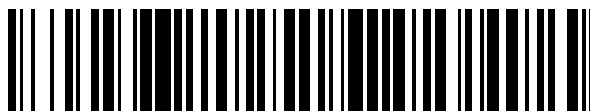


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 285**

51 Int. Cl.:

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2009** **E 11191379 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016** **EP 2439212**

54 Título: **Moléculas de unión con base en fibronectina mejorada y usos de las mismas**

30 Prioridad:

02.05.2008 US 50142 P

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

28.06.2017

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

HASTEWELL, JOHN y
LOEW, ANDREAS

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 620 285 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moléculas de unión con base en fibronectina mejorada y usos de las mismas

Información de prioridad

5 Esta solicitud reivindica la prioridad para la Solicitud de Patente Provisional Estadounidense serie No. 61/050,142, presentada el 2 de mayo, 2008.

Antecedentes de la invención

10 Las moléculas capaces de unión específica a un epítipo objetivo deseado son de enorme importancia como herramientas terapéuticas y de diagnóstico médico. Un ejemplo bien conocido de esta clase de moléculas es el anticuerpo monoclonal. Se pueden seleccionar los anticuerpos que se unen específicamente y con alta afinidad con casi cualquier epítipo estructural. Como resultado, los anticuerpos se utilizan de forma rutinaria como herramientas de investigación y como medicamentos aprobados por la FDA de tal manera que el mercado mundial para anticuerpos monoclonales terapéuticos o de diagnóstico tiene actualmente un valor de aproximadamente 30 mil millones de dólares.

15 Sin embargo, los anticuerpos monoclonales tienen un número de inconvenientes. Por ejemplo, los anticuerpos clásicos con moléculas grandes y complejas. Tienen una estructura heterotetramérica que comprende dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas conectadas juntas por enlaces inter e intra de disulfuro. Esta complejidad estructural impide la fácil expresión de anticuerpos en los sistemas procarióticos simples y requiere que se produzcan anticuerpos en forma más elaborada (y costosa) en sistemas celulares de mamíferos. El tamaño grande de los anticuerpos también limita su efectividad terapéutica debido a que a menudo son incapaces de penetrar de forma eficiente ciertos espacios del tejido. Los anticuerpos terapéuticos, en razón a que poseen una región Fc, de forma ocasional desencadenan la función celular efectora no deseada y/o cascada de coagulación. Adicionalmente, la generación de anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos a menudo involucra procedimientos difíciles y complejos (Véase por ejemplo, Josefina et al., (1997), Nature Biotechnology, 15: 159-163; y Wu et al. (2007) Nature Biotechnology, 25: 1290-1297).

20 De acuerdo con lo anterior subsiste una necesidad en la técnica de moléculas de unión alternas capaces de unión específica a un objetivo deseado con alta afinidad y especificidad. También subsiste una necesidad de un método simple para generar moléculas de unión biespecíficas o multiespecíficas.

Resumen de la invención

30 La presente invención proporciona moléculas de unión con base en fibronectina tipo III (Fn3) que se unen específicamente a un antígeno objetivo y, así, se pueden utilizar en una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. La divulgación se basa en el descubrimiento sorprendente e inesperado de que Fn3 que comprende al menos un bucle inferior modificado conserva la estabilidad estructural y conformacional, y puede unirse a una molécula diana. Además, la divulgación se basa en el descubrimiento de moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas novedosas en las que una molécula de Fn3 única puede unir una o más moléculas objetivo al utilizar los bucles de Fn3 superior e inferior. La descripción también proporciona un método simple, eficiente para generar moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas y multiespecíficas.

35 La invención se refiere a moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas que utilizan los bucles EF inferiores para unir uno o más objetivos ("moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas inferiores") por ejemplo, albúmina de suero humana (HSA), lizozima. Estas moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas inferiores se pueden ligar (por ejemplo, en forma similar a perla) para formar moléculas de unión con base en Fn3 multiespecíficas que se unen de forma simultánea a múltiples objetivos, y/o se pueden conjugar a una o más unidades estructurales sin Fn3 (por ejemplo, unidades estructurales funcionales), tales como albúmina de suero humana (HSA), una región Fc de anticuerpo o polietilenglicol (PEG), por ejemplo, para mejorar la semivida y estabilidad de la molécula de unión con base en Fn3.

40 En otra descripción, las moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas inferiores se pueden combinar con moléculas de unión con base en Fn3 que utilizan los bucles BC, DE, o FG superiores para producir moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas. La descripción proporciona adicionalmente moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas que se unen a dos o más objetivos de forma simultánea. Estas moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas también se pueden ligar (por ejemplo, en forma similar a perla) para formar moléculas de unión con base en Fn3 multiespecíficas que se unen de forma simultánea a múltiples objetivos, y/o se pueden conjugar a

una o más unidades estructurales sin Fn3 (por ejemplo, unidades estructurales funcionales) como se describió anteriormente. La descripción proporciona adicionalmente métodos de detección de colecciones de moléculas de unión con base en Fn3 para unión específica a un objetivo, normalmente una proteína objetivo, así como también métodos para fabricar moléculas de unión con base en Fn3 en, por ejemplo, sistemas procarióticos o eucarióticos.

5 Todavía adicionalmente, la invención proporciona composiciones (por ejemplo, composiciones terapéuticas) que comprenden moléculas de unión con base en Fn3, y utiliza dichas composiciones en una variedad de aplicaciones terapéuticas y diagnósticas.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión con base en Fn3 que comprende un dominio Fn3, en donde por lo menos un aminoácido de la región de bucle EF inferior del dominio de

10 Fn3 se altera en comparación con un dominio de Fn3 tipo natural (por ejemplo, SEQ ID NO:1) para crear una secuencia de unión sin Fn3 que se une a un objetivo específico. En una realización particular, los residuos de aminoácidos alterados en la región de bucle EF incluye uno o más de los aminoácidos en las posiciones 60, 61, 62, 63 ó 64 de la SEQ ID NO:1. La secuencia de unión sin Fn3, por ejemplo, puede ser toda o una porción de una región CDR (por ejemplo, una región CDR de anticuerpo) o un receptor de célula T.

15 En otro aspecto, la descripción se refiere a una molécula de unión con base en Fn3 que comprende un primer dominio de Fn-3, en donde por lo menos un aminoácido en una o más de las regiones de bucle inferiores AB, CD o EF o terminal C del dominio de Fn3 se alteran en comparación con el dominio de Fn3 tipo natural que comprende la SEQ ID NO: 1 para crear una secuencia de unión sin Fn3 que se une a un primer objetivo, y en donde por lo menos un aminoácido en una o más de las regiones de bucle inferiores AB, CD o EF o terminal C de un segundo dominio

20 de Fn3 se alteran en comparación con el dominio de Fn3 tipo natural que comprende la SEQ ID NO: 1 para crear una secuencia de unión sin Fn3 que se une a un segundo objetivo.

En otro aspecto, la descripción proporciona una molécula de unión con base en Fn3 biespecífica que comprende un dominio de Fn3, en donde por lo menos un aminoácido en una o más de las regiones de bucle AB, CD, EF inferiores o terminal C del dominio de Fn3 se alteran en comparación con un dominio de Fn3 tipo natural (por ejemplo, SEQ ID

25 NO:1) para crear una secuencia de unión sin Fn3 que se une a un primer objetivo, y en donde por lo menos un aminoácido en una o más de las regiones de bucle superiores BC, DE o FG del dominio de Fn3 se alteran en comparación con un dominio de Fn3 tipo natural que comprende (por ejemplo, SEQ ID NO:1) para crear una secuencia de unión sin Fn3 que se une a un segundo objetivo. En una descripción particular, los residuos de aminoácidos alterados en las regiones de bucle AB, CD, EF inferiores o terminal C incluye uno o más de los aminoácidos en la posición de 15, 16, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 60, 61, 62, 63, 64, 93, 95, o 96 de la SEQ ID

30 NO: 1, y los residuos de aminoácidos alterados en las regiones de bucle superiores BC, DE o FG incluye uno o más de los aminoácidos en la posición de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 76, 77, 78, 79, 80, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, o 88 de la SEQ ID NO: 1. De acuerdo con lo anterior, dichas moléculas de unión con base en FN3 biespecíficas de la descripción se unen de forma simultánea a dos o más objetivos presentes en la

35 misma molécula, o en diferentes moléculas.

En otro aspecto, la descripción proporciona, moléculas de unión con base en Fn3 multiespecíficas que comprenden dos o más moléculas de unión con base en Fn3 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, ligadas (por ejemplo, en forma similar a perla), de tal manera que unen dos o más objetivos en la misma molécula o en diferentes moléculas.

40 "Moléculas de unión con base en Fn3" de la invención, también se pueden unir a, o ligarse a, una o más unidades estructurales sin Fn3 que, por ejemplo, aumentan la semivida de la molécula de unión con base en Fn3 cuando se administra in vivo. Las unidades estructurales sin Fn3 adecuadas incluyen, pero no se limitan a, regiones Fc de anticuerpo, albúmina de suero humana (HSA) (o porciones de las mismas), polietilenglicol (PEG) y/o polipéptidos que se unen a las proteínas anteriormente mencionadas u otras proteínas de suero con semivida en aumento, tal como,

45 por ejemplo, transferrina. De acuerdo con lo anterior, en otro aspecto, la invención proporciona conjugados que incluyen una o más moléculas de unión con base en Fn3 unida a una unidad estructural sin Fn3.

En aún otra descripción, las moléculas de unión con base en Fn3 y conjugados de la invención comprenden adicionalmente por lo menos un residuo de aminoácido modificado en comparación con un dominio de Fn3 tipo natural (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) para adherir una unidad estructural funcional. En una descripción, el aminoácido modificado comprende sustitución o adición de una cisteína o residuo de aminoácido no natural en una o más regiones seleccionadas de una región de bucle, una región de hebra beta, una región de hebra similar a beta, una región de terminal C, la región entre el terminal C y la hebra beta del terminal C principal (o hebra similar a beta), una región de terminal N, y la región entre el terminal N y la hebra beta del terminal N principal (o hebra similar a beta).

55 Las moléculas de unión con base en Fn3 de la descripción se pueden basar en secuencias Fn3 tipo natural, (por ejemplo, Fn3 humana que tiene la secuencia de aminoácido mostrada en la SEQ ID NO: 1) así como también versiones modificadas de dichas secuencias tipo natural, como se discute aquí. Por ejemplo, la molécula de unión

con base en Fn3 puede ser una quimera que tiene hebras beta Fn3 derivadas de por lo menos dos módulos de fibronectina diferentes.

También se proporciona por la invención composiciones que comprenden las moléculas de unión con base en Fn-3 y conjugados de la invención, formuladas con un portador adecuado.

5 Las moléculas de unión con base en Fn-3 y conjugados de la invención se pueden utilizar en una variedad de aplicaciones terapéuticas y diagnósticas que incluyen, pero no se limitan a, aplicaciones en los que se pueden utilizar los anticuerpos. Dichas aplicaciones incluyen, por ejemplo, tratamiento y diagnóstico de enfermedades autoinmunes, cánceres y enfermedades infecciosas.

10 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones, tales como una colección de ácidos nucleicos variegada que codifica moléculas de unión con base en Fn3.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un diagrama de cintas de una molécula de unión con base en Fn3 con residuos de bucle o estructura principal que constituyen las superficies de unión a ligando resaltadas.

