (2002) 335:39 43). Para una revisión de diversos modelos animales para su uso en el estudio de enfermedades de motoneuronas tales como ELA, véanse, por ejemplo, Jankowsky *et al.*, *Curr Neurol Neurosci. Rep.* (2002) 2:457 464; Elliott, J. L., *Neurobiol. Dis.* (1999) 6:310 20; y Borchelt *et al.*, *Brain Pathol.* (1998) 8:735 757.
- 20 25 Los modelos animales de otras enfermedades neurodegenerativas o neuropatológicas además de la ELA incluyen un modelo de ratón transgénico para evaluar la atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA) (Katsuno *et al.*, *Neuron* (2002) 35:843 854), modelos animales para poliomielitis paralítica humana (Ford *et al.*, *Microb. Pathog.* (2002) 33:97 107), modelos animales de atrofia muscular espinal (Schmid *et al.*, *J. Child Neurol.* 22, 1004-1012, 2007), modelos animales para miopatía distal y miopatía hereditaria por cuerpos de inclusión (Malicdan *et al.*, *Acta Myol.* diciembre de 2007; 26(3): 171-175), el modelo murino de enfermedad desmielinizante genética (Suzuki *et al.*, *Microsc. Res. Tech.* 1995;32:204-214) y aquellos descritos por Meyer ZuHörste *et al.* (*Curr. Opin. Neurol.* 2006;19:464-473).
- 30 35 Los modelos animales para probar la eficacia de las Adnectinas antimiotatina de la invención contra la pérdida de volumen muscular debido a atrofia y/o inactividad incluyen, pero no se limitan a, modelos de ratón de inmovilización unilateral (Madaró *et al.*, *Basic Applied Myology* 2008;18:149-153), laceración del tendón de Aquiles (tenotomía) (Bialek *et al.*, *Physiol Genomics* 2011;43:1075-86) y aquellos desvelados en Powers *et al.* (*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R337-44)), tales como, suspensión de las patas traseras de los animales, inmovilización de extremidades y ventilación mecánica controlada.
- 40 45 Los modelos animales relevantes para probar la eficacia de las Adnectinas antimiotatina de la invención en el tratamiento de trastornos metabólicos incluyen, pero no se limitan a, aquellos desvelados en Ramaro *et al.* (*Indian J Med Res* 2007;125:451-472) y Kennedy *et al.* (*Disease Models & Mechanisms* 2010;3:156-166). Los ejemplos no limitantes de tales modelos animales incluyen ratones *Lep<sup>ob/ob</sup>*, ratones *Lep<sup>db/db</sup>*, ratones Kuo Kondo, ratones *KK<sup>Ay</sup>*, ratones obesos de Nueva Zelanda (NZO), ratones NONcNZO10, ratones Tsumara Suzuki obesos con diabetes (TSOD) y Tsumara Suzuki no obesos (TSNO), ratones M16, ratas gordas Zucker, ratas gordas diabéticas Zucker, rata SHR/N- cp, rata JCR/LA -cp, ratas gordas Otsuka Long Evans Tokushima, macacos obesos, ratas diabéticas Cohen, ratas Goto-Kakizaki y ratones mutantes C57 BL/6 (Akita) no obesos. La diabetes tipo 2 también puede inducirse por la dieta mediante, por ejemplo, alimentación con piensos ricos en grasas a ratones C57BL6 no obesos no diabéticos (Surwit *et al.*, *Diabetes* 1988;37:1163-7). La diabetes tipo 2 también puede inducirse químicamente con, por ejemplo, orotioglucosa (Le Marchand Brustel *et al.*, *Am J Physiol* 1978;234:E348-58) o estreptozotocina, o inducirse quirúrgicamente (por ejemplo, animales diabéticos con pancreatectomización parcial) (McNeil JH., *Experimental models of diabetes*. Florida, US: CRC Press LLC; 1999; Sasaki *et al.*, *In Vivo* 2000;14:535-41). También se sabe que muchos modelos animales genéticos recapitulan los síntomas y fenotipos de los trastornos metabólicos, tales como los revisados en Kennedy *et al.*, 2010 (*supra*).
- 50 55 En algunas realizaciones, la eficacia de las Adnectinas antimiotatina de la invención para aumentar la masa o el volumen muscular puede probarse mediante inyección subcutánea de ratones, como se describe en el Ejemplo 9. Dado que la inhibición de la miotatina aumenta la masa muscular, se espera que las Adnectinas antimiotatina de la invención aumenten el peso corporal y la masa muscular, en la medida en que pueda usarse para determinar la potencia de las Adnectinas.
- 60 65 En algunas realizaciones, particularmente cuando las Adnectinas antimiotatina son inmunogénicas en ratones (por ejemplo, debido al uso del dominio de fibronectina humana tipo III) y se desean tratamientos crónicos, las Adnectinas antimiotatina de la invención pueden administrarse a ratones SCID, que son incapaces de generar respuestas inmunitarias celulares o humorales. En algunas realizaciones, Los ratones SCID pueden cruzarse con otros modelos

genéticos, tales como aquellos descritos en el presente documento (por ejemplo, ratones diabéticos), para desarrollar un modelo de ratón inmunocomprometido susceptible de tratamiento crónico con las Adnectinas antimiotiostatina de la invención.

5 **VIII. Aplicaciones terapéuticas**

En un aspecto, la presente invención proporciona Adnectinas antimiotiostatina útiles para el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la miostatina, por ejemplo, trastornos de atrofia muscular, atrofia muscular, trastornos metabólicos y trastornos degenerativos óseos. En consecuencia, en el presente documento se describen métodos para atenuar o inhibir una enfermedad o trastorno relacionado con la miostatina en un sujeto que comprenden administrar una cantidad eficaz de polipéptido de unión a miostatina, es decir, una Adnectina antimiotiostatina, a un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, las Adnectinas antimiotiostatina 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, tales como esencialmente libres de endotoxinas o niveles de endotoxinas muy bajos.

10 En algunas realizaciones, las Adnectinas antimiotiostatina de la presente invención se administrarán a un sujeto en combinación (al mismo tiempo o por separado) con un agente conocido en la técnica por ser útil para el trastorno o enfermedad particular que se está tratando.

15 En algunas realizaciones, la población de pacientes diana para la terapia con Adnectina antimiotiostatina es aquella que no es susceptible de terapia convencional para la enfermedad, el trastorno o la afección que se está tratando debido a, por ejemplo, edad, condiciones preexistentes, composición genética y/o comorbilidades. Las Adnectinas antimiotiostatina de la invención pueden servir como alternativas a las terapias existentes que están asociadas a efectos secundarios sustanciales (por ejemplo, rendimiento reproductivo) o problemas de seguridad.

20 Las enfermedades, los trastornos y las afecciones ilustrativos para los que serán útiles las Adnectinas antimiotiostatina de la presente invención se describen con más detalle a continuación.

25 **30 Enfermedades y trastornos musculares, neurológicos y metabólicos**

30 Las Adnectinas antimiotiostatina de la presente invención pueden usarse para tratar trastornos musculares, neurológicos y metabólicos asociados a desgaste muscular y/o atrofia muscular. Por ejemplo, la sobreexpresión de miostatina *in vivo* induce signos y síntomas característicos de la caquexia, y los agentes de unión a miostatina pueden resolver parcialmente el efecto de desgaste muscular de la miostatina (Zimmers *et al.*, *Science* 2002;296:1486-8). Los pacientes con SIDA también presentan niveles séricos elevados de material inmunorreactivo de miostatina en comparación con pacientes sin SIDA o con pacientes con SIDA que no presentan pérdida de peso (Gonzalez-Cadavid *et al.*, *PNAS* 1998;95:14938-43). También se ha observado que la eliminación de miostatina específica del corazón reduce la atrofia del músculo esquelético en ratones con insuficiencia cardíaca y, a la inversa, sobreexpresar específicamente miostatina en el corazón es suficiente para inducir atrofia muscular (Breitbart *et al.*, *AJP-Heart*; 2011;300:H1973-82). Por el contrario, los ratones inactivados para miostatina muestran un aumento de la masa muscular y una disminución de la acumulación de grasa dependiente de la edad en comparación con sus homólogos de tipo silvestre (McPherron *et al.*, *J. Clin. Invest.* 2002;109:595-601).

40 45 Los trastornos ilustrativos que pueden tratarse de acuerdo con el uso médico de la invención incluyen miopatías y neuropatías, incluyendo, por ejemplo, enfermedad de la motoneurona, trastornos neuromusculares y neurológicos.

50 55 Por ejemplo, las Adnectinas antimiotiostatina pueden usarse para tratar miopatías hereditarias y trastornos neuromusculares (por ejemplo, distrofia muscular (Gonzalez-Kadavid *et al.*, *PNAS*, 1998;95:14938-43), trastornos de las motoneuronas, miopatías congénitas, miopatías inflamatorias y miopatías metabólicas), así como miopatías adquiridas (por ejemplo, miopatía inducida por fármacos, miopatía inducida por toxinas, miopatía inducida por infección, miopatía paraneoplásica y otras miopatías asociadas a enfermedades críticas).

60 65 Dichos trastornos incluyen, pero no se limitan a, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular progresiva, distrofia muscular tipo Becker, distrofia muscular de Dejerine-Landouzy, distrofia muscular de Erb, distrofia muscular de Emery Dreifuss, distrofia muscular de cinturas, distrofia muscular oculofaríngea (OPMD), distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia muscular congénita, distrofia muscular neuroaxonal infantil, distrofia miotónica (enfermedad de Steinert), distrofia muscular distal, miopatía nemalínica, parálisis periódica familiar, miotonía no distrófica, parálisis periódica, atrofia muscular espinal, atrofia muscular espinal (AME), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis lateral primaria (ELP), atrofia muscular progresiva (PMA), miopatía distal, miopatía miotubular/centronuclear, miopatía nemalínica, enfermedad del mini núcleo, enfermedad del núcleo central, desminopatía, miositis por cuerpos de inclusión, dermatomiositis, polimiositis, miopatía mitocondrial, síndrome miasténico congénito, miastenia grave, disfunción muscular pospolio, miopatía esteroide, miopatía alcohólica, atrofia muscular perioperatoria y neuromiopatía en la UCI.

65 Las neuropatías y radiculopatías hereditarias y adquiridas que pueden tratarse con Adnectinas antimiotiostatina incluyen,

pero no se limitan a, síndrome de la columna rígida, enfermedad músculo-ojo-cerebro, herencia de neuropatía motora y sensorial, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, neuropatía inflamatoria crónica, neuropatía hipertrófica progresiva, neuropatía tomaculosa, lupus, síndrome de Guillain-Barré, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica,

5 enfermedades (por ejemplo, VIH/SIDA, enfermedad de Lyme), neuropatías relacionadas con toxinas (por ejemplo, metales pesados, quimioterapia), neuropatías por compresión (por ejemplo, tumores, neuropatía por atrapamiento) y neuropatías asociadas a lesiones o traumatismos (por ejemplo, síndrome de cola equina, paraplegia, quadriplegia).

10 En algunas realizaciones, las Adnectinas antimiotostatina de la invención pueden usarse para tratar distrofias musculares (por ejemplo, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular tipo Becker), ELA y sarcopenia.

15 Los trastornos adicionales asociados a atrofia muscular que pueden tratarse con las Adnectinas antimiotestatina de la invención incluyen caquexia, síndrome consuntivo, sarcopenia, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, fibrosis quística (caquexia pulmonar), enfermedad o insuficiencia cardíaca (caquexia cardíaca), cáncer, desgaste debido al SIDA, desgaste debido a insuficiencia renal, nefropatía, claudicación, caquexia asociada a diálisis, uremia, artritis reumatoide, lesión muscular, cirugía, reparación del músculo dañado, fragilidad, atrofia por desuso, osteoporosis, artrosis, crecimiento y reparación de ligamentos.

Las Adnectinas antimiotestina de la invención también pueden usarse para aumentar el volumen muscular en sujetos que padecen atrofia muscular debido al desuso. La atrofia por desuso puede deberse a numerosas causas, incluyendo cualquier trastorno o estado que conduzca a una inmovilidad prolongada o desuso, incluyendo, pero no limitado al reposo prolongado en cama, estar en silla de ruedas, inmovilización de extremidades, descarga del diafragma mediante ventilación mecánica, trasplante de órganos sólidos, reemplazo de articulaciones, ictus, debilidad relacionada con daño al SNC, lesión de la médula espinal, recuperación de una quemadura grave, hemodiálisis crónica sedentaria, recuperación postraumática, recuperación post-sepsis y exposición a la microgravedad (Powers *et al.*, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2005;288:R337-44).

Además, los aumentos relacionados con la edad en la proporción de grasa y músculo y la atrofia muscular relacionada con la edad parecen estar relacionados con la miostatina. Por ejemplo, la proteína inmunorreactiva sérica promedio de miostatina aumentó con la edad en grupos de hombres y mujeres jóvenes (19-35 años), de mediana edad (36-75 años) y ancianos (76-92 años), mientras que la masa muscular promedio y la masa libre de grasa disminuyeron con la edad en estos grupos (Yarasheski *et al.* J Nutr Aging 6(5):343-8 (2002)). En consecuencia, los sujetos con atrofia muscular debido al envejecimiento y/o sujetos frágiles debido a, por ejemplo, sarcopenia, también se beneficiarían del tratamiento con las Adnectinas antimiotestatina de la invención.

35 También se contemplan métodos para aumentar la masa muscular en animales destinados al consumo mediante la administración de una dosificación eficaz de Adnectinas antimiotestatina a estos animales. Dado que el polipéptido de miostatina C-terminal maduro es idéntico en todas las especies, se esperaría que las Adnectinas antimiotestatina aumenten eficazmente la masa muscular y reduzcan la grasa en cualquier especie agrícolamente importante, por  
40 ejemplo, pero no limitado a, ganado bovino, pollo, pavos y cerdos.

45 La eficacia de la Adnectina antimiotestina en el tratamiento de trastornos de desgaste muscular o atrofia muscular puede determinarse, por ejemplo, mediante uno o más métodos para medir un aumento en la masa o el volumen muscular, un aumento en el número de células musculares (hiperplasia), un aumento en el tamaño de las células musculares (hipertrofia) y/o un aumento en la fuerza muscular. Por ejemplo, los efectos de aumento del volumen muscular de las Adnectinas antimiotestina de la presente invención se demuestran en los ejemplos descritos más adelante. Los métodos para determinar el "aumento de masa muscular" son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el contenido muscular puede medirse antes y después de la administración de una Adnectina antimiotestina de la invención usando técnicas convencionales, tales como el pesaje bajo el agua (véase, por ejemplo, Bhasin *et al.* New Eng. J. Med. (1996) 335:1-7) y absorciometría de rayos X de energía doble (véase, por ejemplo, Bhasin *et al.* Mol. Endocrinol. (1998) 83:3155-3162). Un aumento en el tamaño de los músculos puede evidenciarse por un aumento de peso de al menos aproximadamente el 5-10 %, preferentemente al menos aproximadamente el 10-20 % o más.

50

## ***Trastornos metabólicos***

55 Las Adnectinas antimiostatina de la presente invención, que reducen la actividad y/o la señalización de la miostatina, son útiles para el tratamiento de trastornos metabólicos, tales como obesidad, diabetes mellitus de tipo II, trastornos asociados a la diabetes, síndrome metabólico e hiperglucemia.

60 La miostatina está implicada en la patogénesis de la diabetes mellitus tipo II. La miostatina se expresa en el tejido adiposo y los ratones con deficiencia de miostatina presentan una reducción de la acumulación de grasa a medida que envejecen. Por otra parte, la carga de glucosa, la acumulación de grasa y el peso corporal total se reducen en ratones que carecen de amarillo letal agutí y obesos (*Lep<sup>ob/ob</sup>*) (Yen *et al.*, FASEB J. 8:479, 1994; McPherron *et al.*, 2002). Como se desvela en el documento US2011/0008375, los antagonistas de la miostatina pueden disminuir la  
65 proporción de grasa y músculo en un modelo de ratón envejecido, preservar la masa del músculo esquelético y la masa corporal magra y atenuar la hipertrofia renal en ratones diabéticos inducidos por STZ.

Como se usa en el presente documento, la "obesidad" es una afección en la que el exceso de grasa corporal se ha acumulado hasta tal punto que la salud puede verse afectada negativamente. Comúnmente se define como un índice de masa corporal (IMC) de 30 kg/m<sup>2</sup> o más, lo que lo distingue del sobrepeso definido por un IMC de 25 kg/m<sup>2</sup> o más (véase, por ejemplo, Organización Mundial de la Salud (2000) (PDF). Serie de informes técnicos 894: Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Ginebra: Organización Mundial de la Salud). El peso corporal excesivo está asociado a diversas enfermedades, particularmente enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II, apnea obstructiva del sueño, determinados tipos de cáncer y osteoartritis.

5 10 Puede identificarse un sujeto con obesidad, por ejemplo, determinando el IMC (el IMC se calcula dividiendo la masa del sujeto por el cuadrado de su altura), la circunferencia de cintura y la relación cintura-cadera (la circunferencia absoluta de la cintura (>102 cm en hombres y >88 cm en mujeres) y la relación cintura-cadera (la circunferencia de la cintura dividida por la de las caderas de >0,9 para hombres y > 0,85 para mujeres) (véase, por ejemplo, Yusuf S, et al., (2004). Lancet 364: 937-52) y/o el porcentaje de grasa corporal (grasa corporal total expresada como porcentaje 15 20 del peso corporal total: los hombres con más del 25 % de grasa corporal y las mujeres con más del 33 % de grasa corporal son obesos; el porcentaje de grasa corporal puede estimarse a partir del IMC de una persona mediante la siguiente fórmula: % de grasa corporal = (1,2 \* IMC) + (0,23 \* edad) - 5,4 - (10,8 \* sexo), donde el género es 0 si es mujer y 1 si es hombre). Las técnicas de medición del porcentaje de grasa corporal incluyen, por ejemplo, tomografía computarizada (barido CT), formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) y absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA).

La expresión "diabetes tipo II" se refiere a una enfermedad crónica, de por vida que se produce cuando la insulina del cuerpo no funciona eficazmente. Un componente principal de la diabetes tipo II es la "resistencia a la insulina", en donde la insulina producida por el páncreas no puede conectarse con las células grasas y musculares para permitir que la glucosa del interior produzca energía, provocando hiperglucemia (nivel alto de glucosa en sangre). Para compensar, el páncreas produce más insulina, y las células, sintiendo esta avalancha de insulina, se vuelven aún más resistentes, lo que resulta en un círculo vicioso de niveles altos de glucosa y, a menudo, niveles altos de insulina.

25 30 La expresión "trastornos asociados a la diabetes" o "trastornos asociados a diabetes" o "trastornos relacionados con la diabetes", como se usa en el presente documento, se refiere a afecciones y otras enfermedades que están comúnmente asociadas o relacionadas con la diabetes. Algunos ejemplos de trastornos asociados a la diabetes incluyen, por ejemplo, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, resistencia a insulina, metabolismo de la glucosa alterado, obesidad, retinopatía diabética, degeneración macular, cataratas, nefropatía diabética, glomeruloesclerosis, neuropatía diabética, disfunción erétil, síndrome premenstrual, restenosis vascular, colitis 35 ulcerosa, cardiopatía coronaria, hipertensión, angina de pecho, infarto de miocardio, ictus, trastornos de la piel y del tejido conectivo, úlceras del pie, acidosis metabólica, artritis y osteoporosis.

40 45 La eficacia de las Adnectinas antimiotestatina en el tratamiento de trastornos metabólicos puede determinarse, por ejemplo, mediante uno o más métodos para medir un aumento en la sensibilidad a la insulina, un aumento en la absorción de glucosa por las células del sujeto, una disminución de los niveles de glucosa en sangre y una disminución de la grasa corporal.

50 55 Por ejemplo, en sujetos que tienen diabetes tipo II o que tienen riesgo de desarrollar diabetes, pueden controlarse los niveles de HbA1c. El término "hemoglobina 1AC" o "HbA1c" como se usa en el presente documento se refiere al producto de una glicación no enzimática de la cadena B de hemoglobina. El intervalo diana deseado de niveles de HbA1c para personas con diabetes puede determinarse a partir de las directrices de la American Diabetes Association (ADA), es decir, los Standards of Medical Care in Diabetes (Diabetes Care 2012;35(Supl 1):5511-563). Los niveles diana actuales de HbA1c son generalmente <7,0 % para las personas con diabetes y las personas que no tienen diabetes suelen tener valores de HbA1c inferiores al 6 %. En consecuencia, la eficacia de las Adnectinas antimiotestatina de la presente invención puede determinarse mediante una disminución observada en el nivel de HbA1c en un sujeto.