15 La Figura 2 representa un esquema que muestra las caras de bucle superior e inferior de Fn3.

La Figura 3A es un esquema de una molécula de unión a Fn3 mono-específica que muestra que cualquiera de los bucles superiores o inferiores se puede modificar para unirse a un único objetivo, Objetivo A.

20 La Figura 3B es un esquema de una molécula de unión con base en Fn3 bio-específica que muestra que se pueden modificar los bucles superior e inferior para unir a un único objetivo, Objetivo A. La molécula de unión con base en Fn3 bio-específica también se puede utilizar para unirse a dos objetivos diferentes, donde el bucle superior se une a un objetivo, Objetivo A y los bucles inferiores se unen a un segundo objetivo, Objetivo B.

La Figura 4A es un esquema de una molécula de unión con base en Fn3 multi-específica que comprende dos dominios de Fn3 mono-específicos inferiores con modificaciones a los bucles inferiores que se ligan.

25 La Figura 4B es un esquema de una molécula de unión con base en Fn3 multi-específica que comprende dos dominios de Fn3 bio-específicos con modificaciones a los bucles superior e inferior que se ligan.

La Figura 5A es un esquema de una molécula de unión de Fn3 multi-específica que comprende dominios de Fn3 mono-específicos múltiples con modificaciones a los bucles inferiores que se ligan.

La Figura 5B es un esquema de una molécula de unión de Fn3 multi-específica que comprende dominios de Fn3 bio-específicos múltiples con modificaciones a los bucles superior e inferior que se ligan.

30 La Figura 6 es un diagrama del vector utilizado para clonar el cADN de fibronectina.

La Figura 7 es una tabla que muestra la secuencia de aminoácidos de un número seleccionado de moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas que utilizan los bucles inferiores o terminal C para unir la albúmina de suero humana.

35 La Figura 8 es una tabla que muestra la secuencia de aminoácidos de un número seleccionado de moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas que utilizan los bucles inferiores o terminal C para unir la lisozima.

La Figura 9 es una gráfica que muestra análisis ELISA específico de albúmina de suero humana de moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas etiquetadas His que utilizan los bucles inferiores o terminal C para unir la albúmina de suero humana como el objetivo específico.

40 La Figura 10 es un gel de SDS-PAGE que muestra la expresión exitosa en E. coli de moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas que utilizan los bucles inferiores o terminal C para unir un objetivo específico.

La Figura 11 es un gel de SDS-PAGE que muestra purificación exitosa a partir de lisados de E. coli de moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas que utilizan los bucles inferiores o terminal C para unir un objetivo específico.

La Figura 12 es un gel de SDS-PAGE que muestra purificación exitosa a partir de lisados de *E. coli* de moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas que utilizan los bucles inferiores o terminal C para unir un objetivo específico.

La Figura 13 es una gráfica que muestra el análisis ELISA de moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas que utilizan los bucles inferiores o terminal C y los bucles superiores para unir diferentes moléculas objetivo. Las moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas aisladas del clon 87 y clon 89 tienen bucles superiores que se unen a VEGFR2 y bucles inferiores que se unen a albúmina de suero humana. Los datos muestran que una molécula de unión con base en Fn3 única se puede diseñar por ingeniería de tal manera que los bucles superiores se unen a VEGFR2 y los bucles inferiores se unen a HSA.

La Figura 14 es una gráfica que muestra un estudio de unión Biacore de una molécula de unión con base en Fn3 biespecífica aislada a partir del clon 87 que utiliza los bucles superiores para unirse a VEGFR2.

La Figura 15 es una gráfica que muestra un estudio de unión Biacore de una molécula de unión con base en Fn3 biespecífica aislada a partir del clon 87 que utiliza los bucles inferiores o terminal C para unir HSA.

Descripción detallada de la invención

Con el fin de proporcionar una comprensión clara de la especificación y reivindicaciones, las siguientes definiciones se proporcionan de forma conveniente adelante.

Definiciones

Como se utiliza aquí, el término “dominio de fibronectina tipo III” o “dominio de Fn3” se refiere a un dominio de Fn3 tipo natural de cualquier organismo, así como también dominios de Fn3 quiméricos contruidos de hebras beta de dos o más diferentes dominios de Fn3. Como se conoce en la técnica, los dominios de Fn3 presentes en forma natural tienen una estructura intercalada beta compuesta de siete hebras beta, denominadas como A, B, C, D, E, F, y G, unidas por seis bucles, denominadas como bucles AB, BC, CD, DE, EF, y FG (Véase por ejemplo, Bork and Doolittle, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 89:8990, 1992; Bork et al., Nature Biotech. 15:553, 1997; Meinke et al., J. Bacteriol. 175:1910, 1993; Watanabe et al., J. Biol. Chem. 265:15659, 1990; Main et al., 1992; Leahy et al., 1992; Dickinson et al., 1994; patente Estadounidense 6,673,901; Publicación del Tratado de Cooperación de Patentes WO/03104418; y, solicitud de patente Estadounidense 2007/0082365, cuyas enseñanzas en su totalidad se incorporan aquí mediante referencia). Tres bucles están en la parte superior del dominio (los bucles BC, DE y FG) y tres bucles están en la parte inferior del dominio (los bucles AB, CD y EF) (véase Figura 1). En una realización particular, de la invención, el dominio de Fn3 es del décimo dominio de Fn3 de la Fibronectina humana (¹⁰Fn3) (SEQ. ID. NO: 1).

Como se utiliza aquí el término “molécula de unión con base en Fn3” o “molécula de unión con base en fibronectina tipo III (Fn3)” se refiere a un dominio de Fn3 que ha sido alterado para que contenga una o más secuencias de unión sin Fn3. En una realización particular, uno o más de los bucles AB, CD y/o EF inferiores se alteran en comparación con el dominio de Fn3 tipo natural correspondiente para contener una o más secuencias de unión sin Fn3. En otra realización, uno o más de los bucles AB, CD o EF inferiores y uno o más de los bucles BC, DE y FG superiores se alteran en comparación con el dominio de Fn3 tipo natural correspondiente para contener una o más secuencias de unión sin Fn3. Dichas moléculas se denominan aquí como “moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas”. En una realización adicional, dos o más moléculas de unión con base en Fn3 o molécula de unión con base en Fn3 biespecífica se ligan. Dichas moléculas se denominan aquí como “molécula de unión con base en Fn3 biespecífica”.

El término “secuencia de unión sin Fn3” se refiere a una secuencia de aminoácido que no está presente en el dominio de Fn3 presente en forma natural (por ejemplo, tipo natural), y que se une a un objetivo específico. Dichas secuencias de unión sin Fn3 se introducen normalmente al modificar (por ejemplo, mediante sustitución y/o adición) el dominio de Fn3 tipo natural (por ejemplo, dentro de las regiones de bucles inferiores y/o bucles superiores). Esto se puede lograr mediante, por ejemplo, mutación aleatoria o predeterminada de residuos de aminoácidos dentro del dominio de Fn3 tipo natural. Adicionalmente o alternativamente, la secuencia de unión sin Fn3 puede ser parcialmente o completamente exógena, que se deriva de diferentes fuentes genéticas o de aminoácidos. Por ejemplo, la secuencia exógena se puede derivar desde una región hipervariable de un anticuerpo, tal como una o más regiones CDR que tienen una especificidad de unión conocida para un antígeno objetivo conocido. Dichas CDR se pueden derivar a partir de una cadena de anticuerpo única (por ejemplo una región variable de una cadena liviana o pesada) o a partir de una combinación de diferentes cadenas de anticuerpo. Las CDR también se pueden derivar de dos anticuerpos diferentes (por ejemplo, que tienen especificidades diferentes). En una realización particular, los CDR se derivan de un nanocuerpo, por ejemplo, una cadena pesada similar a Camelidae.

El término “mono-específico” como se utiliza aquí se refiere a una molécula de unión con base en Fn3 que se une a una o más moléculas objetivo que comprenden dominios de Fn3 en los que solo la región inferior del dominio de Fn3, o la región superior del dominio de Fn3, pero no ambas, se utilizan para unión. Por ejemplo, una molécula de

unión con base en Fn3 mono-específica inferior es una que utiliza solo los bucles inferiores, tales como los bucles AB, CD, o EF, o terminal C del dominio de Fn3 para unir un objetivo, mientras que una molécula de unión con base en Fn3 mono-específica superior utiliza solo los bucles superiores del dominio de Fn3, tal como bucles BC, DE, y FG, para unir el objetivo. Se debe entender que no todos los tres bucles desde la región superior o inferior necesaria para ser utilizada para unir la molécula objetivo.

Los dominios de Fn3 mono-específicos también se pueden ligar (por ejemplo, en una forma similar a perla) para formar una molécula de unión con base en Fn3 multi-específicas que comprenden, por ejemplo, por lo menos dos dominios de Fn3 mono-específicos que se ligan. Para las moléculas de unión mono-específicas, cada una de los dominios de Fn3 utiliza por lo menos una región de bucle inferior o de terminal C para unirse a una o más moléculas objetivo. En una realización, esta molécula de unión con base en Fn3 multi-específica se une a regiones objetivo diferentes de una misma molécula objetivo (por ejemplo, Objetivo A). Por ejemplo, un dominio de Fn3 se puede unir a una primera región objetivo del Objetivo A y otro dominio de Fn3 se puede unir a una segunda región objetivo del Objetivo A. Esto se puede utilizar para aumentar la avidéz de la molécula de unión con base en Fn3 para la molécula objetivo. En otra realización, la molécula de unión con base en Fn3 multi-específica se une a múltiples moléculas objetivo. Por ejemplo, un dominio de Fn3 se puede unir al Objetivo A y otro dominio de Fn3 se puede unir al Objetivo B (por ejemplo, un extensor de semivida). En aún otra realización, la molécula de unión con base en Fn3 multi-específica comprende por lo menos dos dominios de Fn3 mono-específicos que se unen a regiones objetivo diferentes del Objetivo A y por lo menos dos dominios de Fn3 mono-específicos que se unen a regiones objetivo diferentes del Objetivo B. la persona medianamente versada en la técnica apreciará que cualquier número de dominios de Fn3 se puede ligar en esta forma para crear una molécula de unión con base en Fn3 multi-específica que son capaces para unirse a regiones objetivo diferentes de la misma molécula objetivo o diferentes moléculas objetivo.

El término “biespecífico” como se utiliza aquí se refiere a una molécula de unión con base en Fn3 que se une a uno o más objetivos que utilizan la región inferior del dominio de Fn3 y la región superior del dominio de Fn3. Por ejemplo una molécula de unión con base en Fn3 biespecífica comprende dominios de Fn3 que utiliza los bucles inferiores, tales como los bucles AB, CD, o EF, o terminal C de la molécula y los bucles superiores de la molécula, tal como bucles BC, DE, y FG, para unir el objetivo. Las moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas se pueden utilizar para unir la misma molécula objetivo, por ejemplo, el Objetivo A, que se puede unir a la parte superior o inferior de la molécula de unión con base en Fn3 biespecífica (Véase Figura 3b). Alternativamente, se puede utilizar la molécula de unión con base en Fn3 biespecífica para unirse a dos diferentes moléculas objetivo, por ejemplo, el Objetivo A y el Objetivo B. En este caso, se pueden utilizar los bucles superiores para unir al Objetivo A y se pueden utilizar los bucles inferiores para unir al Objetivo B, o viceversa (Véase Figura 3b). Las moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas también se pueden ligar juntas (por ejemplo, en una forma similar a perla) para formar una molécula de unión con base en Fn3 multi-específicas.