55 Una Adnectina antimiotestatina de la invención puede administrarse sola o en combinación con otros agentes que se conocen en la técnica para el control glucémico (por ejemplo, insulina, GLP1) o para el tratamiento de complicaciones relacionadas con la diabetes reconocidas en la técnica.

### **Otros trastornos**

60 65 Los ratones inactivados para miostatina exhiben un aumento de masa muscular, así como un mayor contenido mineral y densidad del húmero del ratón, y un mayor contenido mineral del hueso trabecular y cortical en las regiones donde se unen los músculos (Hamrick et al. Calcif Tissue Int 2002;71:63-8). Esto sugiere que aumentar la masa muscular puede ayudar a mejorar la fuerza ósea y reducir la osteoporosis y otras enfermedades óseas degenerativas.

65 Las enfermedades o los trastornos adicionales para los cuales las Adnectinas antimiotestatina de la presente invención son útiles incluyen la cicatrización de heridas, enfermedad antifibrótica, Síndrome de Lambert-Eaton y enfermedad de Parkinson.

**Terapias de combinación**

Las Adnectinas antimiotiostatina proporcionadas en el presente documento pueden emplearse en combinación con agentes antidiabéticos, agentes antihiperglucémicos, agentes antihiperinsulinémicos, agentes antirretinopáticos, agentes antineuropáticos, agentes antineurodegenerativos, agentes antinefropáticos, agentes antiateroscleróticos, agentes antiisquémicos, agentes antihipertensores, agentes antiobesidad, agentes antidislipidémicos, agentes antidislipidémicos, agentes antihiperlipidémicos, agentes hipertrigliceridémicos, agentes antihipercolesterolémicos, agentes antirreestenóticos, agentes antipancreáticos, agentes hipolipemiantes, agentes anorexigénicos, agentes que mejoran la memoria, agentes antidepresión o agentes promotores de la cognición, supresores del apetito, tratamientos neuro- o musculo-restauradores, tratamientos de la insuficiencia cardíaca, tratamientos para la enfermedad arterial periférica y agentes antiinflamatorios.

Los agentes antidiabéticos usados en combinación con las Adnectinas antimiotiostatina incluyen, pero no se limitan a, secretagogos de la insulina o sensibilizantes de la insulina, moduladores del receptor de GPR40 u otros agentes antidiabéticos. Estos agentes incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DP4) (por ejemplo, sitagliptina, saxagliptina, alogliptina, vildagliptina y similares), biguanidas (por ejemplo, metformina, fenformina y similares), sulfonilureas (por ejemplo, gliburida, glimepirida, glipizida y similares), inhibidores de glucosidasa (por ejemplo, acarbosa, miglitol y similares), agonistas de PPAPy, tales como tiazolidindionas (por ejemplo, rosiglitazona, pioglitazona y similares), agonistas dobles de PPAR  $\alpha/y$  (por ejemplo, muraglitazar, tesaglitazar, aleglitazar y similares), activadores de la glucoquinasa (como se describe en Fyfe *et al.*, Drugs of the Future, 34(8):641-653 (2009)), moduladores del receptor GPR119 (MBX-2952, PSN821, APD597 y similares), inhibidores de SGLT2 (dapagliflozina, canagliflozina, remagliflozina y similares), análogos de amilina, tales como pramlintida y/o insulina. Pueden encontrarse revisiones de las terapias actuales y emergentes para el tratamiento de la diabetes en: Mohler *et al.*, Medicinal Research Reviews, 29(1):125-195 (2009) y Mizuno *et al.*, Current Medicinal Chemistry, 15:61-74 (2008).

Las Adnectinas antimiotiostatina de la presente invención también pueden emplearse opcionalmente en combinación con uno o más agentes hipofágicos tales como dietilpropión, fendifmetrazina, fentermina, orlistat, sibutramina, lorcaserina, pramlintida, topiramato, antagonistas de receptores de MCHR1, oxintomodulina, naltrexona, péptido amilina, moduladores del receptor de NPY Y5, moduladores del receptor de NPY Y2, moduladores del receptor de NPY Y4, cetilistat, moduladores del receptor 5HT2c y similares. Las Adnectinas antimiotiostatina de la presente invención también pueden emplearse junto con un agonista del receptor del péptido 1 análogo al glucagón (GLP-1 R), tales como exenatida, liraglutida, GPR-1(1-36)amida, GLP-1(7-36)amida, GLP-1(7-37) (como se desvela en la Pat. de EE.UU. N.º 5.614.492 de Habener), que pueden administrarse mediante inyección, por vía intranasal o mediante dispositivos transdérmicos o bucales. Pueden encontrarse revisiones de las terapias actuales y emergentes para el tratamiento de la obesidad en: Melnikova *et al.*, Nature Reviews Drug Discovery, 5:369-370 (2006); Jones, Nature Reviews: Drug Discovery, 8:833-834 (2009); Obici, Endocrinology, 150(6):2512-2517 (2009); y Elangbam, Vet. Pathol., 46(1):10-24 (2009).

Las Adnectinas antimiotiostatina de la presente invención también pueden administrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales, según sea apropiado para la enfermedad o el trastorno particular que se está tratando. Los ejemplos no limitantes de agentes adicionales incluyen aquellos que son útiles para tratar trastornos metabólicos tales como diabetes tipo II y sarcopenia e incluyen, pero no se limitan a, GLP-1, tipo GLP-1, amilina y FGF21; aquellos que son útiles para el tratamiento de enfermedad antifibrótica, enfermedad neuromuscular, enfermedad de la motoneurona y sarcopenia e incluyen, pero no se limitan a, grelina, SARM, Riluzol, testosterona, andrógenos, hormona del crecimiento, terapia de reemplazo hormonal, inhibidores de COX-2, activadores de troponina, agonistas de  $\beta$ 2, CTLA4-Ig (por ejemplo, abetacept, belatacept) y anticuerpos anti-TGF $\beta$ ; aquellos que son útiles para tratar la caquexia y otros síndromes de desgaste e incluyen, pero no se limitan a, Inhibidores de la quinasa del receptor TGF $\beta$ , inhibidores de anti-IL-6 y ubiquitina-proteosoma; aquellos que son útiles para tratar los calambres musculares asociados a miotonía y PLS incluyen, pero no se limitan a fitoína, quinina, Baclofeno y tizanidina; aquellos que son útiles para las neuropatías incluyen antidepresivos (por ejemplo, tricíclicos e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina-norepinefrina (IRSN)), anticonvulsionantes, cannabinoides, toxina botulínica de Tipo A, antagonistas de NMDA (por ejemplo, ketamina), suplementos dietéticos (por ejemplo, ácido alfa lipoico y benfotiamina); aquellos que son útiles para el tratamiento de neuropatías inflamatorias crónicas incluyen, pero no se limitan a, corticoesteroides, inmunoglobulina intravenosa y fármacos inmunosupresores (por ejemplo, ciclofosfamida, ciclosporina, azatioprina, micoferolato de mofetilo, globulina antitimocítica, rituximab); y aquellos que son útiles para tratar el síndrome de Guillain Barré, sarcopenia, fractura y pérdida ósea e incluyen, pero no se limitan a, Boniva (ibandronato) y PTH.

Las Adnectinas antimiotiostatina de la presente invención pueden administrarse con uno o más agentes adicionales usados en terapia sintomática. Los ejemplos no limitantes de tales agentes para tratar los síntomas de la ELA incluyen activadores de poros de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT), activadores rápidos de troponina esquelética, reguladores de macrófagos (por ejemplo, NP001), agentes para el tratamiento de enfermedades por almacenamiento lisosómico (por ejemplo, NP003) y antagonistas del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR). Un ejemplo no limitante de un agente adicional para su uso en el tratamiento de los síntomas de DMD/BMD es un agente que aumenta los niveles de ATP.

Las Adnectinas antimiotiostatina de la presente invención también pueden administrarse con uno o más agentes

- adicionales usados en terapia de modificación de la enfermedad. Los ejemplos no limitantes de tales agentes para tratar la ELA incluyen eliminadores de radicales libres (por ejemplo, edaravona (norfenazona), CV-3611), agonistas de VEGF (por ejemplo, sNIN0029), proteína I Nogo-A (por ejemplo, GSK122324), inhibidores de SOD1 (por ejemplo, ISIS-SOD1Rx) e inhibidores de la PGE sintasa 1 (por ejemplo, AAD-2004). Los ejemplos no limitantes de tales agentes para tratar DMD/BMD incluyen aquellos que promueven la omisión de exones (por ejemplo, moléculas antisentido tales como drisapersen (PRO051/GSK2402968), PRO044, Eteplirsen, AVI-4658, AVI-5038, Ataluren (PTC124)), agentes de genoterapia, agentes antiinflamatorios (por ejemplo, CRD007) y agentes antifibróticos (por ejemplo, HT-100).
- Como se ha analizado anteriormente, pueden usarse agentes que promueven la omisión de exones en combinación con las Adnectinas antimiotatina de la presente invención para tratar la distrofia muscular de Duchenne y la distrofia muscular de tipo Becker. Los ejemplos de exones específicos que pueden marcarse como diana para restaurar la distrofina funcional incluyen los exones 7, 8, 17, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52, 53 y 55 (véase, por ejemplo, Lu *et al.*, Molecular Therapy 2011;19:9-15). En algunas realizaciones, más de un agente, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, puede usarse para inducir la omisión de múltiples exones.

## IX. Composiciones farmacéuticas

La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden una Adnectina antimiotatina o proteínas de fusión de la misma, en donde la composición está esencialmente libre de endotoxinas, o al menos no contiene más que niveles aceptables de endotoxinas según lo determinado por la agencia reguladora apropiada (por ejemplo, FDA).

Las composiciones de la presente invención pueden estar en forma de píldora, comprimido, cápsula, líquido o comprimido de liberación sostenida para administración oral; un líquido para administración intravenosa, subcutánea o parenteral; o un gel, una loción, una pomada, una crema o un polímero u otro vehículo de liberación sostenida para administración local.

Métodos bien conocidos en la técnica para preparar composiciones se encuentran, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20a ed., ed. A. R. Gennaro AR., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pa.). Las composiciones para administración parenteral pueden, por ejemplo, contener excipientes, agua estéril, solución salina, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal o naftalenos hidrogenados. Pueden usarse polímero de lactida, copolímeros de lactida/glicolida o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno biocompatibles biodegradables para controlar la liberación de los compuestos. Las composiciones de nanopartículas (por ejemplo, nanopartículas biodegradables, nanopartículas lipídicas sólidas, liposomas) pueden usarse 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 composición varía dependiendo de varios factores, incluyendo la dosis del fármaco a administrar y la vía de administración.

Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrans; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como Tween, PLURONIC™ o polietilenglicol (PEG).

Los polipéptidos de la presente invención pueden administrarse opcionalmente como una sal farmacéuticamente aceptable, tal como sales de adición de ácido no tóxicas o los complejos de metales que se usan comúnmente en la industria farmacéutica. Los ejemplos de sales de adición de ácidos incluyen ácidos orgánicos tales como ácidos acético, láctico, pamoico, maleico, cítrico, málico, ascórbico, succínico, benzoico, palmitico, subérico, salicílico, tartárico, metanosulfónico, toluenosulfónico o trifluoroacético o similares; ácidos poliméricos tales como ácido tánico, carboximetilcelulosa o similares; y ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o similares. Los complejos metálicos incluyen cinc, hierro y similares. En un ejemplo, el polipéptido se formula en presencia de acetato sódico para aumentar la estabilidad térmica.

Los principios activos también pueden estar atrapados en una microcápsula preparada, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacílico), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed.

(1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen las proteínas de la invención, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Pat. de EE.UU N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como la serie LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli-ácido D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como etilvinilacetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas de la invención pueden permanecer en el cuerpo durante mucho tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden desarrollarse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio de tio-disulfuro, puede lograrse la estabilización modificando los restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Las composiciones de la presente invención para uso oral incluyen comprimidos que contienen el principio o principios activos en una mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o cargas inertes (por ejemplo, sacarosa y sorbitol), agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de cinc, ácido esteárico, sílices, aceites vegetales hidrogenados o talco). Las composiciones para uso oral también pueden proporcionarse 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 de aceite.

La composición farmacéutica que se usará para la administración *in vivo* debe ser estéril. Esto puede llevarse a cabo mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición está liofilizada, la esterilización usando este método puede realizarse antes o después de la liofilización y reconstitución. La composición para administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en una solución. Además, las composiciones parenterales generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o un vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles como una solución, una suspensión, un gel, una emulsión, un sólido o como un polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones pueden almacenarse en una forma lista para su uso o bien en una forma (por ejemplo, liofilizada) que requiere reconstitución antes de la administración.

Las composiciones del presente documento también pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular a tratar, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten negativamente entre sí. Dichas moléculas están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

## X. Administración

Una composición farmacéutica que comprende una Adnectina antimiotiostatina de la presente invención puede administrarse a un sujeto en riesgo de padecer o que exhibe patologías como se describe en el presente documento usando técnicas de administración convencionales que incluyen administración oral, parenteral, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o en supositorios. Preferentemente, la administración de las Adnectinas antimiotiostatina de la invención es parenteral. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal o intraperitoneal. Se prefiere la administración sistémica periférica mediante inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a una dosis que produce los efectos terapéuticos para los que se administra. La cantidad eficaz de una composición farmacéutica a emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y las dianas terapéuticas. Un experto en la materia apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán, por lo tanto, dependiendo, en parte, de la molécula suministrada, de la indicación para la cual se usa la molécula del agente de unión, de la vía de administración y del tamaño (peso corporal, superficie corporal u tamaño del órgano) y/o de la condición (edad y estado general de salud) del paciente.

Por ejemplo, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales tales como ratones, ratas, conejos, perros, cerdos o monos. Un modelo animal también puede usarse para determinar el intervalo de concentración y la vía de administración apropiados. Tal información puede usarse a continuación para determinar las dosis y las vías de administración útiles en seres humanos.

La dosis exacta se determinará a la luz de factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento y puede determinarse usando técnicas convencionales. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del compuesto activo o para mantener el efecto deseado. Los factores que pueden tenerse en cuenta

- 5 incluyen la gravedad de la patología, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, el momento y la frecuencia de administración, la combinación o combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción y la respuesta a la terapia. En general, las Adnectinas antimiotiostatina de la presente invención se administran a aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg por día, preferentemente de 0,01 mg/kg a 10
- 10 aproximadamente 30 mg/kg por día, más preferentemente de 0,01 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg por día. En algunas realizaciones, las Adnectinas antimiotiostatina de la presente invención se administran en dosis semanales de aproximadamente 1 a 50 mg, más preferentemente aproximadamente 10-50 mg. En otras realizaciones, las Adnectinas antimiotiostatina de la presente invención se administran en dosis mensuales de 30-200 mg, preferentemente 50-150 mg y más preferentemente 60-120 mg.
- 15 La frecuencia de la dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la molécula del agente aglutinante en la formulación usada. Normalmente, se administra una composición hasta alcanzar una dosificación que consiga el efecto deseado. Por lo tanto, la composición puede administrarse como una dosis única o como dosis múltiples (en 20 concentraciones/dosis iguales o diferentes) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua. Rutinariamente se realiza un mayor refinamiento de la dosis adecuada. Pueden determinarse las dosis adecuadas mediante el uso de datos de dosis-respuesta apropiados. Por ejemplo, la Adnectina antimiotiostatina puede administrarse diariamente (por 25 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 o mensualmente). Además, como se conoce en la técnica, los ajustes por edad así como para peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la interacción farmacológica y la gravedad de la enfermedad pueden ser necesarias y los expertos en la materia podrán 30 determinarlas mediante experimentación rutinaria. La Adnectina antimiosina se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos.

La administración de una Adnectina antimiotiostatina o una fusión de la misma, y uno o más agentes terapéuticos adicionales, ya sea coadministrados o administrados secuencialmente, puede producirse como se ha descrito anteriormente para aplicaciones terapéuticas. El experto en la materia entenderá que los vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para la coadministración dependen de la identidad del agente terapéutico particular que se administra.

## XI. Métodos de detección y diagnóstico

35 Las Adnectinas antimiotiostatina de la invención también son útiles en una diversidad de aplicaciones de diagnóstico. Por ejemplo, puede usarse una Adnectina antimiotiostatina de la invención para diagnosticar un trastorno o enfermedad asociada a niveles elevados de miostatina. De manera similar, puede usarse una Adnectina antimiotiostatina en un ensayo para controlar los niveles de miostatina en un sujeto que está siendo tratado por una afección asociada a 40 miostatina. Las Adnectinas antimiotiostatina pueden usarse con o sin modificación y están marcadas mediante unión covalente o no covalente de un resto detectable. El resto detectable puede ser cualquiera que sea capaz de producir, ya sea directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tales como H3, C14 o 13, P32, S35 o 1131; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tales como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; o una enzima, tales como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa 45 de rábano picante.

50 Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para conjugar una proteína al resto detectable, incluyendo aquellos 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. and Cytochem.* 30:407 (1982). Los métodos *in vitro* incluyen química de conjugación bien conocida en la técnica, incluyendo química compatible con proteínas, tal como la química de aminoácidos específicos, tales como Cys y Lys. Para unir un resto (tal como PEG) a una proteína de la invención, se usa un grupo de enlace o un grupo reactivo. Se conocen bien en la técnica grupos enlazadores adecuados e incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas y grupos lábiles a esterasas. Los grupos de enlace preferidos son grupos disulfuro y grupos tioéter 55 dependiendo de la aplicación. Para polipéptidos sin un aminoácido Cys, puede modificarse por ingeniería genética una Cys en una ubicación que permita que exista actividad de la proteína mientras se crea una ubicación para la conjugación.

60 Las Adnectinas antimiotiostatina unidas a una fracción detectable también son útiles para formación de imágenes *in vivo*. El polipéptido puede estar unido a un agente radioopaco o radioisótopo, administrarse a un sujeto, preferentemente en el torrente sanguíneo, y se analiza la presencia y ubicación de la proteína marcada en el sujeto. Esta técnica de formación de imágenes es útil en la estadificación y tratamiento de neoplasias malignas. La proteína puede marcarse con cualquier resto que sea detectable en un sujeto, ya sea por resonancia magnética nuclear, radiología u otros medios de detección conocidos en la técnica.

65 Las Adnectinas antimiotiostatina también son útiles como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los

polipéptidos se inmovilizan sobre un soporte adecuado, tales como resina Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica.

5 Las Adnectinas antimiotiostatina pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)).

10 En determinados aspectos, la divulgación proporciona métodos para detectar una molécula diana en una muestra. Un método puede comprender poner en contacto la muestra con unas Adnectinas antimiotiostatina descritas en el presente documento, en donde dicho contacto se lleva a cabo en condiciones que permiten la formación del complejo Adnectina antimiotiostatina-diana; y detectar dicho complejo, detectando así dicha diana en dicha muestra. La detección puede llevarse a cabo usando cualquier técnica reconocida en la técnica, tal como, por ejemplo, radiografía, ensayo inmunológico, detección por fluorescencia, espectroscopia de masas o resonancia de plasmones de superficie. La muestra puede ser de un ser humano u otro mamífero. Las Adnectinas antimiotiostatina pueden marcarse con un resto marcador, tales como un resto radiactivo, un resto fluorescente, un resto cromogénico, un resto quimioluminiscente o un resto hapteno. Las Adnectinas antimiotiostatina pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido.

## **XII. Kits y artículos de fabricación**

20 La Adnectina antimiotiostatina de la invención puede proporcionarse en un kit, una combinación empaquetada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para su uso en los métodos terapéuticos o de diagnóstico de la invención.

25 Por ejemplo, en una realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento o la prevención de los trastornos o las afecciones descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un envase y un marcador. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para la prevención o el tratamiento de la enfermedad o la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es una Adnectina antimiotiostatina de la invención. El marcador en, o asociado con, el recipiente indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas y prospectos con instrucciones de uso.