El término “multi-específico” como se utiliza aquí se refiere a una molécula de unión con base en Fn3 que comprende por lo menos dos moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas ligadas o por lo menos dos moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas ligadas.

El término “región determinante de complementariedad (CDR)” se refiere a un bucle hipervariable a partir de un dominio variable de anticuerpo o a partir de un receptor de célula T. Se ha definido de forma precisa la posición de las CDR dentro de una región variable de anticuerpo (véase, Kabat, E.A., et al. *Sequences of proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publicación No. 91-3242, 1991, y Chothia, C. et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987, que se incorporan aquí mediante referencia).

El término “anticuerpos de dominio único” se refiere a cualquier dominio variable único presente en forma natural y fragmentos de unión diseñados por ingeniería, que incluyen anticuerpos de dominio humano como se describe por Domantis (Domantis/GSK (Cambridge, UK) o nanocuerpos de camélidos como se define adelante.

El término “anticuerpo de cadena única” se refiere a una porción de unión a antígeno de una región variable de cadena liviana y una porción de unión a antígeno de una región variable de cadena pesada, unida, utilizando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que les permite hacer como una cadena de proteína única en la que el par de regiones VL y VH para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; y Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-5883).

El término “nanocuerpo de camélido” se refiere a una región de anticuerpo de camélido que es el dominio variable único pequeño desprovisto de cadena liviana y que se puede obtener mediante ingeniería genética para proporcionar una proteína pequeña que tiene alta afinidad para un objetivo, que resulta en una proteína derivada de anticuerpo de bajo peso molecular. Véase el documento WO07042289 y número de patente Estadounidense 5,759,808 emitida el 2 de junio, 1998; véase también Stijlemans, B. et al., 2004. Las colecciones de anticuerpos de camélidos realizadas por ingeniería y fragmentos de anticuerpo están disponibles comercialmente, por ejemplo, a

partir de Ablynx, Ghent, Belgium. Como con otros anticuerpos de origen no humano, una secuencia de aminoácido de un anticuerpo de camélido se puede alterar de forma recombinante para obtener una secuencia que más se asemeje cercanamente a una secuencia humana, es decir, el nanocuerpo se puede "humanizar". Por lo tanto se puede reducir adicionalmente la antigenicidad baja natural de los anticuerpos de camélido a humanos.

- 5 El término "objetivo" se refiere a un antígeno o epítipo reconocido por la molécula de unión con base en Fn3 de la invención. Los objetivos incluyen, pero no se limitan a, epítopos presentes en proteínas, péptidos, carbohidratos, y/o lípidos.

El término "conjugado" se refiere a una molécula de unión con base en Fn3 química o genéticamente ligada a una o más unidades estructurales sin Fn3.

- 10 El término "unidad estructural sin Fn3" se refiere a una entidad química o biológica que imparte funcionalidad adicional a una molécula a la que se adhiere. En una realización particular, la unidad estructural sin Fn3 es un polipéptido, por ejemplo, albúmina de suero humana (HSA), o una entidad química, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) que aumenta la semivida de la molécula de unión con base en Fn3 in vivo.

- 15 El término "residuo de aminoácido no natural" se refiere a un residuo de aminoácido que no está presente en el dominio de Fn3 presente en forma natural (tipo natural). Dichos residuos de aminoácidos no naturales se pueden introducir mediante sustitución de aminoácidos presentes en forma natural, y/o mediante inserción de aminoácidos no naturales en la secuencia Fn3 de aminoácidos presentes en forma natural. El residuo de aminoácido no natural también se puede incorporar de tal manera que se imparte una funcionalidad deseada a la molécula de unión con base en Fn3, por ejemplo, la capacidad a ligar una unidad estructural funcional (por ejemplo, PEG).

- 20 El término "polietilenglicol" o "PEG" se refiere a un compuesto de poliaquilenglicol o un derivado del mismo, con o sin agentes de acoplamiento o derivación con unidades estructurales de acoplamiento o de activación.

- 25 El término "unión específica" o "se une específicamente a" se refiere a la capacidad de una molécula de unión con base en Fn3 para unirse a un objetivo con una afinidad de por lo menos 1×10^{-6} M, y/o se une a un objetivo con una afinidad que es por lo menos dos veces, (preferiblemente por lo menos 10 veces), mayor que su afinidad para un antígeno no específico a temperatura ambiente bajo condiciones estándar de pH y sal fisiológica, según se mide por resonancia de plasmón de superficie.

Descripción general

- 30 La presente invención proporciona moléculas de unión con base en fibronectina tipo III (Fn-3) que se unen específicamente a un antígeno objetivo. La invención proporciona moléculas de unión a Fn3 mono-específicas con modificaciones en por lo menos la región de bucle EF inferior que se une a una molécula objetivo. La descripción proporciona adicionalmente moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas que se unen a la misma molécula objetivo con dos sitios de unión opuestos o a dos o más antígenos objetivo de forma simultánea. Las moléculas de unión con base en Fn3 de la invención también se pueden ligar (por ejemplo, en forma similar a perla) para formar moléculas de unión con base en Fn3 multiespecíficas y/o se pueden conjugar a una unidad estructural sin Fn3, tal como albúmina de suero humana (HSA), para mejorar semivida y estabilidad. Se pueden utilizar moléculas de unión con base en Fn3 en una variedad de aplicaciones terapéuticas y diagnósticas, al igual que otras moléculas de unión, tales como anticuerpos.

Moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas

- 40 En un aspecto, la invención proporciona moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas que se alteran en comparación con el dominio de Fn3 tipo natural (por ejemplo, en las regiones de bucle inferiores y/o superiores) para crear una secuencia de unión sin Fn3 que se une a un objetivo específico. En una realización, las moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas descritas utilizan el bucle EF inferior para unir una molécula objetivo.

- 45 La descripción proporciona una molécula de unión con base en Fn3 que comprende un dominio de Fn3, en donde por lo menos se altera un aminoácido en uno o más del dominio de Fn3 en comparación con un dominio de Fn3 tipo natural para crear una secuencia de unión sin Fn3 que se une a un objetivo específico. En una realización particular, el dominio de Fn3 de tipo natural es un dominio de Fn3 humano, por ejemplo, ¹⁰Fn3 humano (SEQ ID NO:1). Adicionalmente, uno o más residuos de aminoácidos en una o más hebras beta adyacentes a las regiones de bucle también se pueden mutar en comparación con el dominio de Fn3 tipo natural para contribuir con residuos o secuencias de unión sin Fn3 adicionales que se pueden unir a unidades estructurales sin Fn3. Los residuos de aminoácidos particulares en las regiones de bucle AB, CD, EF inferiores o terminal C y hebras beta adyacentes que se pueden alterar incluyen, por ejemplo, aminoácidos en la posición de 15, 16, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 60, 61, 62, 63, 64, 93, 95, o 96 de la SEQ ID NO:1.

Las secuencias de unión sin Fn3 de ejemplo incluyen, por ejemplo, todo o una porción de una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo o un receptor de célula T.

5 En otro aspecto, la invención proporciona una colección de moléculas de unión con base en Fn3, que se pueden utilizar para identificar moléculas de unión con base en Fn3 de la invención que se unen a un objetivo deseado particular. En una realización, la colección comprende moléculas de unión con base en Fn3, cada una de las cuales contiene cada una de las cuales contiene por lo menos una alteración de aminoácido en una o más de las regiones de bucle AB, CD, EF inferiores o terminal C en comparación con un dominio de Fn3 tipo natural, tal como el ¹⁰Fn3 human o (SEQ ID NO: 1). Los residuos de aminoácidos particulares en las regiones de bucle AB, CD o EF y hebras beta que se pueden alterar incluyen, por ejemplo, aminoácidos en la posición de 15, 16, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 10 45, 60, 61, 62, 63, 64, 93, 95, o 96 de la SEQ ID NO:1.

15 En una otra descripción, la colección comprende moléculas de unión con base en Fn3, cada una de las cuales contiene por lo menos una alteración de aminoácido en una o más de las regiones de bucle superiores BC, DE o FG en comparación con un dominio de Fn3 tipo natural, tal como el 10Fn3 humano (SEQ ID NO: 1). Los residuos de aminoácidos particulares en las regiones de bucle BC, DE o FG y hebras beta que se pueden alterar incluyen, por ejemplo, aminoácidos en la posición de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, o 88 de la SEQ ID NO:1.

20 Se puede generar una diversidad de colecciones mediante, por ejemplo, mutagenia aleatoria, "mutagenia por desplazamiento completo, o "mutagenia "look through" de uno o más de los residuos descritos en la SEQ ID NO:1 (7,195,880; 6,951,725; 7,078,197; 7,022,479; 5,922,545; 5,830,721; 5,605,793, 5,830,650; 6,194,550; 6,699,658; 7,063,943; 5,866,344 y Publicación del Tratado de Cooperación de Patentes WO06023144).

25 Alternativamente, se pueden generar moléculas de unión con base en Fn3 al combinar secuencias de unión sin Fn3 a partir de uno o más miembros de colecciones diferentes. En una descripción particular, se generan moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas al combinar secuencias de unión sin Fn3 a partir de una o más de las regiones de bucle AB, CD, EF inferiores o terminal C de un miembro de colección, junto con secuencias de unión sin Fn3 de una o más de las regiones de bucle superiores BC, DE o FG de otro miembro de colección en una molécula de unión con base en Fn3 única biespecífica.

30 Los ácidos nucleicos que codifican la colección de moléculas de unión con base en Fn3, o variantes de la misma, descritos aquí se pueden construir utilizando los métodos reconocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, ingeniería genética mediada por enzima o con base en PCR, síntesis de ADN o ARN ab initio, y/o mutagenia de casete.

Los objetivos adecuados para las moléculas de unión con base en Fn3 incluyen, pero no se limitan a, extensores de semivida (por ejemplo, HSA), lisozima, un receptor celular, un ligando de receptor celular, una bacteria, o un virus (véase, Figura 1). En una realización particular el objetivo está involucrado en una enfermedad humana, por ejemplo, una enfermedad autoinmune, cáncer, o una enfermedad infecciosa.

35 Esta especificación describe, inter alia, la identificación y producción de moléculas de unión con base en Fn3 novedosas que se unen a un objetivo, por ejemplo, HSA, utilizando los bucles inferiores de la molécula Fn3. Se generan cientos de clones utilizando los métodos de la invención y se han caracterizado unos pocos representativos como se muestra en el Ejemplo 4. La Figura 7 muestra un número representativo de secuencias aisladas a partir de esta colección de proteínas de andamio Fn3 que se unen a HSA (SEQ ID NOs: 7-41).

40 Adicionalmente, se ha descubierto que muchos bucles aleatorios independientemente tienden a converger a una secuencia consenso que es probable que participe en la unión de HSA (SEQ ID NO: 42). Por lo tanto, se espera que los polipéptidos que tienen estas secuencias consenso serán útiles como agentes de unión de HSA incluso cuando se separan del contexto de proteína en el que se identifican.

45 La Figura 8 muestra un número representativo de secuencias aisladas a partir de esta colección de proteínas de andamio Fn3 que se unen a lisozima (SEQ ID NOs: 43-116). Los datos en el Ejemplo 5 muestran estudios de unión de unas pocas representativas proteínas de unión con base en Fn3 para HSA. Los resultados muestran que se pueden generar las moléculas de unión de Fn3 con bucles inferiores modificados que tienen la capacidad para unir un objetivo.

50 Estos datos muestran que se puede generar una colección de moléculas de unión con base en Fn3 en las que por lo menos se modifica uno de los bucles inferiores de tal manera que se une a un objetivo. Con la colección de HSA, los bucles inferiores se mantienen en la misma longitud como el Fn3 tipo natural. Con la colección de lisozima, los bucles inferiores varían en longitud sin efectos adversos sobre la estructura de la proteína. Adicionalmente, estas moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas con los bucles inferiores modificados, mantienen estabilidad conformacional y se pueden expresar y purificar sin retener la capacidad de unión. Así, se puede utilizar la

descripción de la invención para generar una colección de moléculas de unión con base en Fn3 que tienen por lo menos un bucle inferior modificado así como también moléculas de unión con base en Fn3 que utilizan la cara inferior para unir un objetivo.

Moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas

5 Como se discutió en parte anteriormente, en otro aspecto, la descripción proporciona moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas que son capaces de unirse a dos o más objetivos de forma simultánea. Dichas moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas comprenden dos o más secuencias de unión sin Fn3 dentro del mismo dominio de proteína. Esto se puede lograr al alterar cualquiera de dos o más de las regiones de bucle AB, BC, CD, DE, EF o FG superiores o inferiores para comprender secuencias de unión sin Fn3 (véase Figura 1). En una descripción particular, la molécula de unión con base en Fn3 biespecífica se altera en las regiones de bucle superior e inferior para crear dos especificidades de unión separadas.

De acuerdo con lo anterior, la descripción proporciona una molécula de unión con base en Fn3 biespecífica que comprende un dominio de Fn3, en donde por lo menos se altera un aminoácido en una o más de las regiones de bucle inferiores AB, CD o EF del dominio de Fn3 en comparación con un dominio de Fn3 tipo natural (por ejemplo, SEQ ID NO:1) para crear una secuencia de unión sin Fn3 que se une a un primer objetivo, y en donde por lo menos se altera un aminoácido en una o más de las regiones de bucle BC, DE y FG superiores del dominio de Fn3 en comparación con un dominio de Fn3 tipo natural (por ejemplo, SEQ ID NO:1) para crear una secuencia de unión sin Fn3 que se une a un segundo objetivo. Los residuos de aminoácidos particulares en las regiones de bucle AB, CD, EF inferiores o terminal C y hebras beta adyacentes que se pueden alterar incluyen, por ejemplo, aminoácidos en la posición de 15, 16, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 60, 61, 62, 63, 64, 93, 95, o 96 de la SEQ ID NO: 1. Los residuos de aminoácidos particulares en las regiones de bucle BC, DE y FG superiores y hebras beta adyacentes que se pueden alterar incluyen, por ejemplo, aminoácidos en la posición de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, o 88 de la SEQ ID NO:1.

Las moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas de la invención se unen a dos o más objetivos de forma simultánea. Los objetivos pueden estar presentes en la misma molécula, de tal manera que dos regiones de la misma molécula objetivo se yuxtaponen mediante la unión del dominio de unión con base en Fn3 biespecífico a los objetivos. Alternativamente, los objetivos pueden estar presentes en diferentes moléculas, de tal manera que las dos diferentes moléculas se yuxtaponen mediante la unión de la molécula de unión con base en Fn3 biespecífica a los objetivos. Los objetivos también pueden ser idénticos, de tal manera que la molécula de unión con base en Fn3 biespecífica es capaz de agrupar moléculas objetivo, en la misma forma como un anticuerpo es capaz de agrupar moléculas.

Los objetivos adecuados incluyen aquellos mencionados previamente, solos o en combinación con los objetivos presentes en las moléculas que mejoran las propiedades fisicoquímicas de la molécula de unión con base en Fn3 biespecífica, tal como un extensor de semivida, por ejemplo, HSA, un receptor de anticuerpo Fc o PEG. Los objetivos adecuados también incluyen moléculas que confieren propiedades funcionales adicionales por ejemplo unidades estructurales citotóxicas, de etiquetado o de formación de imagen, como se describe aquí. Los objetivos adecuados también se pueden utilizar para inducir dimerización de moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas si las dos moléculas de dominio de unión con base en Fn3 biespecíficas son capaces de unirse al objetivo de forma simultánea. Por ejemplo, dos moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas pueden trabajar con una relación de idiotipo/anti-idiotipo. En este caso, un sitio de unión de una molécula de unión a Fn3 se unirá a una molécula objetivo mientras que el segundo sitio de unión de la molécula de unión a Fn3 se unirá a una región de unión en la molécula de unión a Fn3. Por ejemplo, los bucles inferiores de la molécula de unión a Fn3 biespecífica se pueden unir al Objetivo A mientras que los bucles superiores de la molécula biespecífica se pueden unir a una segunda molécula de unión a Fn3 biespecífica. Esto llevará a multimerización de las moléculas de unión a Fn3 en dicha forma que los sitios de unión objetivo de bucle inferior están disponibles para unirse al Objetivo A mientras que los sitios de unión de bucle superior llevan a auto-asociación con una segunda molécula de unión a Fn3.

Esta especificación describe, inter alia, la identificación y producción de moléculas de Fn3 biespecíficas, novedosas que se unen a dos diferentes moléculas objetivo, por ejemplo, HSA y VEGFR2, utilizando los bucles inferiores y bucles superiores de la misma molécula Fn3. Cientos de clones se han generado utilizando los métodos de la invención y uno en particular, el clon 89 se describe en más detalles en el Ejemplo 6 y 7. El clon 89 es una molécula de unión con base en Fn3 biespecífica en la que los bucles inferiores de la molécula de Fn3 se une a HSA mientras que los bucles superiores de la misma molécula de Fn3 se unen a VEGFR2 (SEQ ID NO: 120).

También se pueden crear moléculas de unión de Fn3 biespecíficas al identificar primero una molécula de unión con base en Fn3 mono-específica con una función deseada, por ejemplo, al unirse a HSA. Esta molécula con base en Fn3 mono-específica solo tiene variaciones de bucle en una de las dos interfaces de unión (es decir, cualquiera de los bucles superiores, o los bucles inferiores, pero no ambos). Una vez se identifica una molécula de unión con base en Fn3 mono-específica adecuada con la función deseada, esta molécula luego se utiliza como un andamio para

generar una colección en la que varían los bucles de la cara opuesta de la molécula de Fn3, generando de esta manera una colección de moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas. Esta colección de moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas luego se utilizan para detección contra la segunda molécula objetivo para identificar una entidad biespecífica que se une a dos objetivos. Por ejemplo, la molécula de unión con base en Fn3 mono-específica se puede unir a HSA utilizando por lo menos un bucle inferior. Esta molécula de unión con base en Fn3 mono-específica se utiliza como un andamio para generar una colección en la que por lo menos varía uno de los bucles superiores de la molécula de tal manera que se une a un segundo objetivo, por ejemplo, VEGFR2, creando por lo tanto una colección de moléculas con base en Fn3 biespecíficas. Se puede utilizar esta colección de moléculas con base en Fn3 biespecíficas para detectar el objetivo VEGFR2.

El VEGFR2 es el mediador principal para los efectos proangiogénicos de señalización de VEGF. El VEGFR-2 se une y se activa mediante VEGF-A, VEGF-C y VEGF-D. En células endoteliales, la activación de VEGFR-2 estimula la proliferación y migración celular, y la activación de VEGFR-2, in vivo desencadena la angiogenia y aumenta la permeabilidad de la vasculatura. La angiogenia se establece bien como una característica importante del crecimiento de tumor y diversas retinopatías, mientras que se aumenta la permeabilidad de la vasculatura es un evento significativo en muchas respuestas inflamatorias (Véase por ejemplo, documento WO2005056764).

Estos datos muestran que las moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas con los bucles inferiores, mantienen estabilidad conformacional y se pueden expresar y purificar mientras que retiene la capacidad de unión. La persona medianamente versada apreciará que se puede generar cualquier molécula de unión con base en Fn3 biespecífica utilizando los métodos de la invención descritos aquí. La molécula biespecífica se puede diseñar para unirse a cualquier objetivo de interés. Por ejemplo, la molécula biespecífica se puede unir a diferentes sitios de unión del mismo objetivo. Alternativamente, la molécula biespecífica se puede unir a diferentes moléculas objetivo.

Moléculas de unión con base en Fn3 multiespecíficas

En otro aspecto, la descripción proporciona moléculas de unión con base en Fn3 multiespecíficas que comprenden dos o más moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas o moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas ligadas (por ejemplo, genéticamente o químicamente). Las moléculas de unión con base en Fn3 multiespecíficas comprenden por lo menos una molécula de unión con base en Fn3 monomérica que utiliza por lo menos uno de los bucles inferiores AB, CD, EF para unirse a un objetivo.

La molécula de unión con base en Fn3 multiespecífica comprende dos o más moléculas de unión con base en Fn3 ligada, en forma similar a perla, en donde cada molécula de unión con base en Fn3 individual se une a un objetivo específico. Como con las moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas, dichos objetivos pueden estar presentes en la misma molécula o en diferentes moléculas, de tal manera que las diferentes moléculas se yuxtaponen mediante la unión de la molécula de unión con base en Fn3 multiespecífica. Los objetivos también pueden ser idénticos, de tal manera que la molécula de unión con base en Fn3 multiespecífica es capaz de agrupar las moléculas objetivo, en una forma similar a un anticuerpo. También se aumenta la avidéz al unirse a la misma molécula objetivo con dos sitios de unión en la molécula de unión con base en Fn3 capaz de unirse independientemente a diferentes regiones de la molécula objetivo.

Se puede incorporar una variedad de moléculas de unión con base en Fn3 en las moléculas de unión con base en Fn3 multiespecíficas, que incluyen moléculas de unión con base en Fn3 con una única especificidad de unión, las moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas, o una combinación de ambos tipos de moléculas de unión con base en Fn3. De acuerdo con lo anterior, los objetivos adecuados para las moléculas de unión con base en Fn3 multiespecíficas incluyen aquellas descritas anteriormente para las moléculas de unión con base en Fn3 y moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas.

Se pueden producir moléculas de unión con base en Fn3 multiespecíficas utilizando métodos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, moléculas de unión con base en Fn3 se puede ligar genéticamente, de tal manera que moléculas de unión con base en Fn3 multiespecíficas se expresan como un polipéptido único. Este enlace puede ser directo o conferido por una secuencia "ligadora" de aminoácidos adicionales. Se describen ligadores y métodos no limitantes, por ejemplo, en los documentos US20060286603 y WO04041862A2. Los ligadores de polipéptido de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ligadores GS, tales como GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 118), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 121), PSTSTST (SEQ ID NO: 122), y EIDKPSQ (SEQ ID NO: 123), y multímeros de los mismos. El ejemplo 6 muestra cómo hacer una molécula de unión con base en Fn3 multiespecífica utilizando un ligador G-S. Específicamente, la molécula de unión con base en Fn3 multiespecífica se crea utilizando la secuencia ligadora GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 118) que une una primera molécula de unión con base en Fn3 mono-específica que se une a VEGFR2 utilizando los bucles superiores con una segunda molécula de unión con base en Fn3 mono-específica que se une a HSA utilizando los bucles inferiores (SEQ ID NO: 119).