## **Ejemplos**

40 La invención se describe ahora por referencia a los siguientes ejemplos.

### **Ejemplo 1: Producción de proteínas**

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

45 Los aglutinantes seleccionados clonados en el vector PET9d anteriormente a una etiqueta HIS<sub>6</sub> y transformados en células de *E. coli* BL21 DE3 plysS 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 cultivos nuevos de 5 ml de medio LB (kanamicina 50 µg/ml) para expresión inducible aspirando 200 µl del cultivo durante la noche y dispensándolos en el pocillo apropiado. Los cultivos se cultivaron a 37 °C hasta A<sub>600</sub> 0,6-0,9. Después de la inducción con isopropil-β-D-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.

55 Los sedimentos celulares (en formato de 24 pocillos) se lisaron mediante resuspensión en 450 µl de tampón de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 0,5 M, 1x Cóctel Inhibidor de Proteasa-sin EDTA completo™ (Roche), PMSF 1 mM, CHAPS 10 mM, imidazol 40 mM, lisozima 1 mg/ml, DNasa 30 µg/ml, aprotionina 2 µg/ml, pH 8,0) y se agitó a temperatura ambiente durante 1-3 horas. Los lisados se limpiaron y se volvieron a colocar en un formato de 96 pocillos mediante transferencia a un Unifilter Whatman GF/D de 96 pocillos equipado con un filtro de 96 pocillos, placa colectora de 1,2 ml y se filtró mediante presión positiva. Los lisados aclarados se transfirieron a una placa quelante de níquel o cobalto de 96 pocillos que se había equilibrado con tampón de equilibrio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 de tampón de lavado n.º 1 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 min y este lavado se descartó mediante presión positiva. La proteína se eluyó aplicando 100 µl adicionales de tampón de elución a cada pocillo. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, las placas 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 MgCl<sub>2</sub> 0,5 M se añadieron al fondo de la placa de captura de elución antes de la elución. La proteína eluida se cuantificó mediante un ensayo de proteína total con dominio <sup>10</sup>Fn3 de tipo silvestre como el patrón de proteína.

5 **Expresión y purificación de aglutinantes de proteínas de andamio insolubles basadas en fibronectina**

Para la expresión, el clon o clones seleccionados, seguidos de la etiqueta HIS<sub>6</sub>, se clonaron en un vector pET9d y se expresaron en células de *E. coli* BL21 DE3 plysS. Se usaron veinte ml de un cultivo de inóculo (generado a partir de una única colonia en placa) para inocular 1 litro de medio LB o Tb-medio de expresión durante la noche (autoinducción) que contenía 50 µg/ml de kanamicina y 34 µg/ml de cloranfenicol. Los cultivos en medio LB se incubaron a 37 °C hasta que A<sub>600</sub> 0,6-1,0, momento en el que se indujeron con isopropil-β-tiogalactósido (IPTG) 1 mM y se cultivaron durante 4 horas a 30 °C. Los cultivos cultivados en TB-Medio de expresión durante la noche se incubaron a 37 °C durante 5 horas, en cuyo momento la temperatura se redujo a 18 °C y se dejó crecer durante 19 horas. Los cultivos se recogieron mediante centrifugación durante 30 minutos a ≥10.000 g a 4 °C. Los sedimentos celulares se congelaron a -80 °C. Después de descongelar, el sedimento celular se resuspendió en 25 ml de tampón de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 0,5 M, 1x Cóctel Inhibidor de Proteasa-sin EDTA completo <sup>TM</sup> (Roche), pH 7,4) usando un homogeneizador Ultra-turrax (IKA works) en hielo. La lisis celular se logró mediante homogeneización a alta presión (≥18.000 psi) usando un microfluidizador modelo M-1105 (Microfluidics). La fracción insoluble se separó por centrifugación durante 30 minutos a ≥23.300 g a 4 °C. El sedimento insoluble recuperado de la centrifugación del lisado se lavó con fosfato sódico 20 mM/NaCl 500 mM, pH 7,4. El sedimento se resolubilizó en clorhidrato de guanidina 6 M en fosfato sódico 20 mM/NaCl 500 mM, pH 7,4 con sometimiento a ultrasonidos, seguido de incubación a 37 grados durante 1-2 horas. El sedimento resolubilizado se filtró con un filtro de 0,45 µm y se cargó en una columna Histrap equilibrada con el tampón fosfato sódico 20 mM/NaCl 500 mM/guanidina 6 M pH 7,4. Tras la carga, la columna se lavó durante 25 volúmenes de columna adicionales con el mismo tampón. La proteína unida se eluyó con imidazol 50 mM en fosfato sódico 20 mM/NaCl 500 mM/guanidina-HCl 6 M, pH 7,4. La proteína purificada se replegó mediante diálsis frente a acetato sódico 50 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5 o PBS, pH 7,2.

**Expresión y purificación de aglutinantes de proteínas de andamio solubles basadas en fibronectina**

30 Como una alternativa a la purificación de aglutinantes insolubles, también puede usarse la purificación de aglutinantes solubles. Para la expresión, el clon o clones seleccionados, seguidos de la etiqueta HIS<sub>6</sub>, se clonaron en un vector pET9d y se expresaron en células de *E. coli* BL21 DE3 plysS. Se usaron veinte ml de un cultivo de inóculo (generado a partir de una única colonia en placa) para inocular 1 litro de medio LB o Tb-medio de expresión durante la noche (autoinducción) que contenía 50 µg/ml de kanamicina y 34 µg/ml de cloranfenicol. Los cultivos en medio LB se incubaron a 37 °C hasta A<sub>600</sub> 0,6-1,0, seguido de inducción con isopropil-β-tiogalactósido (IPTG) 1 mM y se cultivaron durante 4 horas a 30 °C. Los cultivos cultivados en TB-Medio de expresión durante la noche se incubaron a 37 °C durante 5 horas, después de lo cual se bajó la temperatura a 18 °C y se dejaron crecer durante 19 horas. Los cultivos se recogieron mediante centrifugación durante 30 minutos a ≥10.000 g a 4 °C. Los sedimentos celulares se congelaron a -80 °C. El sedimento celular descongelado se resuspendió en 25 ml de tampón de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, 0,5 M, 1x 35 Cóctel Inhibidor de Proteasa-sin EDTA completo <sup>TM</sup> (Roche), pH 7,4) usando un homogeneizador Ultra-turrax (IKA works) en hielo. La lisis celular se logró mediante homogeneización a alta presión (≥18.000 psi) usando un microfluidizador modelo M-110S (Microfluidics). La fracción soluble se separó por centrifugación durante 30 minutos a ≥ 23.300 g a 4 °C. El sobrenadante se clarificó usando un filtro de 0,45 µm. El lisado clarificado se carga en una columna Histrap (GE) preequilibrada con fosfato sódico 20 mM/NaCl 500 mM, pH 7,4. Después se lavó la columna con 25 volúmenes de columna del mismo tampón, seguido de 20 volúmenes de columna de fosfato sódico 20 mM/NaCl 500 mM/imidazol 25 mM, pH 7,4 y después 35 volúmenes de columna de fosfato sódico 20 mM/NaCl 500 mM/imidazol 40 mM, pH 7,4. La proteína se eluyó con 15 volúmenes de columna de fosfato sódico 20 mM/NaCl 500 mM/imidazol 500 mM, pH 7,4, las fracciones se combinaron basándose en la absorbancia a A<sub>280</sub> y se dializaron frente a 1x PBS o Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,5 o NaOAc 50 mM, NaCl 150 mM, pH 4,5. Los precipitados se eliminaron filtrando con un filtro de 0,22 µm.

**PEGilación específica de sitio de Adnectinas con polietilenglicol (PEG)**

55 Las Adnectinas que contenían un resto de cisteína modificada se conjugaron con PEG o reactivo bloqueador de cisteína mediante química de adición de Michael entre el grupo tiol de la cisteína y el grupo funcional maleimida del PEG o n-ethylmaleimida (NEM). Para PEGilación con PEG de 40 kDa de 2 ramas (NOF Corporation, PIN GL2-400MA), se añadió PEG en exceso molar a la solución de proteína en condiciones de ligeramente ácidas a neutras. La reacción se dejó avanzar a temperatura ambiente durante 2 horas a durante la noche. Después se aplicó la reacción a una columna de intercambio iónico para separar la Adnectina PEGilada de PEG-maleimida sin reaccionar y la Adnectina no PEGilada. Para la PEGilación con PEG de 40 kDa de 4 ramas (NOF, PIN GL4-400MA) o bis-PEG de 20 kDa (NOF corporation, PIN DE-200MA), la Adnectina se purificó de SP FF en tampón citrato, pH 6,5. Después de la reducción con DTT, la muestra se desalinizó en una columna G25 en el mismo tampón para eliminar DTT y se hizo reaccionar con bis-PEG de 20 kDa o PEG 40K de 4 ramificaciones en una proporción de 2:1 (PEG:Adnectina) durante 2 horas a temperatura ambiente y se detuvo la reacción con la adición de exceso de BME. La muestra se purificó mediante una columna Resource 15S (GE nº 17-0944-10) para eliminar selectivamente las especies no PEGiladas (y las especies monoPEGiladas en el caso de la reacción bis-PEG de 20 kDa). Una columna SEC preparativa final (GE N.º 17-1071-

01, Superdex200, 26/60) se usó (si era necesario) para eliminar especies de alto peso molecular y Adnectina no reactiva. Para preparar una Adnectina bloqueada por CYS, se añadió un exceso molar de 10 veces de NEM (Pierce Chemical) inmediatamente después de la etapa de desalinización G25 mencionada anteriormente en tampón citrato (pH 6,5). Esto se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y la reacción se detuvo mediante la adición de exceso de BME. La muestra se dializó después exhaustivamente frente a PBS. Las Adnectinas conjugadas purificadas se analizaron mediante SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño.

**Purificación y PEGilación de aglutinantes de andamio a base de fibronectina sin etiquetar**

- 10 Los aglutinantes seleccionados se clonaron en un vector pET9d sin etiqueta HIS<sub>6</sub> y se expresaron en células de *E. coli*/BL21 DE3 plysS. Se cultivaron 25 ml de un cultivo de inóculo previamente aislado de una única colonia en placas en un matraz de 125 ml hasta que la DO 600 nm alcanzó 1-2, usando medios de pH 6,85 + 50 ug/ml de kanamicina (Cloruro de amonio, Ácido cítrico, Citrato de amonio férrico, Sulfato de magnesio, Fosfato sódico monobásico monohidrato, Dextrosa anhidra, Glicerol, Fitona Peptona, Extracto de levadura granulado, Sulfato de canamicina, Sulfato de Amonio para ajuste de pH). Se inoculó un fermentador de 10 l (volumen inicial de 7,5 l de medio discontinuo) a una DO final a 600 nm de 0,003. El cultivo se cultivó durante la noche a 25 °C con mezcla constante a 650 rpm y se disolvió a niveles de O<sub>2</sub> >30 %, manteniendo el pH. El día siguiente, la temperatura se cambió a 37 °C y el cultivo se hizo crecer hasta que la DO 600 nm alcanzó 20-25. Una vez alcanzada la DO diana, la temperatura se cambió a 30 °C y el cultivo se indujo con IPTG (concentración final: 1 mM). Un medio de alimentación (Glicerol, Fitona Peptona, Extracto de levadura granulado, Sulfato de kanamicina y Ácido fosfórico para ajustar el pH) se añadió a una velocidad de 40 ml de medio/l de volumen de formación/h. Las células se recogieron mediante centrifugación a 10.000 g durante 30 min a 4 °C. Los sedimentos celulares se congelaron a -80 °C.
- 15 La pasta celular se descongeló en 1x PBS en una proporción de 10 ml de tampón/g de pasta celular. Una vez descongelada, la muestra se desgregó con un homogeneizador UltraTurrax (IKA works) hasta que quedó homogénea. La solución después se pasó dos veces a través de un microfluidizador a 18.000 psi. La fracción soluble se separó por centrifugación durante 30 minutos a ≥ 10.000 g a 4 °C. El sobrenadante se diluyó 1:1 con acetato sódico (pH 4,5) y se aclaró con un filtro de 0,2 µm. El lisado clarificado se cargó en una columna SP FF (SP1; GE) preequilibrado con acetato sódico 50 mM (pH 4,5). Después se lavó la columna con 2 volúmenes de columna del mismo tampón, seguido de 8 volúmenes de columna de acetato sódico 50 mM/NaCl 350 mM, pH 4,5. La proteína se eluyó con acetato sódico 50 mM/NaCl 700 mM, pH 4,5. Las eluciones se combinaron basándose en la absorbancia en A<sub>280</sub>.
- 20 La elución de SP1 se diluyó 1:5 con fosfato sódico 20 mM (pH 6,7) y se cargó en una columna SP FF (SP2) preequilibrada con fosfato sódico 20 mM/NaCl 100 mM, pH 6,7. Después se lavó la columna con 2 volúmenes de columna del mismo tampón. La proteína se eluyó de la columna con fosfato sódico 20 mM/NaCl 0,5 M, pH 6,7. Las eluciones se combinaron basándose en la absorbancia en A<sub>280</sub>.
- 25 La elución de SP2 se diluyó a 100 mM con fosfato sódico 20 mM (pH 6,7) y se cargó en una columna Q FF (GE) preequilibrada con fosfato sódico 20 mM/NaCl 100 mM, pH 6,7. Se recogió el pico FT (que contiene el producto). La columna se lavó con tampón de equilibrio hasta que el pico FT volvió al valor inicial.
- 30 Las Adnectinas que contenían un resto de cisteína modificada se conjugaron con PEG mediante química de adición de Michael entre el grupo tiol de la cisteína y el grupo funcional maleimida del reactivo PEG. La fracción Q FT se PEGiló con PEG ramificado de 40 kDa en una relación molar de PEG a proteína de 2:1. La muestra se incubó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción de PEGilación se diluyó con 2 partes de acetato sódico 50 mM (pH 4,5) y se cargó en una columna SP FF (GE) preequilibrada con acetato sódico 50 mM (pH 4,5). Se lavó la columna con 2 volúmenes de columna del mismo tampón. La proteína PEGilada se eluyó de la columna con acetato sódico 50 mM/NaCl 200 mM, pH 4,5. Las eluciones se combinaron basándose en la absorbancia en A<sub>280</sub>. La proteína PEGilada se concentró usando una membrana Millipore Biomax de 30 kDa. La muestra se filtró sobre un filtro de 0,22 µm y se almacenó a, por ejemplo, 4 °C, -20 °C o -80 °C.

**Expresión transitoria y purificación de aglutinantes de andamio basados en fibronectina con formato Fc**

- 35 Para la generación de ADN, los candidatos seleccionados fueron clonados en un plásmido pDV-16 del que se transformaron células de *E. coli* Top10. pDV-16 es una versión modificada de pTT5 (Yves Durocher, NRC Canadá), en donde se ha introducido la secuencia codificante de Fc de IgG1 humana, precedido por una secuencia señal, y se incluyeron sitios de restricción para permitir la inserción de secuencias codificantes de Adnectina en cualquiera de los extremos de Fc. Las células transformadas se expandieron inoculando 1 l de caldo Luria que contenía ampicilina 100 µg/ml e incubando en una incubadora giratoria a 225 rpm durante 18 horas a 37 °C. Los sedimentos bacterianos se recogieron mediante centrifugación a >10.000 g durante 30 minutos a 4 °C. El ADN plasmídico purificado se aisló usando un kit QIAGEN Plasmid Plus Mega (QIAGEN) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADN purificado se cuantificó usando absorbancia a 260 nm y se congeló a -80 °C antes de su uso.
- 40 Las células HEK 293-EBNA1 (clon 6E) (Yves Durocher, NRC Canadá) se expandieron a 2×10<sup>6</sup> células/ml en 2 l de medio F17 en una bolsa GE Healthcare Wave de 10 litros a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, y se mezcla balanceando en un ángulo

de 8 grados a 18 rpm.

Se preparó ADN para la transfección como sigue: El medio F17 se calentó a 37 °C. El ADN y un reactivo de transfección PEI se descongelaron en una campana de bioseguridad estéril. Se añadió ADN (2,25 mg) a 100 ml de

5 medio F17 calentado en un matraz de cultivo de polipropileno estéril y se mezcló suavemente mediante agitación. En un matraz independiente, se combinaron 6,75 mg de PEI (1 mg/ml) con 100 ml de medio F17 precalentado y se mezclaron suavemente mediante agitación. Los matraces se dejaron reposar durante 5 minutos antes de combinar los contenidos añadiendo la solución de PEI al matraz que contenía el ADN y mezclando suavemente mediante agitación.

10 El contenido del matraz que contenía la mezcla de ADN:PEI se añadió a la bolsa de ondas que contenía las células HEK 293-6E después de incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos en la campana de bioseguridad. La bolsa que contenía las células HEK 293-6E transfectadas se incubó durante veinticuatro horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, y se mezcló balanceando en un ángulo de 8 grados a 18 RPM. Después de 24 horas, se añadieron asépticamente al cultivo

15 100 ml de triptona N1 al 20 % filtrada estéril (Organotechnie, Canadá) disuelta en medio F17. Las células y los medios se recogieron después de 72 horas adicionales de incubación como se describió anteriormente. Como alternativa, la expresión transitoria de HEK en matraces agitados (0,5 l de medio en un matraz de 2 l) puede realizarse con una relación ADN:PEI de 1:2. Las células se separaron del medio acondicionado mediante centrifugación a 6000 g durante 30 minutos a 4 °C. Se retuvo el medio acondicionado, se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se almacenó a 4 °C.

20 20 El medio acondicionado se aplicó a una columna de cromatografía de 10 ml que contenía resina GE MabSelect Sure preequilibrada en PBS a una velocidad de 5 ml/minuto. Después de cargar el medio acondicionado filtrado, la columna se lavó con al menos 100 ml de PBS a temperatura ambiente. El producto purificado se eluyó de la columna con la aplicación de Glicina 100 mM/NaCl 100 mM, pH 3,0. Las fracciones se neutralizaron en pH recogiéndolas en tubos que contenían 1/6 de volumen de Tris 1 M pH 8 o bien agrupando según la absorbancia A280 seguido de la adición de Tris 1 M pH 8 a 100 mM. Si el contenido de especies de alto peso molecular es superior al 5 % después de la elución de la proteína A, entonces la muestra se purifica adicionalmente mediante una columna Superdex 200 (26/60) (GE Healthcare) en PBS. Las fracciones de SEC que contienen monómeros se agrupan y se concentran. El conjunto de proteína A o SEC resultante se dializó exhaustivamente frente a PBS a 4 °C y se filtró de forma estéril usando un

25 30 filtro de corte de 0,22 µm antes de congelarlo a -80 °C.

#### ***Fabricación a granel: Expresión en mamíferos y recuperación primaria: Sistema UCOE CHO***

35 Se creó un banco de células de investigación de mamíferos (RCB) transfectando fusiones de Adnectina-Fc antimiotestatina clonadas en el vector pUCOE que contiene el elemento de apertura de cromatina ubicuo (UCOE) [vector UCOE modificado de Millipore] en células CHO-S. Se estableció un RCB expandiendo células en medios de selección (0,04 % (v/v) de L-glutamina (Invitrogen) y 0,01 % (v/v) de suplemento HT (Invitrogen) en medio CD CHO (Invitrogen)) que contenían puromicina 12,5 µg/ml. Las células con un número de pases bajo se aislaron asépticamente mediante centrifugación, se resuspendieron en medio de banco (L-Glutamina 0,04 % (v/v) (Invitrogen), suplemento HT al 0,01 % (v/v) (Invitrogen) y DMSO al 7,5 % (v/v) en medio CD CHO (Invitrogen)) hasta una concentración final de 1 × 10<sup>7</sup> células/ml. Estas células se congelaron inicialmente en un baño de alcohol isopropílico al 70 % a -80 °C durante la noche y después se transfirieron a nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo al día siguiente.

40 45 El cultivo celular se inició descongelando un único vial de RCB en 25 ml de medio de selección que contenía 12,5 µg/ml de puromicina y expandiendo el cultivo en el mismo medio. Se permitió que las células alcanzaran una concentración entre 1-2 × 10<sup>6</sup> células/ml antes de dividirse nuevamente a 0,2 × 10<sup>6</sup> células/ml. Las células generalmente se mantuvieron entre 2 y 4 semanas antes de sembrar un biorreactor. El cultivo de expansión se pasó por última vez y se dejó crecer hasta el punto en que un biorreactor de 15 l que contenía 8 l de medio de producción (medio Invitrogen CD CHO que contenía suplemento HT al 0,01 % (v/v) (Invitrogen), Glutamax (Gibco) al 0,04 % (v/v) y Pluronic F-68 (Gibco) al 0,005 % (v/v)) pudo sembrarse con una densidad final de 0,2 × 10<sup>6</sup> células/ml. El cultivo del biorreactor se controló diariamente para determinar VCD (densidad de células viables), el porcentaje de viabilidad, pH y concentración de glucosa. El cultivo del biorreactor se alimentó los días 3 y 6 con una adición en bolo del 10 % del volumen total de medio de alimentación. El cultivo se recogió entre el día 7 y el día 9 con un porcentaje de viabilidad >70 %. Durante el cultivo, el cultivo del biorreactor se controló a un pH de 7,1, temperatura de 37 °C, %DO<sub>2</sub> del 40 % y a RPM constantes de 100.