Las moléculas de unión con base en Fn3 multiespecíficas generadas que utilizan secuencias ligadoras tienen un impedimento estérico mejorado para unión a moléculas objetivo, permitiendo de esta manera que se utilicen

secuencias ligadoras para ligar dos o más moléculas de unión con base en Fn3 monoméricas. Las secuencias ligadoras más cortas provocan menos respuestas inmunogénicas y es menos probable que se dividan.

Alternativamente, se pueden preparar moléculas de unión con base en Fn3 multiespecíficas al conjugar químicamente las moléculas de unión con base en Fn3 individuales utilizando métodos conocidos en la técnica. Se puede utilizar una variedad de agentes de acoplamiento o entrecruzamiento para conjugación covalente. Ejemplos de agentes de entrecruzamiento incluyen, por ejemplo, proteína A, carbodiimida, N-succinimidil- S-acetil- tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil- 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo- SMCC) (véase por ejemplo, Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 82:8648). Otros métodos incluyen aquellos descritos en Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83), y Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL). Se pueden introducir residuos de cisteína en las moléculas de unión a Fn3 en posiciones específicas (Véase por ejemplo,) y luego entrecruzarlos con reactivos a sulfhidrilo tal como DPDPB o DTME (disponible de Pierce) para unir dos moléculas.

Los Ejemplos 6 y 7 describen la identificación y producción de moléculas de Fn3 biespecíficas, novedosas que se unen a dos objetivos diferentes, HSA y VEGFR2, utilizando dos moléculas de Fn3 mono-específicas separadas que se ligan con una secuencia ligadora. En este Ejemplo particular, una molécula de unión con base en Fn3 monomérica utiliza los bucles inferiores para unirse a HSA mientras que la otra molécula de unión con base en Fn3 mono-específica utiliza los bucles superiores para unirse a VEGFR2. Se han generado cientos de clones utilizando los métodos de la invención y unos pocos representativos se han caracterizado, en particular el clon 89. Estos datos muestran que las moléculas de unión con base en Fn3 multiespecíficas con los bucles inferiores modificados, mantienen estabilidad conformacional y se pueden expresar y purificar mientras que se retiene la capacidad de unión. La persona medianamente versada apreciará que se puede generar cualquier número de moléculas de unión con base en Fn3 multiespecíficas utilizando los métodos de la invención. Dichas moléculas de unión multiespecíficas se pueden unir para diseñar la unión a un único objetivo. Alternativamente, se pueden unir las moléculas de unión multiespecíficas para diseñar una unión de dos o más objetivos.

Conjugado de moléculas de unión con base en Fn3

En otro aspecto la invención proporciona conjugados que comprenden una molécula de unión con base en Fn3 unida a una o más unidades estructurales sin Fn3. Dichas unidades estructurales sin Fn3, por ejemplo, pueden impartir propiedades funcionales o fisicoquímicas adicionales a la molécula de unión con base en Fn3. En una realización, la molécula de unión con base en Fn3 se liga o se fusiona a un dominio Fc de anticuerpo (o una porción del mismo). Los métodos para fusionar moléculas a los dominios Fc, por ejemplo, el dominio Fc de IgG1, se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, U.S. 5,428,130). Dichos conjugados tienen aumento de semividas en circulación, debido a la capacidad del Fc para unirse a FcRn, que sirve una función crítica en la homeostasis de IgG, protegiendo las moléculas unidas al catabolismo.

En otra realización, se fusiona la molécula de unión con base en Fn3 a uno o más polipéptidos de albúmina de suero humana (HSA), o una porción del mismo. El HSA, una proteína, de 585 aminoácidos en su forma madura, es responsable de una proporción significativa de la presión osmótica de suero y también funciona como un portador de ligandos endógenos y exógenos. La función de la albúmina como una molécula portadora y su naturaleza inerte son propiedades deseables para uso como un portador y transportador de polipéptidos in vivo. El uso de albúmina como un componente de una proteína de fusión de albúmina como un portador de diversas proteínas se ha sugerido en los documentos WO 93/15199, WO 93/15200, y EP 413 622. También se ha propuesto el uso de fragmentos de terminal N de HSA para fusiones a polipéptidos (EP 399 666). De acuerdo con lo anterior, al fusionar o conjugar genéticamente o químicamente las moléculas de la presente invención a albúmina, o un fragmento (porción) o variante de albúmina o una molécula capaz de unión a HSA (un ligador anti-HSA") que es suficiente para estabilizar la proteína y/ de su actividad, la molécula se estabiliza para extender la vida útil, y/o para retener la actividad de la molécula durante períodos de tiempo extendidos en solución, in vitro y/o in vivo.

Se puede lograr la fusión de la albúmina a otra proteína mediante manipulación genética, de tal manera que el ADN que codifica el HSA, o un fragmento del mismo, se une al ADN que codifica la proteína. Un anfitrión apropiado luego se transforma o transfecta con las secuencias de nucleótido fusionadas, así dispuestas en un plásmido adecuado para expresar un polipéptido de fusión. Se puede efectuar la expresión in vitro a partir de, por ejemplo, células procariotas o eucariotas, o in vivo por ejemplo, a partir de un organismo transgénico. Se pueden encontrar métodos adicionales relacionados con fusiones HSA, por ejemplo, en los documentos WO 2001077137 y WO 200306007, incorporados aquí mediante referencia. En una realización específica, la expresión de la proteína de fusión se lleva a cabo en estirpes celulares de mamífero, por ejemplo, estirpes de células CHO.

Otras conjugados de molécula de unión con base en Fn3 de la presente invención incluyen una molécula de unión con base en Fn3 unida a una molécula de unión no basada en Fn3, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un anticuerpo o ligando para un receptor), para generar una molécula que se une a por lo menos dos diferentes sitios de unión o moléculas objetivo.

5 Los conjugados de molécula de unión con base en Fn3 de la presente invención se pueden preparar al ligar las moléculas constituyentes utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las moléculas constituyentes que se pueden ligar químicamente utilizando una variedad de agentes de acoplamiento o entrecruzamiento se pueden utilizar para conjugación covalente. Ejemplos de agentes de entrecruzamiento incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil- tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilenedimaleimida (oPDM),
 10 N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase por ejemplo, Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 82:8648). Otros métodos incluyen aquellos descritos en Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83), y Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Alternativamente, se pueden codificar las moléculas constituyentes en el mismo vector y expresar como una proteína única en una célula anfitriona. Los métodos para producir dichas proteínas de fusión se describen, por ejemplo, en el Patente Estadounidense Número 5,260,203; Patente Estadounidense Número 5,455,030; Patente Estadounidense Número 4,881,175; Patente Estadounidense Número 5,132,405; Patente Estadounidense Número 5,091,513; Patente Estadounidense Número 5,476,786; Patente Estadounidense Número 5,013,653; Patente Estadounidense Número 5,258,498; y Patente Estadounidense Número 5,482,858.

En aún otra realización, la invención proporciona moléculas de unión con base en Fn3 que se conjugan a polietilenglicol (PEG), por ejemplo, para aumentar la semivida biológica (por ejemplo, suero) de la molécula. Los métodos para PEGilar proteínas son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la molécula de unión con base en
 25 Fn3 se puede hacer reaccionar con una unidad estructural PEG, tal como un derivado de éster o aldehído reactivo de PEG, bajo condiciones en las que uno o más grupos PEG se adhieren a la molécula. El término "unidad estructural de PEGilación", "unidad estructural de polietilenglicol", o "unidad estructural PEG" incluye un compuesto de poliaquilenglicol o un derivado del mismo, con o sin agentes de acoplamiento o derivación con unidades estructurales de acoplamiento o activación (por ejemplo, con tiol, triflato, tresilato, azirdina, oxirano, o preferiblemente con una unidad estructural de maleimida, por ejemplo, PEGmaleimida). Otros compuestos de polialquilenglicol adecuados incluyen, pero no se limitan a, PEG monometoxi maleimido, polipropilenglicol PEG activado, pero también polímeros cargados o neutros de los siguientes tipos: dextrano, ácidos colomínico u otros polímeros con base en carbohidratos, polímeros de aminoácidos, y derivados de biotina.

La elección del grupo funcional adecuado para el derivado de PEG se basa en el tipo de grupo reactivo disponible en la molécula o la molécula que se acoplará al PEG. Para las proteínas, los aminoácidos reactivos típicos incluyen lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, tirosina. También se pueden utilizar el grupo amino de terminal N y el ácido carboxílico de terminal C.

Preferiblemente, la pegilación se lleva a cabo a través de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Tal como se utiliza aquí, se pretende que el término "polietilenglicol" abarque cualquiera de las formas de PEG que se han utilizad para derivar otras proteínas, tales como mono alcoxi o ariloxi (C1-C10)-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. Los métodos para pegar proteínas son conocidos en la técnica y se pueden aplicar a la presente invención. Véase, por ejemplo, los documentos WO 2005056764, U.S.7,045,337, U.S.7,083,970, U.S. 6,927,042, EP 0 154 316 otorgados a Nishimura et al. y el documento EP 0 401 384 otorgado por Ishikawa et al. Se pueden diseñar moléculas de unión
 45 con base en Fn3 para incluir por lo menos un aminoácido cisteína o por lo menos un aminoácido no natural para facilitar la pegilación.

La unión de los conjugados de molécula de unión con base de Fn3 con sus objetivos específicos se puede confirmar mediante diversos ensayos, por ejemplo, la fusión se puede marcar radiactivamente y utilizarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, que se incorpora mediante referencia aquí). Se puede detectar el isótopo radiactivo por dichos medios como el uso de un contador y o un contador de centelleo o por autorradiografía.

Otros conjugados de molécula de unión con base en Fn3 de la presente invención incluyen una molécula de unión con base en Fn3 ligada a una etiqueta (por ejemplo, biotina) o un producto químico (por ejemplo, una inmunotoxina o agente quimioterapéutico). Dichas sustancias químicas incluyen agente citotóxico que es cualquier agente que es perjudicial para las células (por ejemplo, les puede provocar la muerte). Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina,

doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desdihidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de estos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5 - fluorouracil decarbazina), agentes de alquilación (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) cisplatina (DDP)), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramycin (AMC)), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Otros ejemplos de citotoxinas terapéuticas que se pueden conjugar a una molécula de unión con base en Fn3 de la invención incluyen duocarmicinas, calicheamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas.

Se pueden conjugar las citotoxinas con las moléculas de unión con base en Fn3 de la invención utilizando la tecnología de ligador disponibles en la técnica. Ejemplos de tipos de ligadores que se han utilizado para conjugar una citotoxina incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y ligadores que contienen péptidos. Se puede seleccionar un ligador que es, por ejemplo, susceptible a división por pH bajo dentro del compartimento lisosómico es susceptible a división por proteasas, tales como proteasas expresadas de forma preferencial en el tejido tumoral, tales como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D). Para una descripción adicional de tipos de citotoxinas, ligadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos, véase también Saito, G. et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Las moléculas de unión con base en Fn3 de la presente invención también se pueden conjugar con un isótopo radioactivo para generar radiofármacos citotóxicos, también se hace referencia como radioinmunoconjugados. Los ejemplos de isótopos radiactivos que se pueden conjugar con moléculas de unión con base en Fn3 para uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero no se limitan a, yodo¹³¹, indio¹¹¹, itrio⁹⁰ y lutecio¹⁷⁷. Los métodos para preparar radioinmunoconjugados se establecen en la técnica. Los ejemplos de radioinmunoconjugados están disponibles comercialmente, incluyen ibritumomab, tiuxetan, y tositumomab, y se pueden utilizar métodos similares para preparar radioinmunoconjugados utilizando moléculas de la invención.

Se pueden utilizar conjugados de molécula de unión con base en Fn3 de la invención para modificar una respuesta biológica dada, y la unidad estructural del fármaco no se debe interpretar como limitada a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la unidad estructural del fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, o toxina de la difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral o interferón γ , o, modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina - 6 ("IL-6"), factor estimulación de colonias de macrófagos de granulocitos ("GM-CSF"), factor de estimulación de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar dichas unidades estructurales terapéuticas son bien conocidas y se pueden aplicar a las moléculas de la presente invención, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

También se pueden modificar las moléculas de unión con base en Fn3 de la presente invención mediante HESilación, que utiliza derivados de hidroxietil almidón unidos a sustancias de fármaco con el fin de modificar las características del fármaco ("HES"). El HES es un polímero natural modificado derivado del almidón de maíz ceroso que se metaboliza por las enzimas del cuerpo. Esta modificación permite la prolongación de la semivida de circulación al aumentar la estabilidad de la molécula, así como también al reducir la depuración renal, lo que resulta en un aumento de la actividad biológica. Adicionalmente, la HESilación potencialmente altera la inmunogenicidad o alergenicidad. Al variar los diferentes parámetros, tales como el peso molecular de HES, se puede personalizar un amplio rango de conjugados de fármaco de HES.

Los documentos DE 196 28 705 y DE 101 29 369 describen posibles métodos para llevar a cabo el acoplamiento de hidroxietil almidón en sulfóxido de dimetilo anhidro (DMSO) a través de la aldonolactona correspondiente de

hidroxietil almidón con grupos amino libres de hemoglobina y anfotericina B, respectivamente. Dado que a menudo no es posible utilizar disolventes apróticos anhidros, específicamente en el caso de las proteínas, ya sea por razones de solubilidad, o bien por motivos de desnaturalización de las proteínas, los métodos de acoplamiento con HES en un medio acuoso también están disponibles. Por ejemplo, es posible el acoplamiento de hidroxietil almidón que se ha oxidado selectivamente en el extremo reductor de la cadena al ácido aldónico a través de la mediación de carbodiimida soluble en agua EDC (1-metil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida) (PCT/EP 02/02928). Los métodos adicionales de HESilación que se pueden aplicar a la presente invención se describen, por ejemplo, en los documentos U.S. 20070134197, U.S. 20060258607, U.S. 20060217293, U.S. 20060100176, y U.S.20060052342.

También se pueden modificar las moléculas de unión con base en Fn3 de la invención a través de residuos de azúcar. Los métodos para modificar residuos de azúcar de proteínas o proteínas de glicosilación se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Borman (2006) Chem. & Eng. News 84(36):13-22 y Borman (2007) Chem. & Eng. News 85:19-20) y se pueden aplicar a las moléculas de la presente invención.

Adicionalmente o alternativamente, se pueden hacer que las moléculas de unión con base en Fn3 de la invención tengan un tipo alterado de glicosilación, tal como un patrón hipofucosilatado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o una molécula de unión con base en Fn3 que tienen aumento de estructuras GlcNAc bisectrices. Se pueden lograr dichas modificaciones de hidratos de carbono, por ejemplo, al expresar la molécula de unión con base en Fn3 en una célula anfitriona con la maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células anfitrionas en las que se expresan moléculas de unión con base en Fn3 recombinantes de la invención para de ese modo producir moléculas de unión con base en Fn3 de la invención con la glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1,176,195 por Cuelgue et al. describe una estirpe celular con un gen FUT8 funcionalmente alterada, que codifica una fucosiltransferasa, de tal manera que los anticuerpos se expresan en dicha hipofucosilación de exhibición de estirpe celular. La publicación PCT WO 03/035835 otorgada a Presta describe una estirpe celular CHO variante, las células Lecl3, con capacidad reducida para adherir fucosa a Asn(297) hidratos de carbono ligados, también resulta en hipofucosilación de anticuerpos expresados en esas células anfitrionas (véase también Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). También se han descrito los métodos para producir polipéptidos con patrones de glicosilación similares a humanos por el documento EP 1297172B1 y otras familias de patentes procedentes de GlycoFi.

Métodos para generar moléculas de unión con base en Fn3

1) Alteraciones de ácidos nucleicos y aminoácidos

Las moléculas de unión con base en Fn3 de la invención que tienen una o más modificaciones de aminoácidos o de nucleótidos (por ejemplo, alteraciones) se pueden generar por una variedad de métodos conocidos. Normalmente, se producen dichas moléculas modificadas de unión con base en Fn3 mediante métodos recombinantes. Más aún, debido a la degeneración del código genético, se puede utilizar una variedad de secuencias de ácidos nucleicos para codificar cada molécula deseada.

Los métodos de ejemplo reconocidos en la técnica para fabricar una molécula de ácido nucleico que codifica una variante de secuencia de aminoácidos de una molécula de partida incluyen, pero no se limitan a, preparación por mutagenia dirigida al sitio (o mediada por oligonucleótidos), mutagenia por PCR, y mutagenia de casete de un ADN preparado anteriormente que codifica la molécula.

La mutagenia dirigida a sitio es un método preferido para preparar variantes de sustitución. Esta técnica es bien conocida en el arte (véase, por ejemplo, Carter et al. Nucleic Acids Res. 13:4431-4443 (1985) y Kunkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 82:488 (1987)).Brevemente, al llevar a cabo la mutagenia dirigida al sitio de ADN, el ADN pariente se ve alterado al hibridar primero un oligonucleótido que codifica la mutación deseada con una sola hebra de dicho ADN pariente. Después de la hibridación, una polimerasa ADN se utiliza para sintetizar una segunda hebra completa, utilizando el oligonucleótido hibridado como un cebador, y utilizando la hebra sencilla del ADN pariente como una plantilla. Por lo tanto, el oligonucleótido que codifica la mutación deseada se incorpora en el ADN de doble hebra resultante.

La mutagenia por PCR también es adecuada para hacer variantes de secuencia de aminoácidos de la molécula de partida. Véase Higuchi, in PCR Protocols, pp. 177-183 (Academic Press, 1990); y Vallette et al., Nuc. Acids Res. 17:723-733 (1989). Brevemente, cuando se utilizan pequeñas cantidades de ADN plantilla como material de partida en un PCR, se pueden utilizar los cebadores que difieren ligeramente en la secuencia de la región correspondiente en un ADN plantilla para generar cantidades relativamente grandes de un fragmento de ADN específico que difiere de la secuencia plantilla sólo en las posiciones donde los cebadores difieren de la plantilla.

Otro método para preparar variantes, mutagenia de casete, se basa en la técnica descrita por Wells et al., Gene 34:315-323 (1985). El material de partida es el plásmido (u otro vector) que comprende el ADN del polipéptido de

partida que se va a mutar. Se identifica el codón en el ADN pariente que se va a mutar. Debe haber un sitio de endonucleasa de restricción único en cada lado de los sitios de mutación identificados. Si no existen dichos sitios de restricción, se pueden generar utilizando el método de mutagenia mediada por oligonucleótidos descrito anteriormente para introducirlos en ubicaciones adecuadas en el ADN del polipéptido de partida. El ADN de plásmido se corta en estos sitios para linealizarlo. Un oligonucleótido de doble hebra que codifica la secuencia del ADN entre los sitios de restricción pero que contiene la mutación deseada se sintetiza utilizando procedimientos estándar, en los que las dos hebras del oligonucleótido se sintetizan por separado y luego se hibridan juntas utilizando técnicas estándar. Este oligonucleótido de doble hebra se denomina como el casete. Este casete se diseña para tener extremos 5' y 3' que sean compatibles con los extremos del plásmido linealizado, de tal manera que pueda ligarse directamente al plásmido. Este plásmido contiene ahora la secuencia de ADN mutada.

Alternativamente, o adicionalmente, se puede determinar la secuencia de aminoácidos deseada que codifica una variante de polipéptido de la molécula, y se puede generar sintéticamente una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicha variante de secuencia de aminoácidos.

Se entenderá por una persona medianamente versada en la técnica que las moléculas de unión con base en Fn3 de la invención pueden ser modificadas adicionalmente de tal manera que varían en secuencia de aminoácidos (por ejemplo, de tipo natural), pero no en la actividad deseada. Por ejemplo, las sustituciones de nucleótidos adicionales que conducen a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos "no esenciales" se pueden hacer a la proteína. Por ejemplo, se puede reemplazar un residuo de aminoácido no esencial en una molécula con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. En otra realización, se puede sustituir una cadena de aminoácidos con una cadena estructuralmente similar que difiere en el orden y/o la composición de miembros de la familia de cadena lateral, es decir, se pueden hacer sustituciones conservadoras, en la que se reemplaza un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar.

Se han definido las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares en la técnica, que incluyen cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Aparte de las sustituciones de aminoácidos, la presente invención contempla otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la molécula de partida con el fin de generar moléculas funcionalmente equivalentes. Por ejemplo, se puede eliminar uno o más residuos de aminoácidos. Generalmente, no más de uno a aproximadamente diez residuos se eliminarán de acuerdo con esta realización de la invención. Las moléculas de unión con base en Fn3 que comprenden una o más supresiones de aminoácidos retendrán preferiblemente por lo menos aproximadamente 80%, y preferiblemente por lo menos aproximadamente 90%, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 95%, de la molécula de polipéptido de partida.

También se pueden hacer variantes de inserción de aminoácidos, que retienen la funcionalidad del dominio de Fn3 o la molécula de unión con base en Fn3 original. Por ejemplo, uno puede introducir por lo menos un residuo de aminoácidos (por ejemplo, uno a dos residuos de aminoácidos y generalmente no más de diez residuos) en la molécula. En otra realización se pueden combinar las modificaciones de aminoácidos dentro de un dominio de Fn3 o moléculas de unión con base en Fn3 únicas.

En una realización, se realizan sustituciones de aminoácidos en un dominio de Fn3 para incluir cisteína u otro aminoácido no natural para conjugar una unidad estructural a la molécula de unión con base en Fn3 utilizando métodos de conjugación bien conocidos. En particular, la invención se relaciona con variantes de aminoácido específicas de la molécula de unión con base en Fn3 con andamio Fn3, en donde uno o más residuos de serina de aminoácidos se sustituyen por cisteína o un aminoácido no natural. Los residuos de serina de aminoácidos que se pueden sustituir incluyen, pero no se limitan a Ser 1432, Ser 1436, Ser 1458, Ser 1475, y Ser 1504. Otras posiciones de aminoácido del andamio Fn3 que se pueden sustituir incluyen, pero no se limitan a, V1426, L1434, T1473 y T1486. Los aminoácidos no presentes en forma natural se pueden sustituir en el andamio Fn3 utilizando, por ejemplo, la tecnología Ambrex (Véase por ejemplo, documento US 7,045,337; 7,083,970).