50 55 El día de la recogida, los cultivos del biorreactor se hicieron pasar directamente a través de un filtro de profundidad de 6,0/3,0 µm seguido de una filtración estéril de 0,8/0,2 µm en una bolsa estéril. El cultivo estéril clarificado se almacenó durante la noche a 2-8 °C. Después el cultivo clarificado se concentró mediante TFF de hoja plana usando una membrana de 30.000 kDa. La concentración aproximada fue 6x, dependiendo del título de recogida. El sobrenadante concentrado se filtró después de forma estéril en botellas de PETG y se procesó directamente o se almacenó a -80 °C.

#### ***Purificación por fusión de antimiotestatina-Adnectina-Fc***

60 65 El sobrenadante del cultivo recolectado (puro o concentrado) se carga en una columna MabSelect Protein A previamente equilibrada con PBS. La columna se lava con 5 CV de Tris 50 mM pH 8,0, urea 1 M, PG al 10 %. La

fusión Adnectina-Fc se eluye con glicina 100 mM, pH 3,3, recogiendo el pico en un recipiente que previamente se carga con 1CV de acetato sódico 200 mM pH 4,5. La elución máxima se basa en la absorbancia en A280.

- 5 La elución de proteína A se diluye a pH 3,0 con la adición de ácido cítrico 2 M y se deja a temperatura ambiente durante 1 hora, para la inactivación vírica. La muestra se diluye después con fosfato sódico tribásico 200 mM hasta alcanzar un pH de 4,5. Si es necesario, la solución se diluye aún más con agua para reducir la conductividad por debajo de 10 ms/cm.
- 10 La elución de Proteína A diluida se pasa por un Tosoh Q 600C AR (Tosoh Bioscience), previamente acondicionado con acetato sódico 50 mM pH 4,5, en modo de captura negativa. Se recoge el pico de flujo, basado en la absorbancia en A280. La columna se lava con acetato sódico 50 mM y se destila con NaOH 0,2 N.
- 15 El flujo continuo Q 600C AR se formula mediante filtración de flujo tangencial usando una membrana de fibra hueca (GE) de NMWCO 30K, mezclando muy suavemente el retenido. La fusión Adnectina-Fc se diafiltrá en fosfato sódico 25 mM, trehalosa 150 mM, pH 7,0 durante 6 diavolúmenes y después se concentra hasta una concentración de proteína diana.

#### Ejemplo 2: Evaluación biofísica de proteínas antimiostatina

- 20 **Cromatografía de exclusión por tamaño molecular:** Se realizó cromatografía de exclusión por tamaño estándar (SEC) en Adnectinas candidatas resultantes del proceso de escala media. La SEC del material de escala media se realizó usando una columna Superdex 200 10/30 o una columna Superdex 75 10/30 (GE Healthcare) en un sistema HPLC Agilent 1100 o 1200 con detección UV a A214 nm y A280 nm y con detección de fluorescencia (excitación 280 nm, emisión 350 nm). Un tampón de sulfato sódico 100 mM/fosfato de sodio 100 mM/cloruro sódico 150 mM, pH 6,8 se usó al caudal apropiado para la columna SEC empleada. Se usaron patrones de filtración en gel (BioRad Laboratories, Hercules, CA) para la calibración del peso molecular. Los resultados de la SEC en Adnectinas purificadas a escala media mostraron Adnectina predominantemente monomérica y elución en el rango aproximado de 10 kDa frente a los patrones de filtración en gel globulares (BioRad) como se muestra en las Tablas 9 y 10.
- 30 **Termoestabilidad:** Se realizó un análisis de fluorescencia de barrido térmico (TSF) de Adnectinas HTPP para detectarlas según su estabilidad térmica relativa. Las muestras se normalizaron a 0,2 mg/ml en PBS. Se añadió 1 µl de colorante naranja Sypro diluido 1:40 con PBS a 25 µl de cada muestra y la placa se selló con un sello adhesivo transparente para microplacas de 96 pocillos. Las muestras se escanearon usando una máquina BioRad RT-PCR aumentando la temperatura de 25 °C-95 °C, a una tasa de 2 grados por minuto. Los datos se analizaron usando el software BioRad CFX manager 2.0. Se ha demostrado que los valores Th obtenidos por TSF se correlacionan bien con los valores Tm obtenidos por DSC en un rango de fusión de 40 °C a 70 °C. Este se considera el rango de trabajo aceptable para esta técnica. Se obtiene un resultado de ND ("Sin datos") cuando la pendiente de la curva de transición es demasiado pequeña para permitir que su pico derivado (la tasa de cambio de la fluorescencia con el tiempo) se distinga del ruido. Un resultado "ND" no puede interpretarse como una indicación de termoestabilidad. Se realizaron análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de HTPP dializados y Adnectinas de escala media para determinar sus respectivas Tm. Se exploró una solución de 0,5 mg/ml en un calorímetro de barrido diferencial capilar VP (GE Microcal) aumentando la temperatura de 15 °C a 110 °C, a una velocidad de 1 grado por minuto bajo una presión de 70 p.s.i. Los datos se analizaron frente a una ejecución de control del tampón apropiado usando el mejor ajuste usando Origin Software (OriginLab Corp). Los resultados de los análisis de TSF y DSC se resumen en las Tablas 8-10. Como se muestra en las Tablas 8-10, muchos de los clones exhibieron temperaturas de despliegamiento de más de 60 °C, lo que indica una estructura altamente estable biofísicamente adecuada para la formulación medicinal. Las Adnectinas fueron generalmente tolerantes a la PEGilación o al formateo Fc sin pérdida aparente de estabilidad. En algunos casos, estos formatos proporcionaron una estabilidad mejorada. Por ejemplo, 3116\_A07 como Adnectina no modificada tiene una Tm por TSF de 60 °C, pero cuando se PEGila (ATI-1377) la Tm por DSC fue de 68 °C, y en un formato Fc-X (PRD-1286) la Tm por DSC fue de 66 °C.

#### Ejemplo 3: Ensayo de luciferasa basado en células

- 55 Un plásmido indicador de luciferasa, Elemento sensible a activina (Activin-Responsive Element) (ARE)-luc, se generó ligando nueve repeticiones del ARE en conjunto con el indicador de luciferasa de luciérnaga. El plásmido se transfeció transitoriamente en células HepG2. Se cotransfrió el plásmido pGL4.74[hRluc/TK] para normalizar la eficiencia de transfección. 10.000 células se colocaron en placa por pocillo en una placa de 96 pocillos. Cuando una proteína tal como miostatina, activina o BMP-11, se añade a las células y se une a su receptor afín, se desencadena la señalización SMAD descendente, dando lugar a la unión de un complejo SMAD fosforilado al ARE. La cantidad de, por ejemplo, miostatina, expuesta a las células es directamente proporcional a la cantidad de proteína luciferasa producida y, en consecuencia, se mide la actividad luciferasa. Cuando se añade un antagonista de miostatina (por ejemplo, una Adnectina antimiostatina) simultáneamente con miostatina a las células, la activación del ARE disminuye, lo que lleva a una disminución de la producción y la actividad de la luciferasa.
- 65 En este experimento, (1) Adnectina y miostatina antimiostatina, (2) Adnectina antimiostatina y activina A, o (3) Adnectina antimiostatina y BMP-11 se preincubaron antes de la adición a las células. Se usó miostatina (R&D Systems)

5 a 10-500 pM, activina A (R&D Systems) a 10-500 pM y BMP-11 (R&D Systems) a 10-500 pM. Después de la incubación durante la noche con estas diversas combinaciones, se lisaron las células y se midió la actividad luciferasa (luminiscencia) usando el sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo® (EnVision). La CI50 se define como la concentración de Adnectina necesaria para alcanzar el 50 % de inhibición de la actividad ARE-luciferasa inducida por miostatina.

Como se muestra en las Tablas 8-10, las Adnectinas antimiostatina inhibieron los aumentos mediados por miostatina en la actividad indicadora de ARE-luc.

10 **Ejemplo 4: Ensayo de unión a HTRF**

15 Se usó un ensayo HTRF para medir las afinidades de unión de las Adnectinas antimiostatina a la miostatina. El ensayo fue un ensayo HTRF competitivo que usó el marcador Eu-W1024 como un fluoróforo donante y Alexa FluorO 647 como un fluoróforo aceptor. La Adnectina 1889E01 biotinilada y rhActRIIb-Fc marcado con Alexa Fluor® 647 pueden 20 unirse a la miostatina simultáneamente en dos sitios de unión distintos. La estreptavidina marcada con Eu-W1024 se usa para unir 1889E01 biotinilado. Los dos fluoróforos, Eu-W1024 y Alexa FluorO 647, se reúnen mediante la formación de un complejo 1889E01/miostatina/ActRIIb-Fc, y la señal HTRF puede leerse en un lector de placas EnVision (Perkin Elmer) usando un protocolo HTRF. En presencia de una Adnectina competitiva, la señal de HTRF disminuye. Las CI50 se presentan en las Tablas 8-10.

**Tabla 8:** Caracterización biofísica, resultados del ensayo indicador de luciferasa ARE y del ensayo de unión HTRF para monoAdnectinas antimiostatina.

ID	Tm-TSF	Tm-DSC	Ensayo ARE-luciferasa			HTRF Myo CI50 (nM)
			Myo CI50 (nM)	BMP-11 CI50 (nM)	Activina A CI50 (nM)	
1979_B06		48	0,11	3,3	194	ND
2062_G02		48	205	1500	>1500	ND
2522_C09	40		0,06	1,6	1000	ND
2523_G06	49	49	4,2	46	>2000	ND
2524_C11	ND	55	0,1	0,89	765	ND
2524_D09	54	49	0,06	0,55	84	ND
2524_E10	ND		0,09	5,6	>1000	ND
2524_H05	40		0,09	7,3	>1000	ND
2524_H11	49		0,03	6,2	>1000	ND
2525_B01	ND		0,11	3,2	73	ND
2525_D02	58	55	0,05	1,1	345	ND
2525_D05	ND	69	0,11	3,9	>1000	ND
2525_F07	46		0,13	3,4	>1000	ND
2987_A06		50	0,10	23	283	ND
2987_B04		48	0,12	3,3	239	ND
2987_B09		52	0,01	0,92	172	ND
2987_C02		50	0,06	7,1	464	ND
2987_D05		49	0,11	2,4	2000	ND
2987_E03		51	0,10	2,3	224	ND
2987_E08		52	0,05	2,8	352	ND
2987_F01		49	0,05	6,5	594	ND
2987_F06		52	0,08	20	538	ND
2987_G04		49	0,09	3,3	171	ND
2987_G09		54	0,05	0,91	>2000	ND
2987_H02		51	0,05	11	794	ND
2987_H07		57	0,02	5,5	>400	ND
3006_A10	62		0,08	2,0	>2000	0,15
3007_B08	57		0,06	0,23	423	0,14
3007_C09	63		0,04	0,89	417	0,14
3007_C10	66		0,03	1,0	>2000	0,14

(continuación)

ID	Tm-TSF	Tm-DSC	Ensayo ARE-luciferasa			HTRF
			Myo CI50 (nM)	BMP-11 CI50 (nM)	Activina A CI50 (nM)	
3008_A03	59		0,11	22,6	>2000	0,22
3008_B08	57		0,35	9,3	254	0,37
3008_D04	56		0,09	1,2	720	0,14
3008_F01	63		0,08	0,12	>2000	0,21
3008_G01	57		0,03	0,31	>2000	0,11
3008_G03	58		0,09	1,3	>2000	0,13
3115_D04	64		0,16	3,6	>1000	0,20
3115_E06	62		0,07	2,0	>1000	0,14
3116_A06	64		0,14	13	>1000	0,15
3116_A07	60		0,04	0,5	>1000	0,11
3116_C01	60		0,10	6,7	1000	0,35
3116_C06	61		0,14	8,9	>1000	0,18
3116_H06	60		0,10	1,6	>1000	0,13
3146_A08	69		0,70	48	>1000	0,26
ATI-1267		60	0,06	0,50	644	0,12
ATI-1275		53	0,03	0,14	19	0,19
ATI-1277		sin transición	0,14	1,18	2000	0,38
ATI-1340		54	0,05	4,87	324	0,16

**Tabla 9:** Caracterización biofísica, resultados del ensayo indicador de luciferasa ARE y del ensayo de unión HTRF para Adnectinas antimiotiostatina PEGiladas.

ID	Tm - TSF	Tm-DSC	Ensayo ARE-luciferasa			HTRF
			% de monómero (SEC)	Myo CI50 (nM)	BMP-11 CI50 (nm)	
ATI-1106				177	1414	>2000
ATI-1107	63	98		19	888	>2000
ATI-1266	60	97,8		0,12	0,89	2000
ATI-1276	56	94,6		0,08	0,15	110
ATI-1278	46	93,7		0,27	1,1	>2000
ATI-1338	59			0,28	5,8	>1000
ATI-1339	61			0,28	6,0	>1000
ATI-1341	53			0,03	0,14	14
ATI-1359	57	96,5		0,26	3,1	>1000
ATI-1375	67	>99		0,17	1,6	>1000
ATI-1376	70	>99		0,03	0,83	>1000
ATI-1377	68	>99		0,05	0,78	>1000
ATI-1378	74	>99		0,29	5,4	>1000
ATI-1379	69	>99		0,10	4,3	>1000

5

**Tabla 10:** Caracterización biofísica, resultados del ensayo indicador de luciferasa ARE y del ensayo de unión HTRF para Adnectinas antimiotiostatina fusionadas con Fc.

ID	Tm - TSF	Tm-DSC	Ensayo ARE-luciferasa			HTRF
			% de monómero (SEC)	Myo CI50 (nM)	BMP-11 CI50 (nm)	
PRD-932				0,24	ND	ND
PRD-1171				0,08	0,20	19
PRD-1173				0,02	0,10	6

(continuación)

ID	Tm - TSF	Tm-DSC	% de monómero (SEC)	Ensayo ARE-luciferasa			HTRF
				Myo CI50 (nM)	BMP-11 CI50 (nM)	Activina A CI50 (nM)	
PRD-1174		Tm1 61 Tm2 67 Tm3 83		0,04	0,10	4	0,09
PRD-1175				0,10	0,28	19	0,15
PRD-1177				0,16	0,28	21	0,64
PRD-1178		Tm1 60 Tm2 69 Tm3 84		0,08	0,25	16	0,27
PRD-1180		Tm1 68 Tm2 83		0,07	0,11	14	0,13
PRD-1284				0,02	0,04	44	0,62
PRD-1285		Tm1 67 Tm2 68 Tm3 80	97	0,05	0,03	216	0,49
PRD-1286		Tm1 66 Tm2 68 Tm3 81	99	0,10	0,11	94	0,73
PRD-1287				0,30	0,80	>1000	2,70
PRD-1288		Tm1 65 Tm2 69 Tm3 81	93	0,08	0,10	>1000	0,47
PRD-1301				0,06	0,06	15	0,07
PRD-1302				0,03	0,02	14	0,12
PRD-1303				0,02	0,03	314	0,11
PRD-1304				0,05	0,07	45	0,24
PRD-1305				0,06	0,07	113	0,10
PRD-1471		Tm1 62 Tm2 68 Tm3 81	99	0,16	0,16	60	0,47
PRD-1472		Tm1 62 Tm2 69 Tm3 80	100	0,07	0,05	1000	0,41
PRD-1473		Tm1 63 Tm2 69 Tm3 81	100	0,07	0,06	125	0,73
PRD-1474		Tm1 63 Tm2 69 Tm3 81	100	0,08	0,09	>1000	0,45

**Ejemplo 5: Inhibición mediada por Adnectina antimiostatina de la fosforilación de SMAD2 inducida por miostatina**

5 Las células RH41 de rhabdomiosarcoma humano (DSMZ, Braunschweig, Alemania) se usaron para los análisis de respuesta a inhibición de 12, 2 y 4 puntos descrito a continuación. Las células se retiraron del medio de cultivo y se lavaron para eliminar el suero y se inmovilizaron en medios de ensayo que contenían BSA durante 4 horas. Las células se sacaron del matraz usando verseno y se transfirieron a placas de polipropileno con fondo en V de 96 pocillos a  $5 \times 10^5$  células/pocillo. Para la respuesta a inhibición de 12 puntos, miostatina recombinante 100 pM (R&D Systems), preincubada durante 1 hora con un intervalo de concentración de dilución de 5 veces de Adnectinas a partir de 1000 nM (es decir, 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1,6 nM, 0,32 nM, 0,064 nM, 0,0128 nM, 0,00256 nM, 0,000512 nM, 0,000102 nM, 0,0000204 nM), se añadió a las células. Para la respuesta a inhibición de 4 puntos, 100 pM de miostatina, preincubada durante 1 hora con un intervalo de concentración de Adnectinas (30 nM, 3 nM, 0,1 nM o

10

0,001 nM), se añadió a las células. Para la respuesta a inhibición de 2 puntos, 100 pM de miostatina, preincubada durante 1 hora con un intervalo de concentración de Adnectinas (10 nM o 0,5 nM), se añadió a las células. Las células se trataron con la mezcla de miostatina-Adnectina durante 1 hora a 37 °C para inducir la fosforilación de SMAD2 (pSmad2). La estimulación se detuvo colocando las células en hielo y añadiendo PBS enfriado en hielo. Las células 5 se sedimentaron y se lisaron siguiendo protocolos convencionales y se detectó la fosforilación de SMAD2 mediante un ensayo ELISA (Cell Signaling Technologies). La inhibición lograda por el intervalo de concentración de Adnectinas se representó usando el software GraphPad Prism y se normalizaron los puntos de datos de los controles que dieron 100 % y 0 % de inhibición. La C<sub>50</sub> se define como la concentración de Adnectina necesaria para alcanzar el 50 % de 10 inhibición de la fosforilación de SMAD2 inducida por miostatina. Los datos presentados en la Tabla 11 indican que las Adnectinas derivadas de la optimización de la afinidad de los clones parentales 1979\_B06 y 2062\_G02 inhibieron potente y completamente la fosforilación de pSMAD inducida por miostatina y demostraron valores de C<sub>50</sub> que variaban de 0,78 nM a 0,06 nM. Esto representa una mejora de más de 16-75 veces en los valores de C<sub>50</sub> con respecto a los clones parentales 1979\_B06 (C<sub>50</sub> = 12,8 nM) y 2062\_G02 (C<sub>50</sub> = 59,1 nM).

15 **Tabla 11.** Inhibición de la fosforilación de SMAD2 (pSMAD2) por Adnectinas antimiostatina

Ensayo pSmad2			
ID	Myo C <sub>50</sub> (nM) 12 puntos	Myo C <sub>50</sub> (nM) 4 puntos	% de inhibición de Myo a 10 nM
1979_B06 (también conocido como ATI-1133)	12,8±2,4		
2062_G02 (también conocido como ATI-1134)	59,1±16,2		
2522_C09	0,13		
2523_G06	0,78		
2524_C11	0,14		
2524_D09	0,11		
2524_E10	0,13		
2524_H05	0,13		
2524_H11	0,11		
2525_B01	0,14		
2525_D02	0,36		
2525_D05	0,20		
2525_F07	0,27		
3006_A10			51
3007_B08			97
3007_C09			80
3007_C10			76
3008_A03			87
3008_B08			90
3008_D04			92
3008_F01			86
3008_G01			98
3008_G03			91
3115_D04	0,06		
3115_E06	0,06		
3116_A06	0,27		
3116_A07	0,06		
3116_C01	0,26		
3116_C06	0,73		
3116_H06	0,06		
3146_A08	0,78		

**Ejemplo 6: Mediciones de afinidad de SPR para Adnectinas antimiostatina *cinética de unión de Adnectina usando formato SPR A***

20 El anticuerpo anti-Fc humano (Biacore/GE) se inmovilizó en un chip Biacore CM5 mediante acoplamiento NHS/EDC de acuerdo con las instrucciones del fabricante. ActRllb-Fc (R&D Systems) se capturó en celdas de flujo activo y de

referencia, seguido de la captura de miostatina humana (R&D Systems), BMP-11 humana (GDF-11; R&D Systems) o Activina A humana (R&D Systems) solo en celdas de flujo activo (cada una solubilizada de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante y diluida en tampón de ejecución HBSP). Se aplicó un intervalo de concentración de Adnectina antimiostatina en todas las celdas de flujo en el tampón de ejecución HBSP. La regeneración de la superficie del chip entre ciclos se logró con dos pulsos de 30 segundos de  $MgCl_2$  3 M. Las trazas cinéticas de sensogramas restados de referencia se ajustaron a un modelo de unión 1:1 usando el software Biaevaluation. En la Tabla 12 se muestra un resumen de los datos cinéticos de Biacore.

5 Los datos mostrados en la Tabla 12 indican que las Adnectinas de progenie optimizadas se unen estrechamente a la miostatina, con  $K_D$ s en el intervalo de 0,06-1,47 nM, en comparación con las Adnectinas parentales 1979\_B06 y 10 2062\_G02, que mostraban  $K_D$  de 29 y 49 nM, respectivamente.

10 Despues de la PEGilación, hay cierta pérdida en la afinidad de la miostatina, con  $K_D$  que van de 0,76 a 14,4 nM, 15 aunque no hay ningún efecto de la PEGilación sobre la potencia en el ensayo de ARE-luciferasa (véanse las Tablas 8 y 9).

15 La selectividad de Adnectina sobre BMP-11 varía desde completamente no selectiva a hasta 17 veces, mientras que la unión a la activina es extremadamente débil o inexistente, lo que sugiere una alta selectividad sobre la activina.

20 **Cinética de unión de Adnectina usando formato SPR B (útil para Adnectinas con formato Fc)**

25 Miostatina humana (R&D Systems), BMP-11 humana (GDF-11; R&D Systems) o Activina A humana (R&D Systems) se solubilizó de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante y se inmovilizó en un chip Biacore CM5 a 1-10  $\mu$ g/ml en tampón acetato (pH 4,0 o 4,5) usando un acoplamiento convencional NHS/EDC. Se aplicó un intervalo de concentración de Adnectinas antimiostatina en tampón de ejecución HBSP. La regeneración de la superficie del chip entre ciclos se logró con 60 segundos de NaOH 10-50 mM. Las trazas cinéticas de sensogramas restados de referencia se ajustaron a un modelo de unión 1:1 usando el software Biaevaluation. Para Adnectinas con formato Fc, 30 la cinética de interacción está impulsada por la avidez del Fc bivalente y la miostatina dimérica incluso con una densidad de inmovilización baja. En la Tabla 12 se muestra un resumen de los datos cinéticos de Biacore. Los datos mostrados en la Tabla 12 indican que algunas de las Adnectinas ejecutadas en este formato SPR se unen a miostatina y BMP-11 y también a activina con afinidades similares. La selectividad sustancial sobre la activina en el ensayo ARE-luciferasa, sin embargo, sugiere que la afinidad por la activina puede acentuarse artificialmente en este formato de ensayo SPR.

Tabla 12. Resumen de datos cinéticos de SPR para Adnectinas antimiostatina. Los formatos A y B se describen en el Ejemplo 6.

ID	Myo $K_D$ (nM)	BMP-11 $K_D$ (nM)	Activina A $K_D$ (nM)	Formato
1979_B06 (también conocido como ATI-1133)	29	489	sin unión	A, 25C
2062_G02 (también conocido como ATI-1134)	48,8	697	sin unión	A, 25C
2522_C09	0,51	0,45	sin unión/unión débil	A, 25C
2523_G06	1,465	10,65	sin unión	A, 25C
2524_C11	0,62	0,67	sin unión	A, 25C
2524_D09	0,64	0,81	unión débil	A, 25C
2524_E10	1,34	1,42	sin unión	A, 25C
2524_H05	0,88	0,87	unión débil	A, 25C
2524_H11	1,12	1,22	sin unión	A, 25C
2525_B01	1,29	1,58	unión débil	A, 25C
2525_D02	0,24	0,30	sin unión/unión débil	A, 25C
2525_D05	1,28	1,99	sin unión	A, 25C
2525_F07	0,79	0,97	sin unión/unión débil	A, 25C
2987_H07	0,99	2,25	unión débil	A, 25C
ATI-1267	0,057	0,065	unión débil	A, 25C
ATI-1275	0,15	0,15	unión débil	A, 25C
ATI-1277	0,16	0,14	unión débil	A, 25C
ATI-1107	128	~300	sin unión	A, 25C
ATI-1266	0,76	2,57	unión débil	A, 25C

(continuación)

ID	Myo KD (nM)	BMP-11 KD (nM)	Activina A KD (nM)	Formato
ATI-1276	4,18	8,8	sin unión	A, 25C
ATI-1278	6,04	3,3	sin unión	A, 25C
ATI-1338	1,9	3,8	4,6	B, 37C
ATI-1339	3,6	6,9	6,5	B, 37C
ATI-1359	7,9	35,45	unión débil	A, 25C
ATI-1375	12,6	33,2	unión débil	A, 25C
ATI-1376	8,21	13,4	unión débil	A, 25C
ATI-1377	8,21	14,2	unión débil	A, 25C
ATI-1378	14,4	59,6	unión débil	A, 25C
ATI-1379	9,5	21,6	unión débil	A, 25C
PRD-932	1,43	ND	ND	B, 25C
PRD-1474 (también conocido como ATI-1465)	0,59	ND	ND	B, 37C

**Ejemplo 7: Afinidad de fase de solución para Adnectinas antimiostatina**

- 5 La afinidad de la solución de PRD-1474, una Adnectina antimiostatina fusionada con Fc, para miostatina se midió mediante un ensayo de exclusión cinética (KinExA). Se realizaron valoraciones cuadruplicadas de PRD-1474 con miostatina a una concentración de monómero de 2 nM (n=2), 1 nM (n=1) y 0,7 nM (n=1). La concentración relativa de miostatina libre se midió mediante captura en una matriz sólida ATI-1310 (acoplada a perlas de poliacrilamida mediante una cisteína libre diseñada) seguida de la detección con una construcción marcada con fluorescencia del coreceptor de miostatina, ActRIIB-Ig que puede unirse a la miostatina simultáneamente con la Adnectina. ATI-1310 es una Adnectina relacionada que compite con PRD-1474 por la unión a la miostatina y permite la captura de miostatina no unida. El análisis global de Kd que se muestra en la Tabla 13 da una Kd de 170 pM con un intervalo de confianza del 95 % de 330-60 pM. Las afinidades de PRD-1177 y ATI-1338 también se midieron usando el mismo formato de ensayo. Se realizaron valoraciones por triplicado de PRD-1177 con miostatina a una concentración de monómero de 1 nM (n=2) y 0,8 nM (n=1). Se realizaron valoraciones por triplicado de ATI-1338 con miostatina a una concentración de monómero de 5 nM (n=1), 1,6 nM (n=1) y 1,4 nM (n=1). Estos análisis indican que PRD-1177 se une a la miostatina con un valor Kd global de 250 pM y un intervalo de confianza del 95 % de 340-130 pM (Tabla 13). ATI-1338 se une a la miostatina con un valor Kd global de 850 pM y un intervalo de confianza del 95 % de 1400-330 pM.
- 10
- 15
- 20

**Tabla 13.** Mediciones de afinidad en fase de solución KinExA para la unión de miostatina.

Adnectina	Kd	Intervalo de confianza al 95 %:	
		Kd alta	Kd baja
PRD-1474	170 pM	330 pM	60 pM
PRD-1177	250 pM	340 pM	130 pM
ATI-1338	850 pM	1400 pM	330 pM

**Ejemplo 8: Análisis mutacional de 3116\_A06**

- 25 Para comprender la tolerancia relativa de las posiciones de los bucles a la mutación, se realizaron dos estudios similares pero separados. El primero fue una exploración tradicional con alanina, donde se evaluaron la unión y eficacia de mutaciones discretas de alanina en los bucles de Adnectina 3116\_A06 (SEQ ID NO: 118) en ensayos bioquímicos y basados en células. El segundo estudio consistió en un escaneo mutacional profundo en el que los presentes inventores crearon una biblioteca de mutaciones de sitio único en las mismas posiciones de 3116\_A06 (SEQ ID 118), pero sustituyeron cada posición con 20 de los posibles aminoácidos. Estos componentes de la biblioteca se expresaron después como fusiones de proteína-ARNm y se sometieron a una única ronda de presentación de ARNm (como se describe en la Sección IV), separando los componentes de la biblioteca asociados con la miostatina biotinilada de los que quedan sin unir usando perlas magnéticas de estreptavidina. En este enfoque, la secuenciación de última generación de poblaciones de entrada y unidas permitió la determinación del enriquecimiento/agotamiento relativo de cada secuencia, reflejando su afinidad intrínseca por la miostatina.
- 30
- 35
- 40
- Barrido de alanina:** Se usó mutagénesis dirigida al sitio de PCR para crear mutaciones de alanina de sitio único en 3116\_A06 (SEQ ID NO: 118) en el bucle BC (restos 25-33), Bucle DE (restos 55-58) y bucle FG (restos 80-89). Los clones se expresaron en *E. coli* y se purificaron por HTPP como se describe en el Ejemplo 1. La cromatografía de exclusión molecular (SEC, como se describe en el Ejemplo 2) confirmó que todas las proteínas sustituidas con alanina eran predominantemente monoméricas (Tabla 14). Se realizaron ensayos tanto de ARE-luciferasa (Ejemplo 3) como de HTRF (Ejemplo 4). En el ensayo de unión a competición HTRF, las potencias oscilaron entre CI50 = 1,5 nM y

>100 nM (Tabla 14). La mayoría de las posiciones toleraron hasta cierto punto la sustitución de alanina en el ensayo HTRF, con la excepción de Gly55, Arg56 y Gly57 del bucle DE, para lo cual la unión se redujo drásticamente (CI50 > 100 nM). Un efecto menor se produjo en las posiciones Gly30 del bucle BC y Val80, Thr81 y Tyr88 del bucle FG, que todavía mostraba unión pero con un aumento >10 veces en la CI50 en relación con la secuencia parental ("TS"). En 5 el ensayo basado en células ARE-luciferasa, la potencia de los mutantes osciló entre CI50 = 0,6 nM y >100 nM (Tabla 14). El impacto de las mutaciones de alanina fue generalmente mayor en el ensayo basado en células en comparación con el ensayo HTRF. Gly55, Arg56 y Gly57 del bucle DE y Val80 y Tyr88 del bucle FG mostraron una potencia drásticamente reducida en este ensayo, con CI50 >100 nM. Se observó un efecto más moderado para las posiciones 10 BC Leu26, Pro27, His28, Gly30 y Asn33, y posiciones FG Thr81, Tyr85 y Leu86, que tenían todas CI50 >10 veces la de la secuencia principal.

Tabla 14: Caracterización bioquímica y potencias celulares para mutantes de alanina de 3116\_A06

	<b>Mutación</b>	<b>SEC*</b>	<b>Miostatina HTRF CI50 (nM)</b>	<b>Miostatina ARE-luc CI50 (nM)</b>
<b>BC</b>	TS parental	1	0,3	0,6
	S25A	1	0,8	2,9
	L26A	1	2,3	16
	P27A	1	1,0	10
	H28A	1	0,8	6,2
	Q29A	1	0,7	1,5
	G30A	2	5,1	40
	K31A	1	0,6	2,2
	N33A	1	2,0	9,8
<b>DE</b>	G55A	2	>100	>100
	R56A	1	55	>100
	G57A	1	>100	>100
	V58A	2	1,6	3,3
<b>FG</b>	V80A	1	4,0	>100
	T81A	1	4,9	32
	D82A	1	0,8	1,8
	T83A	1	1,3	1,8
	G84A	1	2,0	3,6
	Y85A	1	2,0	5,5
	L86A	2	1,4	12
	K87A	1	0,8	2,0
	Y88A	1	11	>100
	K89A	1	0,7	1,6

\*SEC 1: Altamente monomérico; SEC 2: Mayormente monomérico

15 **Barrido mutacional profundo:** La secuenciación de alto rendimiento se combinó con la visualización de proteínas para permitir la medición simultánea de la aptitud relativa de cada posible mutante de bucle de un solo sitio, en una escala que sería onerosa para un enfoque tradicional como el descrito anteriormente (para la revisión de los enfoques de "Barrido mutacional profundo", véase Araya *et al.*, Trends in Biotechnology 29: 435-442, 2011; un enfoque similar se ejemplifica aún más en Forsyth *et al.*, mAbs 5: 523-532, 2013).

20 **Construcción de la biblioteca y selección:** Se crearon tres bibliotecas independientes que contenían todas las mutaciones posibles en un solo sitio en cada uno de los tres bucles de 3116\_A06 (SEQ ID NO: 118): bucle BC (posiciones 25-33), bucle DE (posiciones 55-58) y bucle FG (posiciones 80-89). Para cada bucle, se diseñaron múltiples oligonucleótidos que incorporaban individualmente un codón NNK en cada posición, donde N=A, C, G, T y K=G, T. El uso de estos codones degenerados permite la codificación de los 20 aminoácidos (más un codón de parada) 25 en la posición donde se incorpora la NNK. Los oligonucleótidos se ensamblaron mediante PCR de extensión superpuesta para generar las bibliotecas de Adnectina de longitud completa, donde Lib-BC contenía cada mutación del bucle BC de aminoácidos de 3116\_A06, Lib-DE contenía cada mutación del bucle DE de aminoácidos de 3116\_A06, y Lib-FG contenía cada mutación del bucle FG de aminoácidos de 3116\_A06. Las tres bibliotecas se expresaron como moléculas de fusión de ARNm-proteína usando PROfusion de acuerdo con Xu *et al.*, Chemistry & 30 Biology 9: 933-942, 2002. Lib-BC, Las moléculas Lib-DE y Lib-FG PROfusion se seleccionaron por separado frente a miostatina biotinilada 3 nM y las moléculas de unión se capturaron posteriormente en perlas magnéticas de estreptavidina. Los aglutinantes se eluyeron de las perlas usando KOH 100 mM. Las moléculas eluidas de las perlas representan variantes de 3116\_A06 que aún pueden unirse a la miostatina, mientras que aquellos presentes en la biblioteca inicial pero que no se encuentran en la elución representan variantes de 3116\_A06 que no se unen tan bien 35 a la miostatina.

- Código de barras de NGS y mezcla: Dos poblaciones, entrada (antes de la unión de miostatina) y aglutinantes (eluidos de las perlas después de la selección), derivado de cada una de las tres bibliotecas (Lib-BC, Lib-DE y Lib-FG) se recogieron y se amplificaron por separado. A cada población se le añadió un adaptador universal 5' - TruSeq, Adaptador II 3'- Truseq y un código de barras único de 6 nucleótidos por PCR. Después se cuantificaron y se mezclaron individualmente un total de seis poblaciones con códigos de barras (Lib-BC: Lib-DE: Lib-FG = 9:4:10) basándose en el número de restos aleatorios en cada bucle, para obtener estadísticamente números similares de secuencias por posición aleatoria. La muestra agrupada se secuenció mediante secuenciación de próxima generación de extremo pareado (Illumina) MiSeq de 150 pb.
- 10 Ánalisis de datos NGS: Las secuencias de lectura directa de la secuenciación de última generación se agruparon de acuerdo con la población, la posición de mutación y la identidad del aminoácido mutado. Se eliminaron del análisis todas las secuencias de mala calidad y aquellas que contenían múltiples sitios de mutación. Después, la frecuencia de cada secuencia en la población post-selección se dividió por su frecuencia en la población de entrada para derivar una tasa de enriquecimiento (ER). La comparación de los ER de las secuencias parentales (TS, que funciona como control positivo) y las secuencias que contienen un codón de parada (que funciona como control negativo, que representa el ruido de fondo de la supervivencia por casualidad) mostró que la relación entre la señal y el fondo (S/B) varió entre los tres bucles, presumiblemente porque cada biblioteca de bucles se sometió a selecciones individualmente. Por esta razón, cada secuencia se normalizó a los ER de parada promedio y peso promedio para su propio bucle específico, para derivar  $ER^{norm}$ .
- 15

$$ER^{norm} = \frac{ER - ER_{parada}}{ER_{ts} - ER_{parada}}$$

- 20 La exploración mutacional profunda se validó comparando la aptitud relativa de los mutantes de alanina de un solo sitio con los datos bioquímicos de la exploración de alanina tradicional. En general, la correlación fue bastante fuerte (Figura 8). Los ER de NGS definen un perfil de enriquecimiento y agotamiento de mutantes de alanina en los bucles que se correlaciona bien con el impacto observado en los ensayos de HTRF y ARE-luciferasa.

- 25 La CI50 de HTRF bioquímica también se representó directamente frente al  $ER^{norm}$  de NGS para cada mutante de alanina, como se muestra en la Figura 9.
- 30 Basado en las correlaciones de alanina, se establecieron tres categorías en las que se podían agrupar todas las mutaciones de aminoácidos de un solo sitio mediante sus proporciones de enriquecimiento de NGS: Las mutaciones más preferibles ( $ER^{norm} > 0,8$ ), mutaciones más preferibles ( $ER^{norm} > 0,5$ ) y mutaciones preferibles ( $ER^{norm} > 3$  desviaciones estándar del promedio del bucle  $ER_{parada}$ ). Los límites inferiores de  $ER^{norm}$  que definen la última categoría diferían para los tres bucles: BC = 0,25; DE = 0,15; FG = 0,35. Todos los mutantes de sitio único en los bucles de 3116\_A06 se agruparon según sus relaciones de enriquecimiento normalizadas para determinar la tolerancia relativa de cada posición a la mutación (Tabla 15).

**Tabla 15:** Mutaciones de sitio único en las secuencias de bucle de 3116\_A06 que mantienen la unión a la miostatina

Posición	Mutaciones preferibles	Mutaciones más preferibles	Las mutaciones más preferibles
25	X <sub>51</sub>	ACDFHIKLNQRSTVWY	CFISVWY
26	X <sub>52</sub>	LMV	L
27	X <sub>53</sub>	ACDEIKLMNPQRSTVY	P
28	X <sub>54</sub>	ACDEFGHIKLMNQRSTVWY	CDEFGHIKLMNQRSTVW Y
29	X <sub>55</sub>	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	ACDEFGHIKLMNPQRSTV WY
30	X <sub>56</sub>	GS	G
31	X <sub>57</sub>	ACDEFGHIKLMNQRSTVWY	ACGHIKLMNQRSVWY
32	X <sub>58</sub>	ACGLMST	AGLMS
33	X <sub>59</sub>	ACFHNPQRSY	CHNQSY
55		G	G
56		R	R
57		G	G
58	X <sub>60</sub>	ACDEFIKLMNQSTV	CEILMQTV
80	X <sub>61</sub>	ACFILMQTVWY	ACILMV
81	X <sub>62</sub>	ACFGHIKLMNQRSTVWY	CFHILMQRSTVWY
82	X <sub>63</sub>	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	ACDEFGHILMNPQSTVW Y
83	X <sub>64</sub>	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	ACDEFGHIKLMNQRSTV WY
84	X <sub>65</sub>	ACDEFGHIKLMNQRSTVWY	ADEFGHILMNQSTVWY
			AGSTW

(continuación)

Posición		Mutaciones preferibles	Mutaciones más preferibles	Las mutaciones más preferibles
85	X <sub>66</sub>	ACFHILMNPSTVWY	CFILMPTVWY	FIVWY
86	X <sub>67</sub>	ACEFHIKLMNQRSTVWY	CFHIKLMNQRTVWY	FHILMVWY
87	X <sub>68</sub>	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	ACEFGIKLMNPQRSTVW Y	ACFGIKLMTVW
88	X <sub>69</sub>	FWY	WY	WY
89	X <sub>70</sub>	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	ACDEGHKLMNPQRSTV	AGKLMPQR

Usando todos los datos de escaneo mutacional profundo, las posiciones del bucle BC 25, 26, 27, 30, 32 y 33, las posiciones del bucle DE 55, 56 y 57 y las posiciones del bucle FG 80 y 88 parecen ser las más conservadas, donde solo uno o unos pocos tipos de aminoácidos en estas posiciones mantienen la unión a la miostatina. Por otra parte, otras posiciones son altamente tolerantes a la mutación, incluyendo las posiciones 28, 29 y 31 del bucle BC y las posiciones 82, 83 y 87 del bucle FG.