2) Ensayos de detección para identificar moléculas de unión con base en Fn3

Se puede emplear una variedad de ensayos de detección para identificar moléculas de unión con base en Fn3 de la invención. Esencialmente se puede utilizar cualquier método de detección in vitro o in vivo que selecciona para unión a un antígeno deseado.

En una realización, las moléculas de unión con base en Fn3 se muestran en la superficie de una célula, virus o bacteriófago y se someten a selección utilizando antígeno inmovilizado. Los métodos adecuados de detección se

describen en los Números de Patentes Estadounidenses 7,063,943; 6,699,658; 7,063,943 y 5866344. Dicha exhibición de superficie puede requerir la creación de proteínas de fusión de las moléculas de unión con base en Fn3 con una proteína adecuada normalmente presente en la superficie externa de una célula, virus o bacteriófago. Las proteínas adecuadas a partir de las cuales se hacen dichas fusiones son bien conocidas en la técnica.

- 5 En otra realización, las moléculas de unión con base en Fn3 se detectan utilizando una presentación ligada a fenotipo- genotipo in vitro tal como presentación de ribosomas o polisomas. Dichos métodos de "evolución molecular" son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo Números de Patente Estadounidense 6,194,550 y 7,195,880).

10 Los métodos de detección pueden incluir uno o más etapas de maduración de afinidad in vivo o in vitro. Se puede emplear cualquier método de maduración de afinidad que resulte en cambios de aminoácidos en el dominio de Fn3 o las CDR que mejoran la unión de la molécula de unión con base en Fn3 para el antígeno deseado. Estos cambios de aminoácidos, por ejemplo, se pueden lograr a través de mutagenia aleatoria, "mutagenia por desplazamiento completo", y mutagenia "look through". Se puede lograr dicha mutagenia al utilizar, por ejemplo, PCR propensa a errores, cepas de "mutador" de levadura o bacterias, incorporación de cambios de ácidos nucleicos aleatorios o definidos durante síntesis ab initio de todo o parte de una molécula de unión con base en Fn3. se describen métodos para realizar la maduración de afinidad y/o mutagenia, por ejemplo, en los Números de Patente Estadounidenses 7,195,880; 6,951,725; 7,078,197; 7,022,479; 5,922,545; 5,830,721; 5,605,793, 5,830,650; 6,194,550; 6,699,658; 7,063,943; 5866344 y Publicación del Tratado de Cooperación de Patentes WO06023144. Dichos métodos de maduración de afinidad pueden requerir adicionalmente que el rigor del ensayo de selección de unión al antígeno se aumente para seleccionar moléculas de unión con base en Fn3 con una mejor afinidad para el antígeno. Se pueden utilizar aquí métodos reconocidos en la técnica para aumentar el rigor de un ensayo de interacción proteína-proteína. En una realización, se varían una o más de las condiciones de ensayo (por ejemplo, la concentración de sal del regulador de ensayo) para reducir la afinidad de las moléculas de unión con base en Fn3 para el antígeno deseado. En otra realización, se reduce la duración de tiempo permitida para que las moléculas de unión con base en Fn3 se unan con el antígeno deseado. En otra realización, se agrega una etapa de unión competitiva al ensayo de interacción proteína-proteína. Por ejemplo, las moléculas de unión con base en Fn3 primero se dejan unir a un antígeno inmovilizado deseado. Luego se agrega una concentración específica de antígeno no inmovilizado que sirve para competir por la unión con el antígeno inmovilizado de tal manera que se eluyen las moléculas de unión con base en Fn3 con afinidad más baja para el antígeno del antígeno inmovilizado que resulta de la selección de moléculas de unión con base en Fn3 con afinidad de unión a antígeno mejorada. La rigurosidad de las condiciones de ensayo se puede aumentar adicionalmente al incrementar la concentración de antígeno no inmovilizado que se agrega al ensayo.

15 Los métodos de detección de la invención también pueden requerir múltiples rondas de selección para enriquecer una o más moléculas de unión con base en Fn3 con unión mejorada a antígeno. En una realización, en cada ronda de selección se introducen mutaciones de aminoácidos adicionales en las moléculas de unión con base en Fn3. En otra realización, en cada ronda de selección se aumenta la rigurosidad de unión al antígeno deseado para seleccionar moléculas de unión con base en Fn3 con afinidad en aumento para el antígeno.

20 En el caso de las moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas de la descripción, es preferible detectar para cada una especificidad de unión de forma independiente. De acuerdo con lo anterior, se realiza una primera detección para identificar moléculas de unión con base en Fn3 individuales, que se unen a un primer objetivo, utilizando una primera colección de moléculas de unión con base en Fn3, donde se altera uno o más aminoácidos en uno o más de los bucles AB, CD o EF. Se realiza una segunda detección separada para identificar moléculas de unión con base en Fn3 individuales, que se unen a un segundo objetivo, utilizando una segunda colección de moléculas de dominio de Fn3, donde se altera uno o más aminoácidos en uno o más de los bucles BC, DE y FG. 25 Las secuencias de aminoácidos de las moléculas de unión con base en Fn3 monoespecíficas individuales identificadas a partir de las dos detecciones se determinan utilizando métodos reconocidos en la técnica. Se generan moléculas de unión con base en Fn3 biespecíficas al combinar la primera y segunda secuencias de unión de objetivo a partir de moléculas de unión con base en Fn3 individuales en moléculas de unión con base en Fn3 individuales, quiméricas.

50 3) Métodos de fabricación

Las moléculas de unión con base en Fn3 de la invención se producen normalmente mediante expresión recombinante. Los ácidos nucleicos que codifican las moléculas se insertan en vectores de expresión. Los segmentos de ADN que codifican las moléculas se unen operativamente a secuencias de control en el vector de expresión que aseguran su expresión. Las secuencias de control de expresión incluyen, pero no se limitan a, 55 promotores (por ejemplo, promotores asociados de forma natural o heterólogos), secuencias de señal, elementos potenciadores, y secuencias de terminación de transcripción. Preferiblemente, las secuencias de control de expresión son sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células anfitrionas eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado en el anfitrión apropiado, el anfitrión se mantiene bajo

condiciones adecuadas para expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la colección y purificación de la reacción cruzada de la molécula de unión con base en Fn3.

Estos vectores de expresión son normalmente replicables en los organismos anfitriones ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del anfitrión. Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección (por ejemplo, resistencia a ampicilina, resistencia a higromicina, resistencia a tetraciclina o resistencia a neomicina) para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, Itakura et al., Patente Estadounidense 4,704,362).

La *E. coli* es un anfitrión procariota particularmente útil para clonar los polinucleótidos (por ejemplo, secuencias de ADN) de la presente invención. Otros anfitriones microbianos adecuados para uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia* y diversas especies de *Pseudomonas*.

Otros microbios, tales como levaduras, también son útiles para expresión. Las *Saccharomyces* y *Pichia* son anfitriones de levadura de ejemplo, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de expresión (por ejemplo, promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee. Los promotores típicos incluyen 3- fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glucolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores del alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C, y enzimas responsables de la utilización de metanol, maltosa, y galactosa.

Adicionalmente a los microorganismos, también se pueden utilizar cultivos de tejido de mamífero para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, polinucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas). Véase Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Actualmente se prefieren células eucariotas, porque se han desarrollado un número de estirpes celulares anfitrionas adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas (por ejemplo, inmunoglobulinas intactas) en la técnica, e incluyen estirpes celulares de CHO, diversas estirpes celulares de COS, células HeLa, células 293, estirpes celulares de mieloma, célula B transformadas, e hibridomas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, y un potenciador (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras de transcripción. Las secuencias de control de la expresión preferidas son promotores derivados de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares. Véase Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

Alternativamente, se pueden incorporar secuencias de codificación en transgenes para introducción en el genoma de un animal transgénico y expresión posterior en la leche del animal transgénico (véase, por ejemplo, Deboer et al., U.S. 5,741,957, Rosen, U.S. 5,304,489, y Meade et al., U.S. 5,849,992). Los transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes para cadenas livianas y/o pesadas en unión operativa con un promotor y potenciador de un gen específico de la glándula mamaria, tal como caseína o beta lactoglobulina.

Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótido de interés y secuencias de control de expresión se pueden transferir en la célula anfitriona por métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de anfitrión celular. Por ejemplo, las células procarióticas químicamente competentes pueden ser brevemente golpeadas con calor, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, biolística o transfección con base en virus se pueden utilizar para otros anfitriones celulares. (Véase en general Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989). Otros métodos utilizados para transformar células de mamífero incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación, y microinyección (véase de manera general, Sambrook et al., *supra*). Para la producción de animales transgénicos, se pueden microinyectar transgenes en ovocitos fertilizados, o se pueden incorporar en el genoma de células madre embrionarias, y los núcleos de dichas células transferidas a ovocitos enucleados.

Una vez expresadas, las moléculas de unión con base en Fn3 de la presente invención se pueden purificar de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, que incluyen precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía de columna, purificación por HPLC, electroforesis en gel y similares (véase, de manera general Scopes, *Protein Purification* (Springer - Verlag, Nueva York, (1982)). Se prefieren moléculas sustancialmente puras de por lo menos aproximadamente 90 a 95% de homogeneidad, y se prefieren más preferidas de 98 a 99% o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos.

4) Métodos para injertar CDR a las moléculas de de unión con base en Fn3

En un aspecto, la presente descripción caracteriza una molécula de unión con base en Fn3 alterada en comparación con el dominio de Fn3 tipo natural que contiene todo o una porción de una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo o un receptor de célula T.

Las regiones CDR de cualquier anticuerpo o receptor de células T de la región variable, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, son adecuadas para el injerto. Las CDR se pueden obtener a partir del anticuerpo o el repertorio de receptores de células T de cualquier animal que incluye, pero no se limita a, roedores, primates, camélidos o tiburones. En una descripción particular, las CDR se obtienen de CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo de dominio único, por ejemplo, un nanocuerpo. En una descripción más específica, la CDR1, 2 o 3 de un anticuerpo de dominio único, tal como un nanocuerpo, se injertan en cualquiera de los bucles AB, BC, CD, DE, EF o FG de un dominio Fn3, proporcionando de ese modo la especificidad de unión a objetivo del nanocuerpo original a la molécula de unión con base en Fn3. Las colecciones de ingeniería de anticuerpos de camélidos y fragmentos de anticuerpos están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Ablynx, Gante, Bélgica. El repertorio de anticuerpos puede ser de animales inoculados con uno o más antígenos o de animales intactos que no han sido inoculados con el antígeno. Adicionalmente o alternativamente, las CDR se pueden obtener a partir de anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, producidos por métodos de detección de colección in vitro o in vivo, que incluyen, pero no se limitan a, polisomas in vitro técnicas de presentación de ribosomas, presentación de fagos o presentación de levadura. Esto incluye anticuerpos no generados originalmente por métodos de detección de colección in vitro o in vivo pero que se han sometido posteriormente a mutagenia o una o más etapas de maduración de afinidad utilizando métodos de detección in vitro o in vivo. Ejemplos de dichos métodos de detección de colección in vitro o in vivo o métodos de maduración de afinidad se describen, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Números 7,195,880; 6,951,725; 7,078,197; 7,022,479; 5,922,545; 5,830,721; 5,605,793; 5,830,650; 6,194,550; 6,699,658; 7,063,943; 5866344 y Publicaciones del Tratado de Cooperación de Patentes WO06023144.