#### Ejemplo 9: Evaluación de la farmacocinética de Adnectina antimiostatina

Para investigar el perfil farmacocinético de Adnectinas con diferentes formatos PEGilados, la Adnectina antimiostatina 2987\_H07 se formateó con PEG de 40 KD de 2 ramas (ATI-1338), PEG de 40 KD de 4 ramas (ATI-1339) y PEG Bis de 20 KD (ATI-1341). Se realizaron estudios de dosis única de administración subcutánea con estas tres Adnectinas PEGiladas en ratones C57BL6. Las concentraciones totales del fármaco se determinaron mediante ensayo ELISA. El inmunoensayo bioanalítico PK para la cuantificación de ATI-1338 usó un ensayo ELISA de formato sándwich convencional, donde el 1338 fue capturado con un anticuerpo monoclonal contra la proteína HIS-TAG, después se detecta con un anticuerpo políclonal anti-PEG. Como se muestra en la Tabla 16, los dos formatos PEGilados de 40 KD, ATI-1338 y ATI-1339, proporcionaron una mejora farmacocinética más prominente (es decir, una semivida más larga ( $t_{1/2}$ ) y exposición normalizada de dosis más alta) que el formato PEGilado Bis-20 KD, ATI-1341.

Tabla 16. Comparación farmacocinética de tres formatos pegilados de Adnectina 2987\_H07

Parámetros de PK	ATI-1338	ATI-1339	ATI-1341
<b>Dosis (mg/kg)</b>	5	3,9	4
<b>Cmáx/Dosis (nM/(mg/kg))</b>	547	370	113
<b>Tmáx (h)</b>	24	24	4
<b>AUC/Dosis (nM*h/(mg/kg))</b>	32	23	2,1
<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>	25	31	16

Estudios de dosis única después de la administración intravenosa y subcutánea de Adnectinas antimiostatina fusionadas con Fc (PRD-1177, PRD-1286 y PRD-1474) se realizaron en ratones C57BL6 para evaluar los efectos de la fusión con Fc sobre los parámetros farmacocinéticos. Las concentraciones totales del fármaco se determinaron mediante ensayos ELISA. El inmunoensayo bioanalítico de PK para la cuantificación de los conjugados de Fc para PRD-1177, 1474 y 1286 usó un ensayo ELISA de formato sándwich convencional que usa tecnología ECL, donde el 1177 fue capturado con un anticuerpo políclonal contra el andamio Adnectina, después se detectó con un anticuerpo anti-IgG humana. Como se muestra en la Tabla 17, las tres Adnectinas fusionadas con Fc tuvieron una semivida más larga (58-172 h) que la Adnectina pegilada ATI-1338 (25 h). Una biodisponibilidad SC más baja probablemente refleja proteólisis durante el tránsito intersticial y linfático de la molécula biológica. La biodisponibilidad SC de las Adnectinas fusionadas con Fc se encuentra dentro de un intervalo razonable basándose en la bibliografía publicada (por ejemplo, Richter *et al.*, AAPS J. 2012;14:559-70).

Tabla 17. Comparación farmacocinética de tres Adnectinas antimiostatina fusionadas con Fc

Parámetros de PK	PRD-1177	PRD-1286	PRD-1474
<b>Dosis (mg/kg)</b>	2	2	2
<b>Aclaramiento (ml/min/kg)</b>	0,017	0,016	0,014
<b>V<sub>dss</sub> (l/kg)</b>	0,093	0,190	0,054
<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>	68	172	58
<b>Biodisponibilidad SC</b>	60 %	100 %	94 %

#### Ejemplo 10: Mecanismo de inhibición de Adnectina antimiostatina

ELISA competitivo: Los ensayos de unión competitiva para evaluar la capacidad de las Adnectinas antimiostatina para competir con la unión del receptor ActRIIB a la miostatina se llevaron a cabo usando ELISA competitivo. Se recubrieron placas Nunc Maxisorp con 2 µg/ml de ActRIIb-Fc (R&D Systems) en tampón de carbonato sódico 0,2 M, pH 9,6, durante la noche a 4 °C. Después de lavar con PBS-T (PBS que contiene 0,05 % de Tween-20), los pocillos se bloquearon con tampón OptEIA (BD Biosciences) durante 1 h a 25 °C con agitación. Miostatina (10 nM; R&D Systems) se preincubó con un rango de concentración de Adnectina o competidor ActRIIb-Fc (0,2 pM a 1 µM) en tampón OptEIA

durante 1 h a 25 °C con agitación. La placa de ensayo bloqueada y recubierta se lavó con PBS-T y después se añadieron mezclas de miostatina/competidor y se incubaron durante 30 minutos a 25 °C con agitación. La placa de ensayo se lavó con PBS-T, después de lo cual se detectó la miostatina unida con políclonal antimiostatina de cabra biotinilada 1:1000 (R&D Systems) diluido en OptEIA, durante 1 h a 25 °C con agitación. Después de lavar con PBS-T, 5 se añadió estreptavidina-HRP (Thermo/Pierce) diluida en OptEIA 1:5000, seguido de incubación durante 30 min a 25 °C con agitación. La placa de ensayo se reveló con TMB (BD Biosciences), se inactivó con ácido sulfúrico 2 N y se leyó la absorbancia a A450. Como se muestra en la **Fig. 10**, ActRIIb-Fc en solución bloquea completamente la unión 10 de miostatina al ActRIIb-Fc recubierto en la placa, como se esperaba. Por el contrario, sin embargo, PRD-1288 (se diferencia de PRD-1474 solo en la secuencia del enlazador), PRD-1285 y PRD-1286 en concentraciones de hasta 1 μM no impiden que la miostatina se una a ActRIIb.

SPR de competición: Ensayos de unión competitiva para evaluar la capacidad de las Adnectinas antimiostatina para competir con los receptores de tipo I y tipo II por la unión a miostatina o BMP11, como un sustituto de la miostatina, también se llevaron a cabo usando SPR en un instrumento Biacore T100, en dos formatos experimentales diferentes. 15 En el "Formato SPR A", las superficies del chip sensor se prepararon inmovilizando 100 ug/ml de proteína A (Pierce) en acetato 10 mM, pH de 4,5 a 4500 RU en un chip sensor CM5 (Biacore/GE Healthcare) usando química de etil(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)/N-hidroxisuccinimida (NHS) convencional, con bloqueo de etanoamina. ALK4-Fc (R&D Systems), ALK5-Fc (R&D Systems), ActRIIB-Fc (producido internamente), un anticuerpo monoclonal antimiostatina/BMP11 (mAb-A) que compite por la unión a la miostatina con ActRIIB pero no compite con 3116A06 20 por la unión a la misostatina (producida internamente) o Adnectina-Fc PRD-1474 en concentraciones de 7-13 μg/ml se capturaron a través de la cola Fc hasta densidades superficiales de 1600 - 4300 RU usando inyecciones de 60 s a 10 μl/min. Los experimentos de competición se realizaron haciendo fluir miostatina 100 nM (R&D Systems) o BMP11 25 (R&D Systems) sobre estas superficies en ausencia o presencia de Adnectina ATI-1523 200 nM a un caudal de 30 μl/min con tiempos de asociación y disociación de 180 s. El tampón de ejecución para los experimentos de inmovilización y competición fue HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,05 % v/v, pH 7,4 y las superficies se regeneraron entre ciclos usando dos inyecciones de glicina 10 mM pH 1,5 durante 30 s a 30 μl/min.

En formato SPR A, BMP11 se une específicamente a las superficies de ALK4-Fc, ALK5-Fc, ActRIIB-Fc, mAb-A y PRD-1474, mientras que la miostatina se une específicamente a ActRIIB-Fc, mAb-A y PRD-1474, pero no ALK4-Fc o ALK5-Fc. 30 Para evaluar el efecto de ATI-1523 sobre la unión de miostatina o BMP11, las respuestas de unión para cada proteína al final de la fase de asociación de 180 s se normalizaron al 100 % y se compararon con las respuestas de unión para miostatina o BMP11 en presencia de ATI-1523 (Tabla 18). ATI-1523 bloqueó completamente la unión de miostatina o BMP11 a la superficie de control PRD-1474, como se esperaba. En los ensayos para evaluar la capacidad de ATI-1523 para bloquear la interacción de la miostatina con ALK4-Fc o ALK5-Fc, BMP-11, que también se une a 35 ALK4-Fc y ALK5-Fc, se usó como sustituto de la miostatina, ya que la miostatina por sí sola no se une significativamente a ALK4-Fc y ALK5-Fc en este formato experimental. ATI-1523 redujo significativamente la señal de unión de BMP11 hacia ALK4-Fc (reducción del 98 %) y ALK5-Fc (reducción del 69 %), lo que sugiere que la Adnectina compite por la unión a miostatina con los receptores de tipo I. Por el contrario, se observó una mayor respuesta de unión para los complejos miostatina/ATI-1523 o BMP11/ATI-1523 en superficies ActRIIB-Fc o mAb-A, lo que sugiere 40 que los complejos miostatina/ATI-1523 o BMP11/ATI-1523 son capaces de unirse a estas superficies, es decir, la Adnectina no es competitiva con ActRIIB-Fc o mAb-A. El gran aumento en la respuesta de unión (aumento >1000 %) para el complejo miostatina/ATI-1523 en las superficies ActRIIB-Fc y mAb-A es consistente con que la Adnectina tenga un efecto solubilizante sobre la miostatina.

45 **Tabla 18:** Respuesta de unión de SPR para miostatina 100 nM o BMP11 100 nM en ausencia o presencia de ATI-1523 200 nM en las superficies de ALK4-Fc, ALK5-Fc, ActRIIB-Fc, mAb-A o PRD-1474.

Analito	ALK4-Fc	ALK5-Fc	ActRIIB-Fc	mAb-A	PRD-1474
Miostatina			100 %	100 %	100 %
Miostatina + ATI-1523			1313 %	1544 %	-2 %
BMP11	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
BMP11 + ATI-1523	2 %	31 %	189 %	258 %	-1 %

Competición de Adnectina usando "formato SPR B": El mecanismo de acción de las Adnectinas antimiostatina se evaluó más a fondo en "Formato SPR B", donde la miostatina o BMP11 (10 μg/ml en acetato 10 mM, pH 4,5) se inmovilizaron directamente en la superficie de un chip sensor CM5 usando química de acoplamiento EDC/NHS hasta una densidad de 985 RU (miostatina) o 530 RU (BMP11). Aquí, la respuesta de unión a los receptores ALK4-Fc (R&D Systems), ALK5-Fc (R&D Systems) o monómero ActRIIB (producido internamente) inyectado solo (2 μM durante 180 s a 30 μl/min), se compararon con las respuestas de unión para estos receptores después de la unión previa de la fusión PRD-1474 de Adnectina-Fc a la superficie (1 μM durante 480 s a 30 μl/min). El tampón de ejecución para los experimentos de inmovilización y competición fue HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,05 % v/v, pH 7,4, y las superficies se regeneraron entre ciclos usando 4 inyecciones de NaOH 50 mM durante 15 s a 30 μl/min. 50

55 En ausencia de PRD-1474, cada receptor se une específicamente a BMP11 inmovilizada, mientras que solo ALK5-Fc y ActRIIB-monómero, pero no ALK4-Fc, se unieron a miostatina inmovilizada. La unión previa de PRD-1474 redujo

significativamente la señal de unión de ALK4-Fc hacia BMP11 (reducción del 70 %) y también redujo la unión de ALK5-Fc hacia la miostatina o BMP11 (reducción del 35-41 %), pero tuvo un impacto mínimo en la unión del monómero ActRIIB a las superficies de miostatina o BMP11, Tabla 19. Estos datos, tomados junto con los datos de competición SPR del "Formato SPR A" (Tabla 18), los datos de ELISA competitivos (Fig. 10) y la inhibición completa de la señalización de miostatina observada en el ensayo ARE-luciferasa (Fig. 11), demuestran que el mecanismo de acción de la Adnectina es el bloqueo del reclutamiento de los receptores de señalización de Tipo I (ALK4/5) y que las Adnectinas no compiten con la unión del receptor de Tipo II (ActRIIB).

**Tabla 19:** Respuesta de unión de SPR para ALK4-Fc 1  $\mu$ M, ALK5-Fc o ActRIIB-monómero en superficies de miostatina o BMP11 inmovilizadas con o sin PRD-1474 pre-unido.

Superficie	Pre-unión de PRD-1474	ALK4-Fc	ALK5-Fc	ActRIIB-monómero
Miostatina	no		100 %	100 %
	sí		55 %	111 %
BMP11	no	100 %	100 %	100 %
	sí	30 %	65 %	92 %

Dado que estas Adnectinas representan las familias de secuencias exemplificadas en la presente invención, y los clones individuales dentro de una familia de secuencias bien definida mantienen el mismo sitio de unión, las secuencias cubiertas por la presente invención actúan bloqueando el reclutamiento de ALK4/5 en el complejo miostatina-ActRIIB.

Los datos farmacocinéticos indican además que los niveles del complejo miostatina-Adnectina se acumulan con el tiempo y que estos complejos se unen a ActRIIb, actuando por lo tanto como un inhibidor negativo dominante de la señalización independiente del fármaco libre. Este mecanismo único distingue las Adnectinas antimiostatina de la presente invención de los anticuerpos antimiostatina descritos en la bibliografía (por ejemplo, documento US 7632499) e indica que las Adnectinas antimiostatina de la invención tienen una actividad aumentada.

**Ejemplo 11: Mapeo del sitio de unión de Adnectina en miostatina usando HDX-MS:**

El sitio de unión de Adnectina en la miostatina se evaluó adicionalmente mediante espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX-MS).

El método de espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX-MS) investiga la conformación de proteínas y la dinámica conformacional en solución monitorizando la tasa de intercambio de deuterio y la extensión en los hidrógenos de amida de la cadena principal. El nivel de HDX depende de la accesibilidad al disolvente de los hidrógenos de la amida principal y de la conformación de la proteína. El aumento de masa de la proteína tras HDX puede medirse con precisión mediante EM. Cuando esta técnica se junta con la digestión enzimática, pueden obtenerse características estructurales al nivel de péptido, permitiendo la diferenciación de los péptidos expuestos en la superficie de aquellos plegados en el interior o de los secuestrados en la interfaz de un complejo proteína-proteína. Normalmente, se realizan el marcaje con deuterio y los experimentos de extinción posteriores, seguido de digestión con pepsina en línea, separación de péptido, y análisis EM.

Debido a que se descubrió que la miostatina sola tenía una solubilidad inadecuadamente baja para HDX-MS en condiciones de pH fisiológicamente relevantes (<10  $\mu$ g/ml), los presentes inventores usaron una estrategia alternativa para aumentar la solubilidad de la miostatina formando complejos con la proteína con el fragmento Fab de mAb-A (Fab-A), que se demostró que no era competitivo con Adnectina usando los experimentos de SPR descritos en el Ejemplo 10. El estado oligomérico de las muestras HDX-MS se caracterizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño acoplada a un detector de dispersión de luz láser de múltiples ángulos (SEC-MALS), donde la masa determinada por MALS del complejo miostatina/Fab-A (~120 kDa) era consistente con la estequiometría esperada de un homodímero de miostatina unido a dos moléculas de Fab-A, y la masa determinada por MALS de miostatina/Fab-A complejo /3116\_A06 (142 kDa) fue consistente con la estequiometría esperada de un homodímero de miostatina unido a dos moléculas Fab-A más dos moléculas 3116\_A06.

Antes de mapear el sitio de unión de Adnectina en la miostatina reconocido por Adnectina 3116\_A06 por HDX-MS, se realizaron experimentos no deuterados para generar una lista de péptidos pépticos comunes para la miostatina a partir de muestras de miostatina/Fab-A (relación molar 1:1 a 30  $\mu$ M cada uno) y miostatina/Fab-A/3116\_A06 (relación molar 1:1:1 a 30  $\mu$ M cada uno), logrando una cobertura de secuencia del 83,5 % para la miostatina. En este experimento, se usó tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) durante la etapa de marcaje, seguido de la adición de tampón de inactivación (tampón fosfato 200 mM con GdnCl 4 M y TCEP 0,5 M, pH 2,5, 1:1, v/v). Para experimentos de mapeo del sitio de unión de Adnectina, se mezclaron 5  $\mu$ l de cada muestra (miostatina/Fab-A o miostatina/Fab-A/3116\_A06) con 65  $\mu$ l de tampón de marcaje HDX (tampón fosfato 10 mM en D2O, pH 7,0) para iniciar las reacciones de marcaje a temperatura ambiente (~25 °C). Las reacciones se llevaron a cabo durante diferentes períodos de tiempo: 20 s, 1 min, 10 min, 60 min y 240 min. Al final de cada período de reacción de marcación, la reacción se inactivó añadiendo tampón de inactivación (1:1, v/v) y la muestra inactivada se inyectó en el sistema de HDX-MS de Waters para el análisis. Se controlaron los niveles de absorción de deuterio de los péptidos pépticos comunes observados en ausencia/presencia de 3116\_A06.

Los datos experimentales obtenidos de mediciones HDX-MS indican que Adnectina 3116\_A06 reconoce un sitio de unión discontinuo de Adnectina compuesto por dos regiones peptídicas en la miostatina:

5 Región 1: LYFNGKEQIIYGKIPAM (85-101); SEQ ID NO: 329

Región 2: PHTHLVHQANP (56-66); SEQ ID NO: 330

10 Basándose en los niveles relativos de absorción de deuterio, las dos regiones peptídicas pueden clasificarse como  
región 1 > 2, siendo la región 1 la que presenta los cambios más significativos en la absorción de deuterio.

**Ejemplo 12: Acoplamiento *in silico* de Adnectina 3116\_A06 a miostatina**

15 Se usó un enfoque computacional para generar un modelo estructural del complejo 3116\_A06-miostatina que era  
consistente con los datos de HDX-MS (Fig. 13). El acoplamiento de proteínas de 3116\_A06 en la estructura de la  
miostatina humana (PDB 3HH2 tomado del Protein Data Bank, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org); Cash *et al.*, EMBO J. 28:2662-2676,  
2009) se realizó usando ZDOCK (Chen y Wang, Proteins 47:281-294, 2002) implementado en el software Accelrys  
Discovery Studio v3.5 (Accelrys). El protocolo ZDOCK usa el acoplamiento de cuerpo rígido de dos estructuras  
proteicas (ligando = 3116\_A06 y receptor = miostatina). Las poses acopladas se filtraron para detectar complejos que  
20 contenían conformaciones de bucles 3116\_A06 FG (restos Thr79 a Tyr88) y BC (restos Ser25 a N33). Se seleccionó  
un complejo preferido basándose en la complementariedad de los restos de la interfaz junto con la correlación de las  
sustituciones favorables del bucle identificadas mediante mutagénesis con Adnectina. La Fig. 13A muestra el sitio de  
unión de ALK4 y el sitio de unión de ActRIIB mapeados en la estructura de miostatina (gris). La Región 1 y la Región  
25 2, que se identificaron mediante los experimentos HDX-MS como se describe en el Ejemplo 11, se indican en negro.  
La Fig. 13B muestra un complejo preferido de acoplamiento, con los bucles BC, DE y FG de 3116\_A06 (negro)  
representados en barras, y las regiones 1 y 2 de miostatina (gris) representadas en espacio-relleno. Varios restos que  
se identificaron como mutaciones favorables al bucle muestran contribuciones clave. Por ejemplo, en el bucle BC de  
30 3116\_A06, los restos Ser25, Leu26 y Pro27 son importantes como limitaciones estructurales para mantener la  
conformación general del bucle. Por el contrario, Ala32 encaja en una pequeña hendidura hidrófoba formada en la  
interfaz compleja y la estructura principal del resto forma enlaces de hidrógeno con miostatina. Las sustituciones más  
preferibles en la posición 32 son Gly o Leu, y se predice que encajarán bien en lugar de la alanina. De forma similar,  
35 Asn33 participa en enlaces de hidrógeno con restos de triptófano cercanos de miostatina. Las sustituciones más  
preferibles en la posición 33 son His y Gln, que también contienen cadenas laterales que pueden contribuir como  
donantes de enlaces de hidrógeno. Los restos en el circuito DE son críticos: las sustituciones más favorables se limitan  
a Gly55, Arg56 y Gly 57 y solo son preferibles las sustituciones conservativas para Val158. En la estructura del modelo,  
40 Arg56 es un resto crítico que contribuye a las interacciones del catión pi con Y86 de la miostatina en la Región 1, así  
como a enlaces de hidrógeno adicionales con la estructura principal y la cadena lateral de otros restos de la Región  
1. Para muchos restos de bucles FG, las sustituciones más preferibles fueron los reemplazos conservativos. Una  
posición crítica identificada fue Tyr88, que tiene interacciones catión pi e interacciones pi-pi con Y55 y otros restos de  
45 la Región 2 de miostatina. El bucle FG también participa en varias interacciones hidrófobas con las Regiones 1 y 2  
identificadas en los experimentos de mutagénesis. Estos cálculos muestran una buena concordancia con los datos  
del experimento HDX-MS y SPR.

**Ejemplo 13: Modelo de ratón *in vivo* de eficacia musculoesquelética**

45 Los ratones B6.SCID macho (9-13 semanas de edad, Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) se alojaron en una  
habitación con temperatura controlada con un ciclo de luz/oscuridad invertido de 12 horas. Había agua y comida  
estándar disponibles a discreción. Los ratones se aleatorizaron y se distribuyeron entre grupos de tratamiento para  
recibir compuestos de control o de prueba de la presente invención basándose en el peso corporal (aproximadamente  
50 20-22 g). Para demostrar la eficacia *in vivo* de los compuestos de la presente invención, los compuestos se  
administraron semanalmente (Adnectinas antimiostatina de fusión Fc) o dos veces por semana (Adnectinas  
55 antimiostatina PEGiladas) mediante inyección subcutánea. Los compuestos de prueba se administraron a los animales  
en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los controles se trajeron únicamente con tampón de reconstitución.  
A los animales de prueba (n=8-10 ratones/grupo) se les administró la dosis durante un período de 14 días por vía  
subcutánea, con, por ejemplo, 5, 6 o 10 mg/kg/semana de un compuesto de la invención. Las mediciones del peso  
corporal se registraron antes de la aleatorización, el día de la aleatorización y dos o tres veces por semana durante  
60 los períodos de tratamiento y al final del estudio. La masa muscular de la parte inferior de las piernas se registró a  
partir de los cadáveres al final del estudio mediante imágenes por análisis de resonancia magnética cuantitativa (IRM,  
Echo Medical Systems, Tex). Los grupos de prueba se compararon con el grupo de control. Los resultados muestran  
que las Adnectinas antimiostatina de la invención aumentaron el porcentaje de peso corporal con respecto al valor  
inicial (Fig. 14) y tuvo efectos anabólicos significativos sobre el volumen del músculo esquelético (Fig. 15), en  
comparación con los ratones de control (por ejemplo, aproximadamente un aumento del 7-10 % en el volumen  
muscular en comparación con el control).

### **Obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM)**

La resonancia magnética para medir el volumen de los músculos de las piernas se realizó en un Bruker PharmaScan 4,7 Tesla con un diámetro de 16 cm (Bruker Biospin, Billerica, Ma. EE.UU.). Para el transmisor y el receptor se usó una bobina de volumen de 62 mm. Después de la recopilación de imágenes del localizador de la parte inferior de la pierna, las imágenes pesadas en T2 se obtuvieron mediante un plano de corte axial. La secuencia rápida de espín-eco (RARE) consistió en un pulso Hermite de 90° seguido de un pulso Hermite de 180° con un TR/TE = 2000/23 ms. Se recogieron once cortes axiales desde la parte superior de la rodilla hasta el tobillo con una dimensión de matriz de 256 × 128 puntos de datos. El campo de visión era de 5 cm por 2,5 cm, con un grosor de corte de 1,25 mm y un factor RARE de 4 y 8 promedios de señal. Los volúmenes de los músculos de las piernas se calcularon sumando todas las áreas de corte axial multiplicadas por el grosor del corte de 1,25 mm para el volumen muscular total en cada pierna. Las imágenes se analizaron como un promedio del área de la región de interés (ROI) mediante análisis de secuencia de imágenes (ISA, Bruker Biospin, Billerica, Ma.). Se dibujaron ROI manuales alrededor del músculo de la pierna excluyendo la piel y el área de grasa subcutánea. El volumen muscular promedio total para ambas piernas se muestra en la **Fig. 15**.

También se realizó IRM para los volúmenes cardíacos como criterio de valoración de seguridad con el mismo escáner de IRM. Después de obtener imágenes localizadoras iniciales del área torácica, se recogieron 9 imágenes axiales desde los grandes vasos hasta el ápice del corazón. Similar al análisis de los músculos de las piernas, las áreas axiales se sumaron y se multiplicaron por el espesor del corte de 1,25 mm para obtener el volumen cardíaco total de cada animal. La resonancia magnética no observó cambios significativos en el volumen del corazón.

### **Estadísticas**

25 Las diferencias entre los grupos se evaluaron usando análisis de prueba t de Student pareado de 2 colas.

### **Ejemplo 14: Eficacia de PRD-1474 sobre el crecimiento muscular *in vivo***

30 Se mantuvieron y trajeron ratones macho B6.SCID (n=10/grupo) como se describe en el Ejemplo 10, con la excepción de que PRD-1474 se administró en las distintas dosis como se indica en la **Fig. 16** y la duración del tratamiento fue de 28 días. PRD-1474 a 1 mg/kg mostró un aumento significativo del 11,1 % en el volumen muscular de la parte inferior de la pierna en comparación con el grupo de control de PBS ( $p<0,0001$ ). Los aumentos significativos en el volumen de los músculos de la parte inferior de la pierna del 27,7 %, el 29,7 % y el 32,8 % también se observaron con PRD-1474 a 10 mg/kg, 30 mg/kg y 100 mg/kg, respectivamente. No se observó ningún cambio en el volumen cardíaco en 35 todos los grupos de dosis de tratamiento en relación con el control. Los datos se presentan como media ± desviación típica. Los distintos grupos de dosificación se compararon mediante ANOVA. (\* $p< 0,0001$ ; #no significativo entre grupos).

40 Los datos demuestran que las Adnectinas antimiotatina de la invención son eficaces en dosis significativamente más bajas que los inhibidores de miostatina descritos anteriormente (por ejemplo, documento US 7632499, J. Clin. Oncol. 30(Supl):Resum. 2516, 2012). Por lo tanto, las Adnectinas antimiotatina de la invención proporcionan una mayor eficacia en dosis más bajas combinadas con una disminución de los efectos secundarios no deseados, cuando se administran solas o en combinación con otros inhibidores de la miostatina u otros fármacos, para tratar la atrofia muscular y las enfermedades metabólicas descritas en el presente documento.

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido que comprende un décimo dominio de tipo II de fibronectina humana (<sup>10</sup>Fn3), en donde el dominio <sup>10</sup>Fn3 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281.  
5
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende un dominio Fc de inmunoglobulina.
3. El polipéptido de la reivindicación 2, en donde el dominio Fc deriva de IgG1.
- 10 4. El polipéptido de la reivindicación 2, en donde el Fc y el dominio <sup>10</sup>Fn3 se fusionan a través de un enlazador seleccionado de SEQ ID NO: 181-209.
5. El polipéptido de la reivindicación 4, en donde el enlazador se selecciona de SEQ ID NO: 181-187.
- 15 6. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 264, 269 o 273.
7. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 273.  
20
8. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de una cualquiera de la reivindicación 1-7 y un portador farmacéuticamente aceptable.
9. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.  
25
10. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 9.
11. Una célula que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 9.
- 30 12. El ácido nucleico de la reivindicación 9, que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 296, 301 o 305.
13. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la composición de la reivindicación 8, para su uso en un método de tratamiento de un trastorno muscular, neurológico o metabólico asociado a desgaste muscular y/o  
35 atrofia muscular, o un trastorno degenerativo óseo.
14. El polipéptido o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el sujeto tiene una distrofia muscular.
- 40 15. El polipéptido o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el sujeto tiene distrofia muscular de Duchenne.

Fig. 1



*Fig. 2*



*Fig. 3*



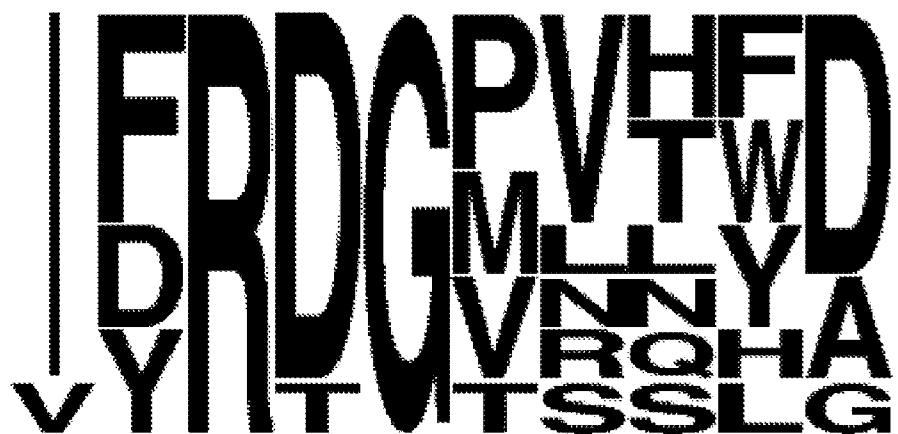
Fig. 4

DADRCI  
HAPAGL  
EVSK  
WVLRH

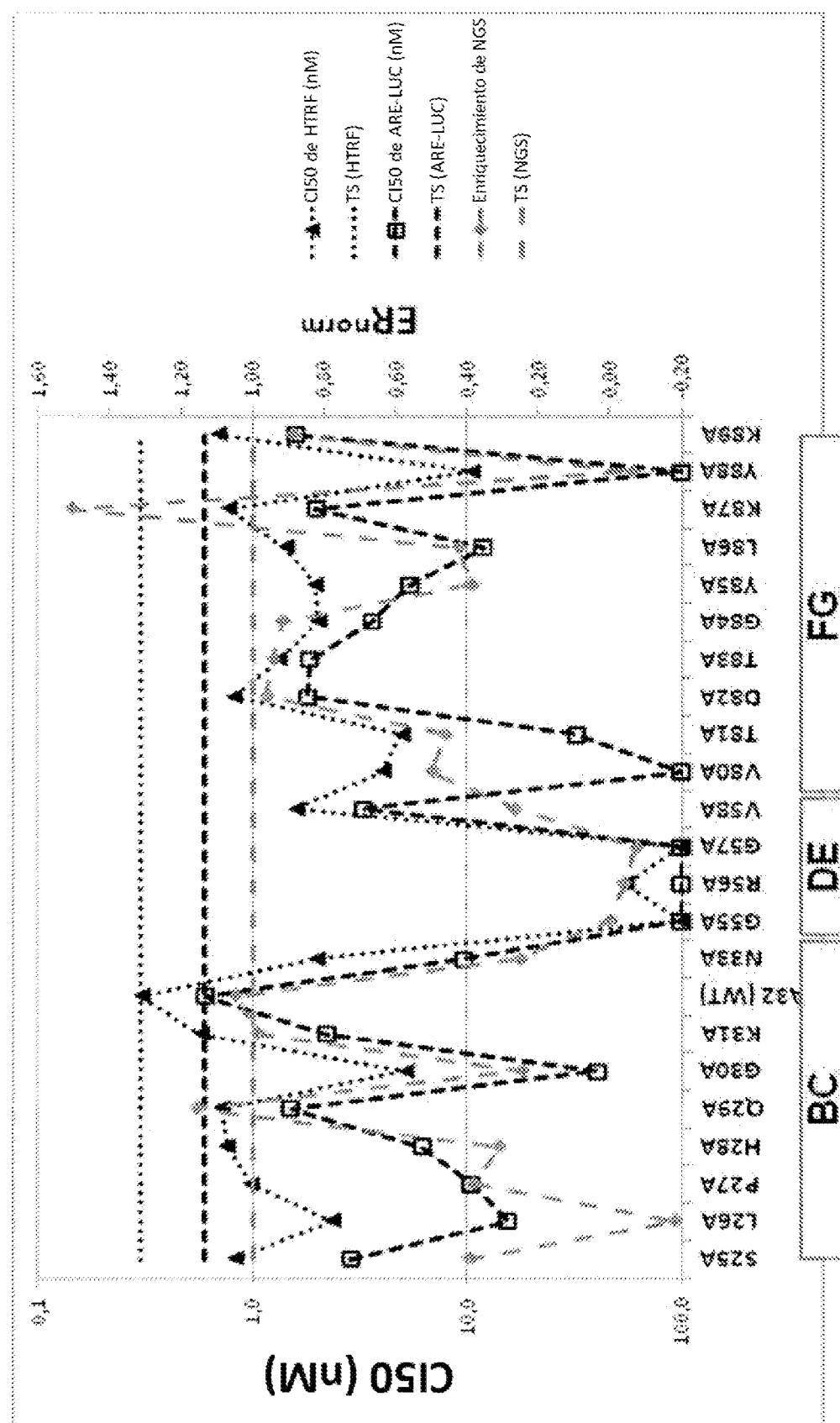
*Fig. 5*

VACAS  
PERGAS  
FORNIT

*Fig. 6*



*Fig. 7*



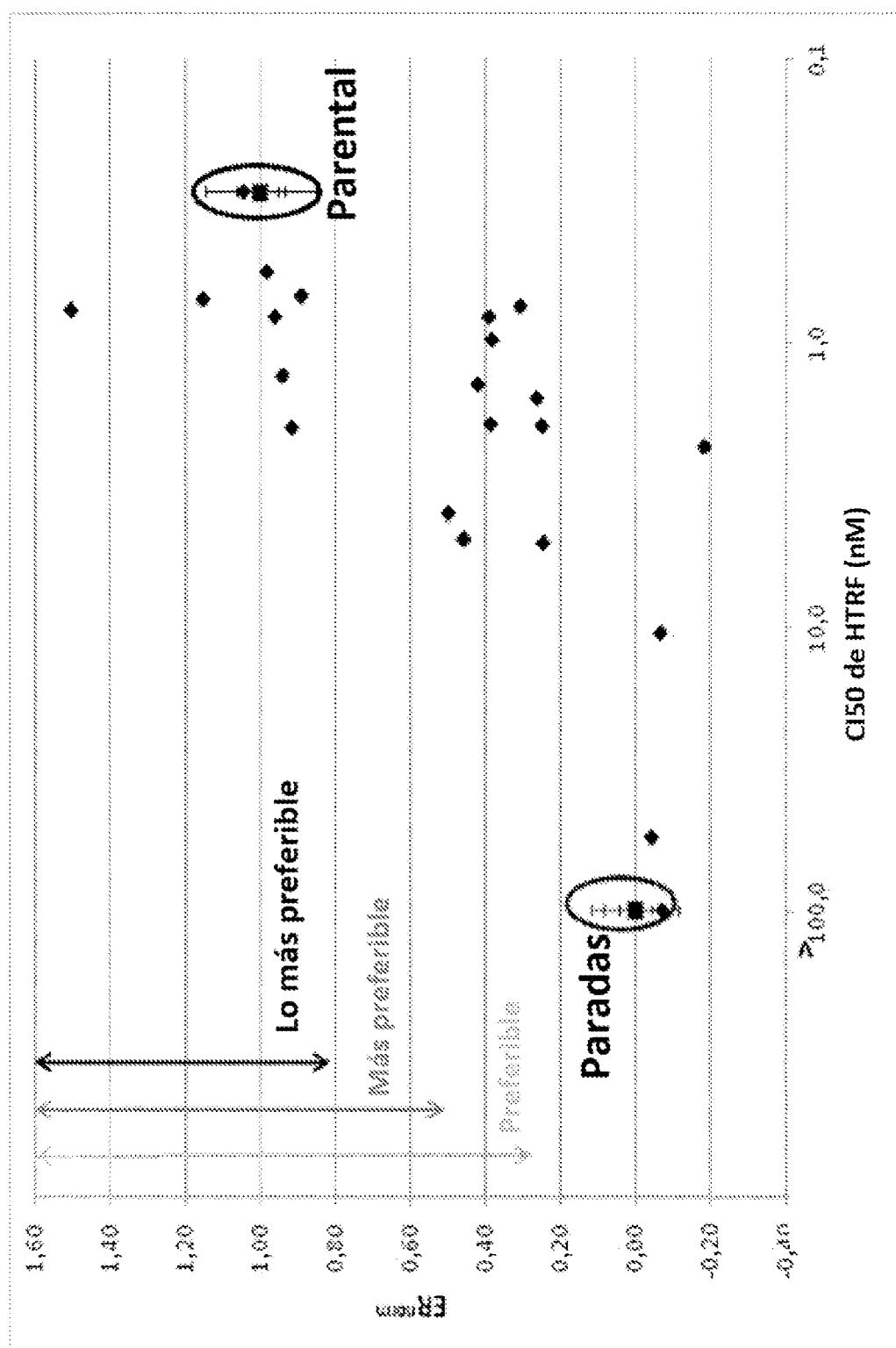


Fig. 9

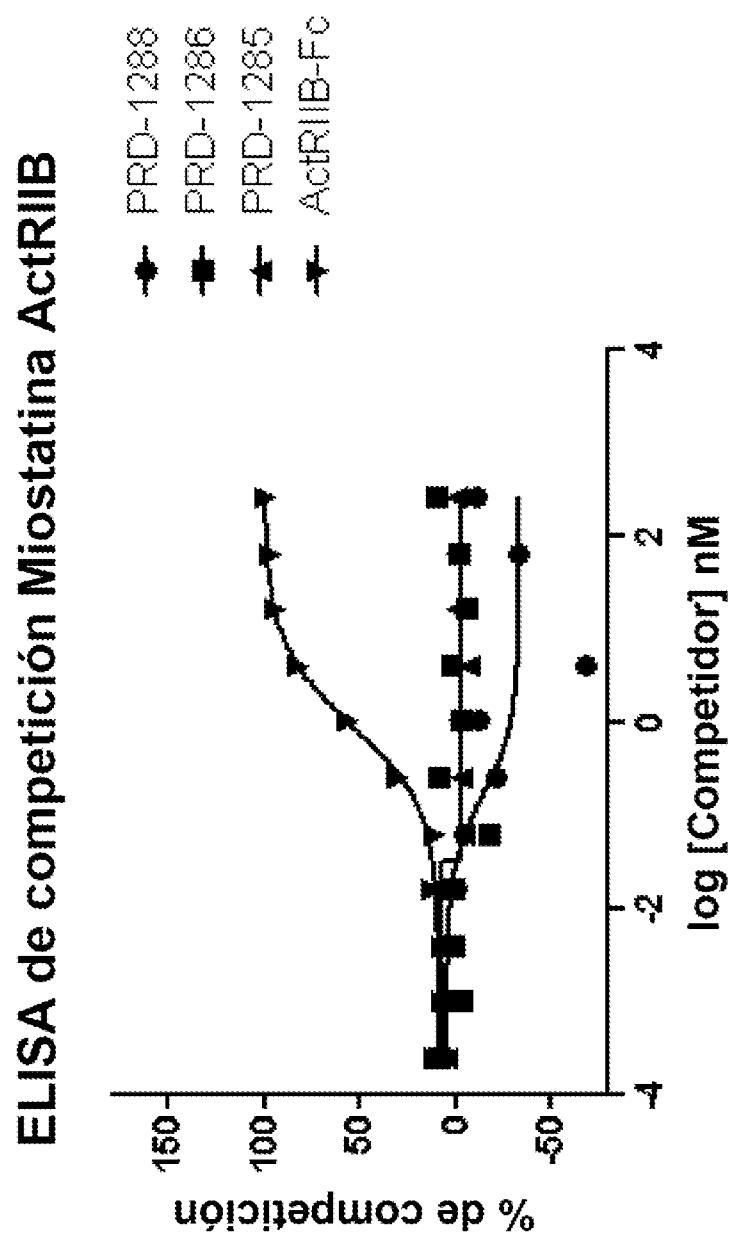


Fig. 10

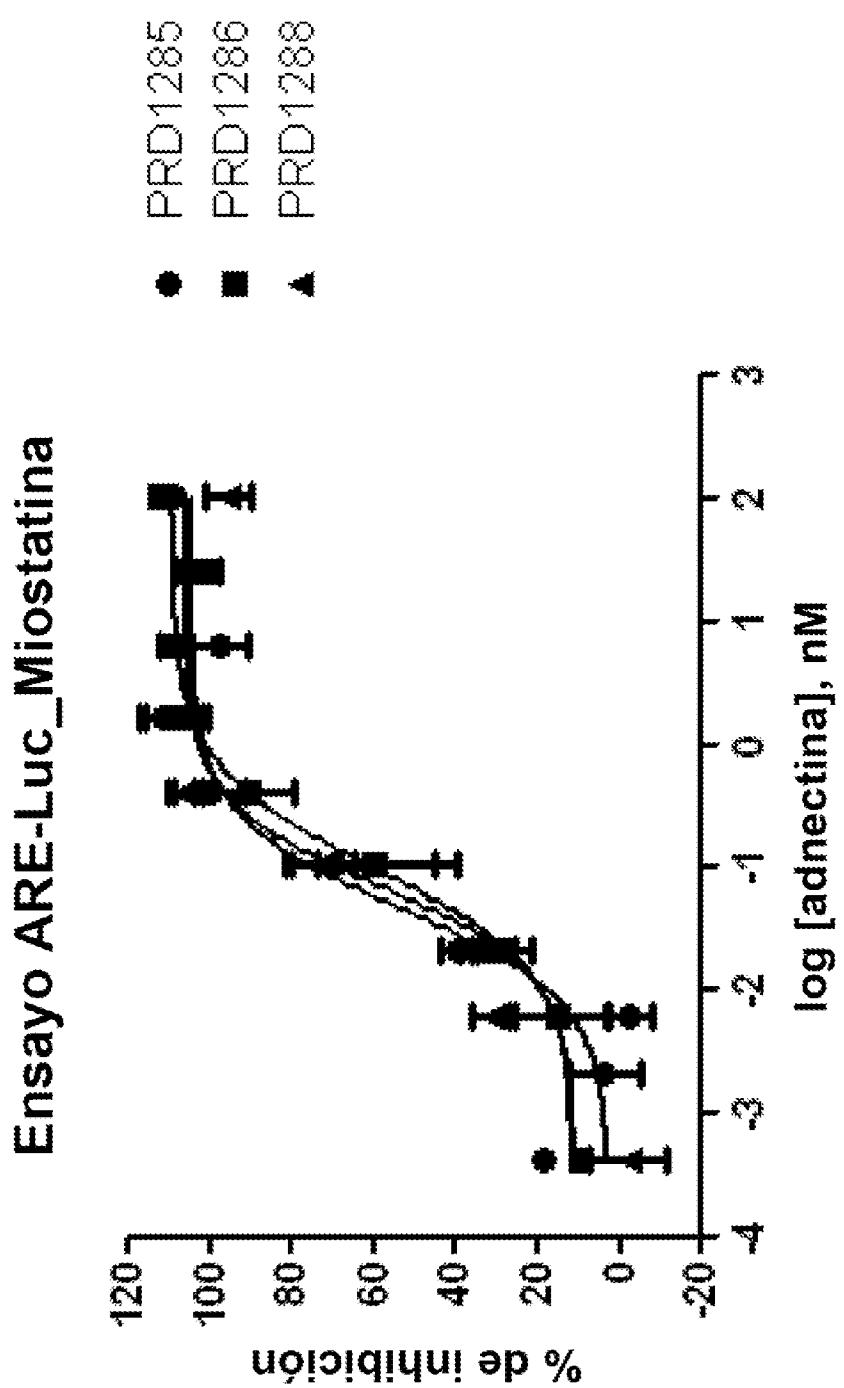
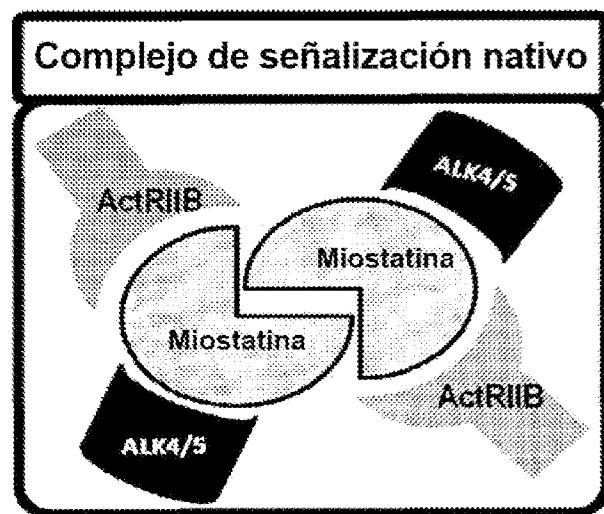
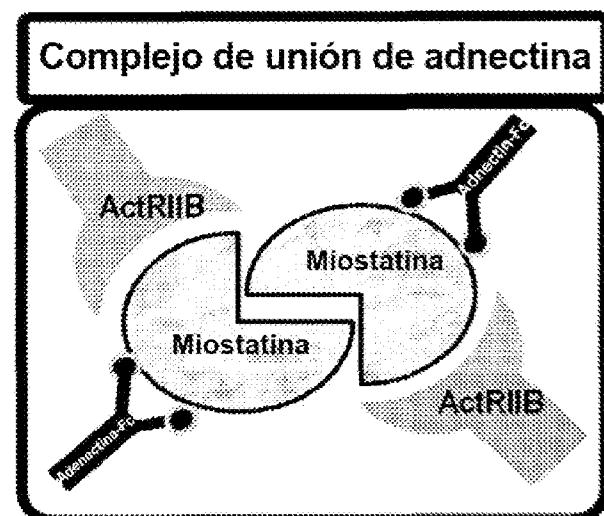


Fig. 11

**A.**



**B.**



**Fig. 12**

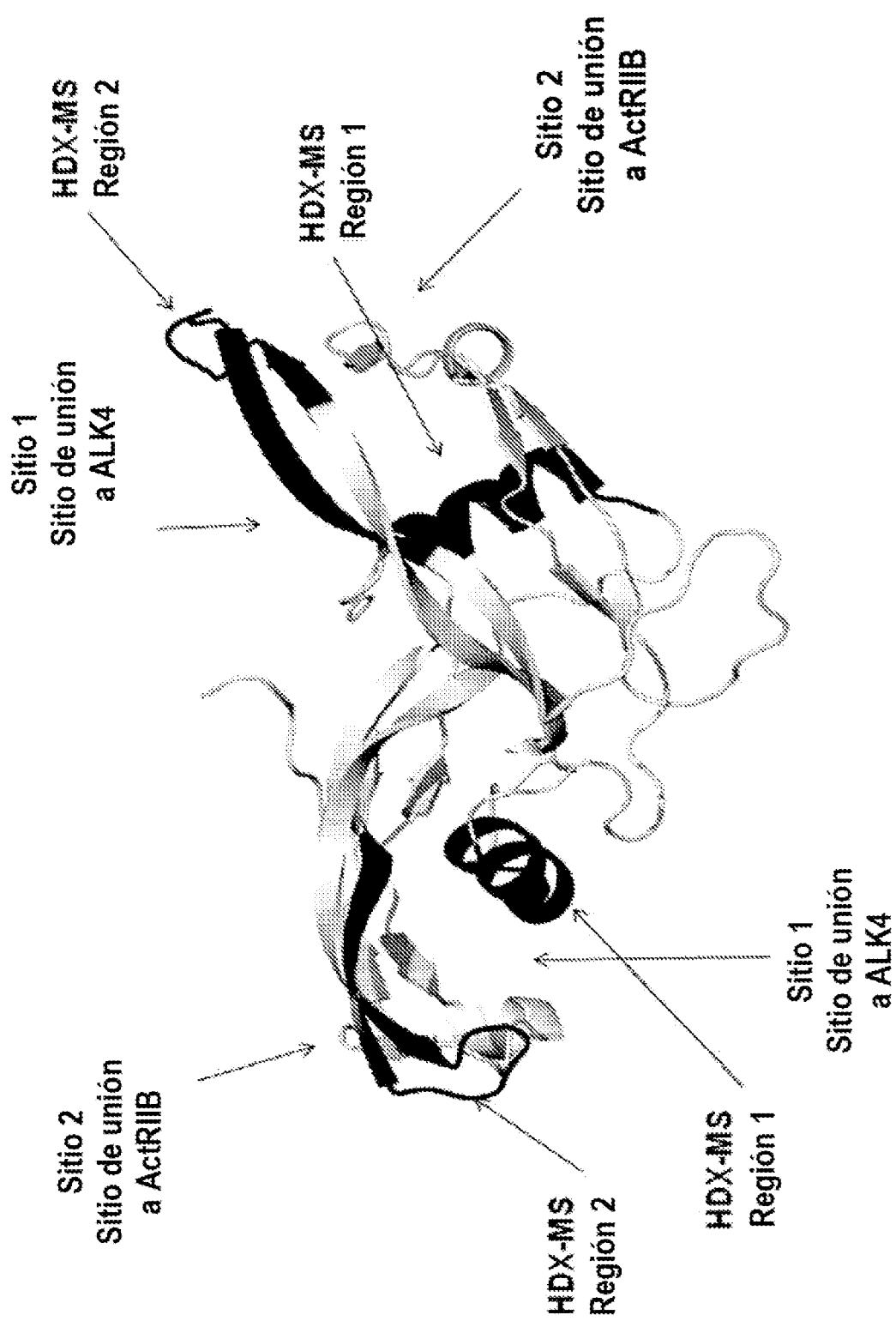


Fig. 13A



Fig. 13B

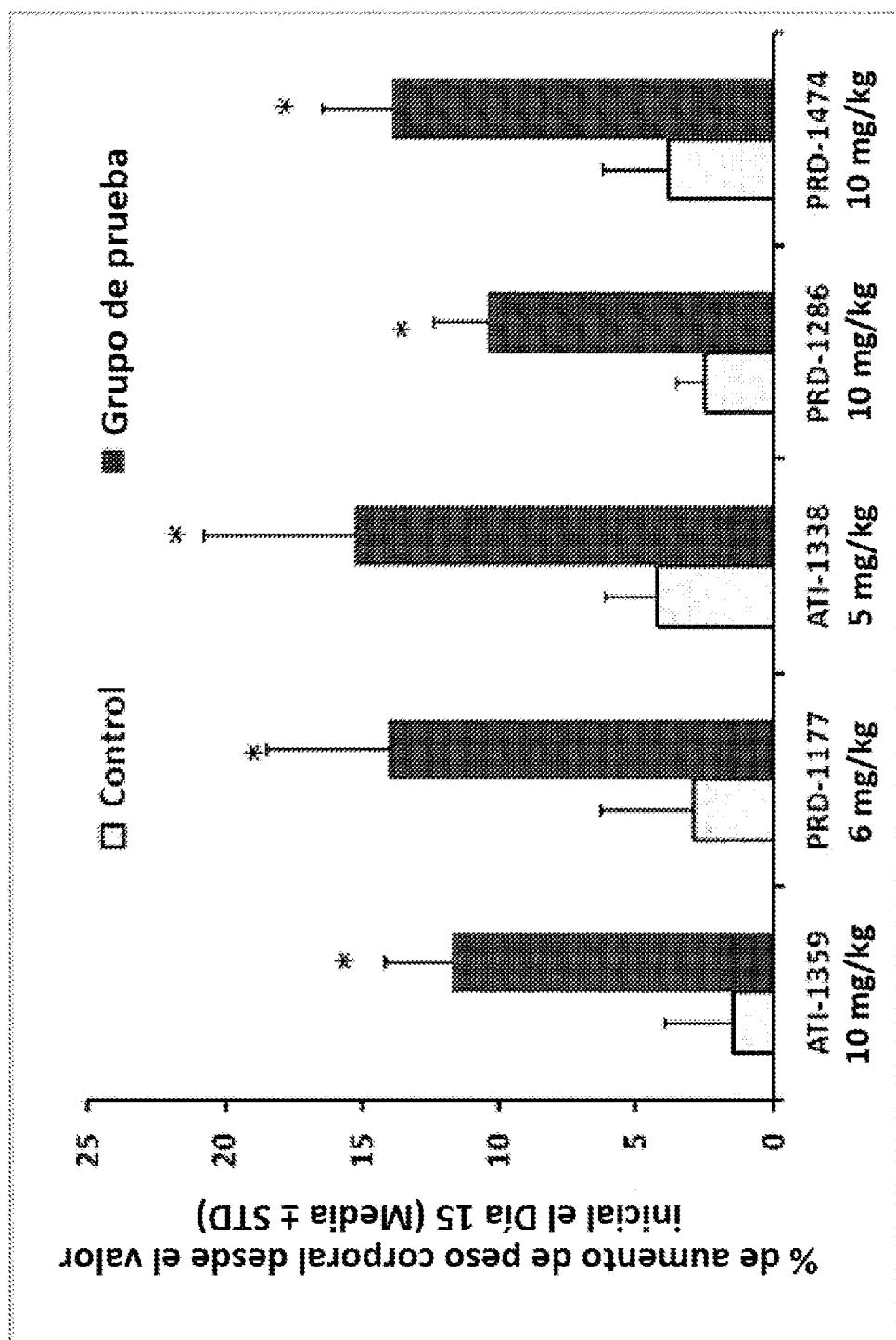


Fig. 14

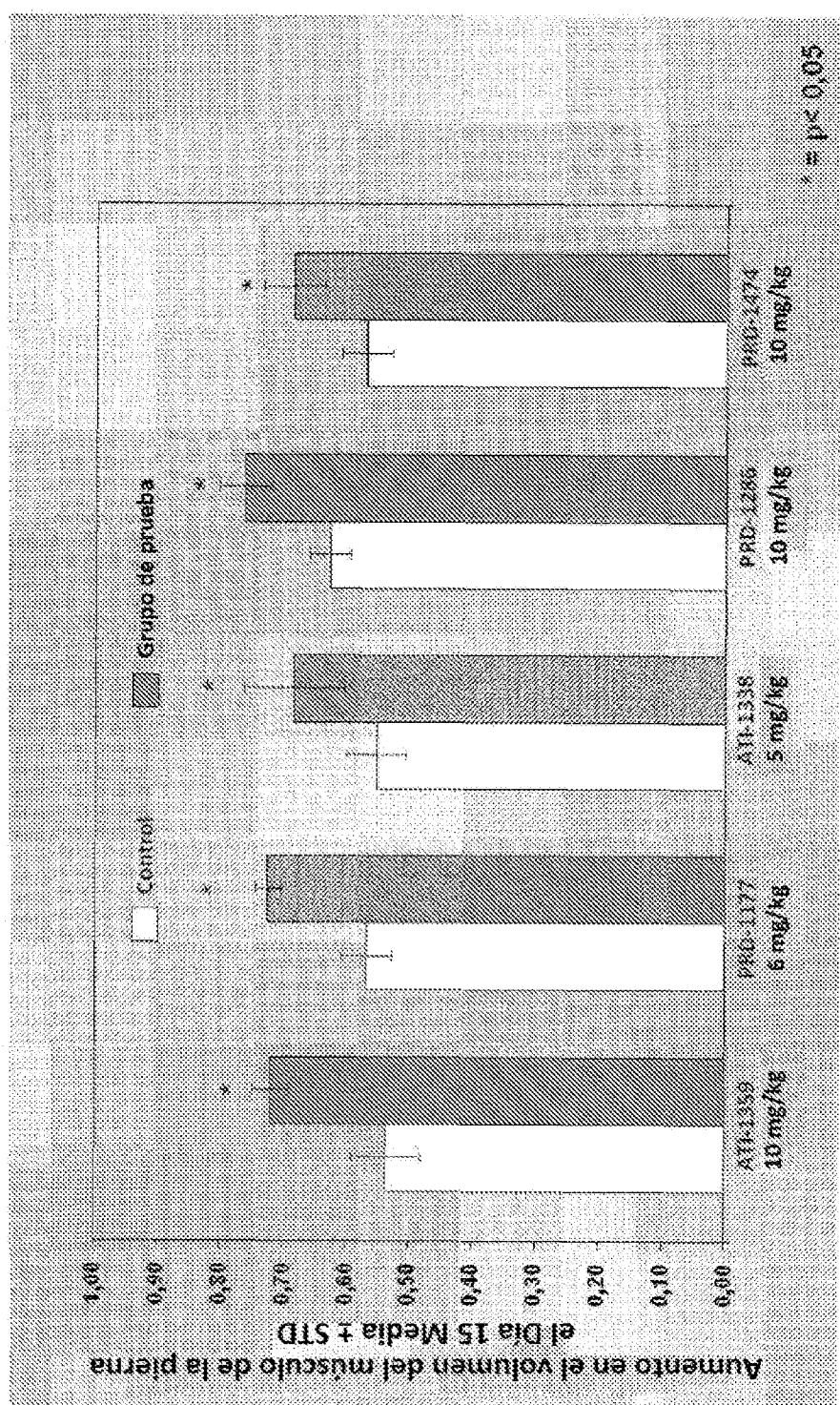


Fig. 15

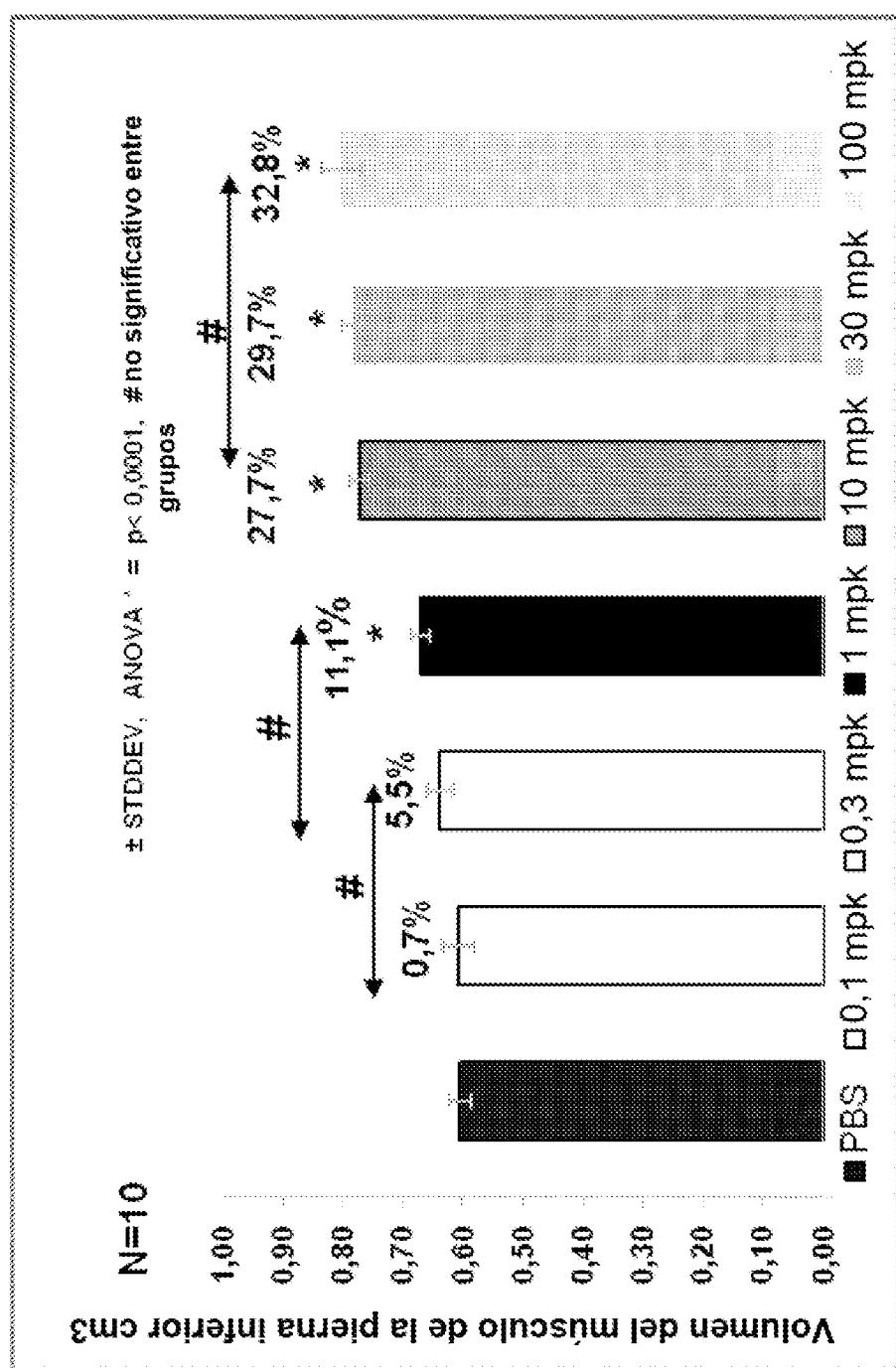


Fig. 16