Los métodos para identificar las CDR de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)). El ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular se puede aislar y secuenciado, y las secuencias de CDR se deducen mediante inspección de la proteína codificada con respecto a la secuencia de nomenclatura anticuerpo establecida. Los métodos para injertar regiones hipervariables o CDR en un andamio de unión con base en Fn3 de la invención incluyen, por ejemplo, ingeniería genética, síntesis de ácido nucleico de novo o ensamble de genes con base en PCR (véase, por ejemplo Patente Estadounidense Número 5,225.539).

Las técnicas anteriores permiten la identificación de un bucle de andamio adecuado para la selección y presentación de una región hipervariable o CDR. Sin embargo, se pueden invocar mediciones adicionales para mejorar adicionalmente el ajuste y la presentación de la región hipervariable con base en el modelado estructural del dominio de Fn3 y el anticuerpo donante.

Los residuos de aminoácidos específicos en cualquiera de las hebras beta de un dominio de Fn3 se mutan para permitir que los bucles de CDR adopten una conformación que retiene o mejora la unión a antígeno. Este procedimiento se puede realizar de una manera análoga a aquella del injerto de CDR en un marco de anticuerpo heterólogo, utilizando una combinación de modelado estructural y comparación de secuencias. En una descripción, se mutan los residuos del dominio de Fn3 adyacentes a una CDR de una manera similar a aquella realizada por Queen et al. (véase Patentes Estadounidenses Números 6,180,370; 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089; 7,022,500). Los residuos del dominio de Fn3 dentro de un radio de Van der Waals de residuos de CDR se mutan de una forma similar a aquella realizada por Winter et al. (véase Patentes Estadounidenses Números 6,548,640; 6,982,321). En otra descripción, los residuos del dominio de Fn3 que no son adyacentes a residuos de CDR, pero se prevén, con base en el modelado estructural del dominio de Fn3 y el anticuerpo donante, para modificar la conformación de los residuos de CDR se mutan de una forma similar a la realizada por Carter et al. o Adair et al véase Patentes Estadounidenses Números 6,407,213; 6,639,055; 5,859,205; 6,632,927).

Composiciones

La presente invención también proporciona composiciones, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene una o una combinación de moléculas de unión con base en Fn3 (o variantes, fusiones y conjugados de las mismas), formuladas junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en terapia de combinación, es decir, combinarse con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con por lo menos uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes anti-inflamatorios, agentes anti-neoplásicos, y agentes quimioterapéuticos.

También se pueden administrar las composiciones farmacéuticas de la invención en combinación con terapia de radiación. La co-administración con otras moléculas con base en Fn3 también se abarcan por la descripción.

Como se utiliza aquí, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cualesquier solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el portador es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o

infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, molécula biespecífica y multiespecífica, se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

5 “Sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto pariente y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge, SM, et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como también de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono - y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos ácidos alcanoicos fenil sustituidos, ácidos hidroxil alcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

15 Una composición de la presente invención se puede administrar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Los compuestos activos se pueden preparar con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulado. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etileno- vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o generalmente se conocen por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

25 Para administrar un compuesto de la invención mediante ciertas rutas de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, se puede administrar el compuesto a un sujeto en un portador apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones salinas y de regulador acuoso. Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua - en - aceite - en - agua, así como liposomas convencionales (Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 07:27).

30 Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Se conoce el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las composiciones.

35 Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Se puede formular la composición como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede provocar al incluir en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

45 Se pueden preparar soluciones inyectables estériles al incorporar el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con una o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización mediante microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar el compuesto activo en un portador estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estéril de este.

55 Se ajustan los regímenes de dosificación para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas durante el tiempo o se puede reducir o aumentar la dosis proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Por ejemplo, la molécula de unión con base en Fn3 de la invención se puede administrar una vez o dos veces por semana mediante inyección subcutánea o una vez o dos veces al mes

mediante inyección subcutánea. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria como se utiliza aquí se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitarias de la invención se dictan por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición tal como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares, y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de la presente invención incluyen aquellas adecuadas para administración oral, nasal, tópica (que incluyen bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica de la farmacia. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto que se está tratando, y el modo de administración particular. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación unitaria será generalmente aquella cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de un cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente 0.001 por ciento a aproximadamente el noventa por ciento del ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente 0.005 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, más preferiblemente de aproximadamente 0.01 por ciento a aproximadamente 30 por ciento.

Las formulaciones de la presente invención que son adecuadas para administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones rociadoras que contienen dichos portadores que se sabe que son adecuados en la técnica. Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de composiciones de esta invención incluyen polvos, rociadores, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo se puede mezclar bajo condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualesquier conservantes, reguladores, o propulsores que se puedan requerir.

Las frases "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" como se utiliza aquí, significa modos de administración diferentes a administración enteral y tópica, usualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, inyección epidural e intraesternal e infusión.

Ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensoactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar mediante procedimientos de esterilización, supra, y mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Adicionalmente, se puede provocar la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Cuando los compuestos de la presente invención se administran como productos farmacéuticos, a humanos y animales, se pueden administrar solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, de 0.001 a 90% (más preferiblemente, 0.005 a 70%, tal como 0.01 a 30%) de ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Independientemente de la ruta de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que se pueden utilizar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante los métodos convencionales conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Se pueden variar los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención para obtener una cantidad del ingrediente activo que es efectivo para lograr la respuesta terapéutica deseada de un paciente en particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares empleadas de la presente invención, o el éster, sal o amida de las mismas, la ruta de administración, tiempo de administración, índice de excreción del compuesto empleado en particular, duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, edad, sexo, peso, afección, salud general e historial médico previo del paciente que se va a tratar, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Un médico o veterinario medianamente versado en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad efectiva de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica en niveles más bajos que lo requerida con el fin de alcanzar el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se alcanza el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será aquella cantidad del compuesto que es la dosis efectiva más baja para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis efectiva dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea, preferiblemente se administra próxima al sitio del objetivo. Si se desea, la dosis diaria efectiva de las composiciones terapéuticas se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sub-dosis administradas separadamente a intervalos apropiados durante todo el día, opcionalmente, en formas de dosificación unitarias. Aunque es posible administrar solo un compuesto de la presente invención, es preferible administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición).

Se pueden administrar composiciones terapéuticas con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, se puede administrar una composición terapéutica de la invención con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824, o 4,596,556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos en la presente invención incluyen: Patente Estadounidense No. 4,487,603, que describe una bomba de micro-infusión que se puede implantar para suministrar medicación a un índice controlado; Patente Estadounidense No. 4,486,194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; Patente Estadounidense No. 4,447,233, que describe una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación en un índice de infusión preciso; Patente Estadounidense No. 4,447,224, que describe un aparato de infusión que se puede implantar para flujo variable para suministro continuo de fármaco; Patente Estadounidense No. 4,439,196, que describe un sistema de suministro de fármaco osmótico que tiene compartimientos multi-cámara; y Patente Estadounidense No. 4,475,196, que describe un sistema de suministro de fármaco osmótico. Muchos otros de dichos implantes, sistemas de suministro, y módulos se conocen por aquellos expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, las moléculas de la invención se pueden formular para asegurar distribución apropiada in vivo. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BBB (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para o métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, Patentes Estadounidenses 4,522,811; 5,374,548; y 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más unidades estructurales que se transportan selectivamente en células u órganos específicos, mejorando el suministro de fármacos dirigidos (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Las unidades estructurales dirigidas de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, patente Estadounidense 5,416,016 otorgada a Low et al.); manósidos (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); anticuerpos (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor A de proteína de tensoactivo (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134), diferentes especies de las cuales pueden comprender las formulaciones de las invenciones, así como componentes de las moléculas inventadas; p120 ((Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273. En una realización de la invención, los compuestos terapéuticos de la invención se formulan en liposomas; en una realización más preferida, los liposomas incluyen una unidad estructural dirigida. En una realización más preferida, los compuestos terapéuticos en los liposomas se suministran mediante inyección en bolo a un sitio próximo al tumor o infección. La composición debe ser fluida en la medida en que exista una fácil capacidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

En una realización adicional, se pueden formular las moléculas de la invención para prevenir o reducir el transporte a través de la placenta. Esto se puede hacer mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la PEGilación de la molécula de unión con base en Fn3. se pueden hacer otras referencias a "Cunningham-Rundles C, Zhuo Z, Griffith B, Keenan J. (1992) Biological activities of polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation. *J Immunol Methods.* 152:177-190; y a "Landor M. (1995) Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, *Ann Allergy Asthma Immunol* 74: 279-283. Esto es particularmente relevante cuando se utilizan las moléculas de unión con base en Fn3 para el tratamiento o prevención de aborto espontáneo recurrente.

5 Se puede evaluar la capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, se puede evaluar esta propiedad de una composición examinando la capacidad del compuesto para inhibir, dicha inhibición in vitro por ensayos conocidos por el experto en la técnica. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o de otra forma aliviar los síntomas en un sujeto. Una persona medianamente versada en la técnica sería capaz de determinar tales cantidades con base en dichos factores como el tamaño del sujeto, gravedad de los síntomas del sujeto, y composición particular o ruta de administración seleccionada.

10 La composición debe ser estéril y fluida en el grado que la composición se pueda suministrar mediante jeringa. Adicionalmente al agua, el portador puede ser una solución salina regulada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. Se puede provocar absorción a largo plazo de las composiciones inyectables al incluir en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

15 Cuando se protege adecuadamente el compuesto activo, como se describió anteriormente, se puede administrar el compuesto oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable.

Aplicaciones terapéuticas y diagnósticas

20 Se pueden construir las moléculas de unión con base en Fn3 descritas aquí para unir cualquier antígeno u objetivo de interés. Estos objetivos incluyen, pero no se limitan a, dominios de agrupamiento, receptores celulares, ligandos del receptor celular, factores de crecimiento, interleuquinas, alérgenos de proteínas, bacterias, o virus (véase, Figura 1). También se pueden modificar las moléculas de unión con base en Fn3 descritas aquí para que tengan aumento de estabilidad y semivida, así como unidades estructurales funcionales adicionales. De acuerdo con lo anterior, se pueden emplear estas moléculas en lugar de anticuerpos en todas las áreas en las que se utilizan anticuerpos, que incluyen en los campos de investigación, terapéuticos, y de diagnóstico. Adicionalmente, debido a que estas moléculas poseen propiedades de solubilidad y estabilidad superiores a los anticuerpos, los imitadores de anticuerpos descritos aquí también se pueden utilizar bajo condiciones que destruirían o inactivarían las moléculas de anticuerpo.

30 Por ejemplo, se pueden administrar estas moléculas a células en cultivo, por ejemplo, in vitro o ex vivo, o en un sujeto, por ejemplo, in vivo, para tratar, prevenir o diagnosticar una variedad de trastornos. El término "sujeto" tal como se utiliza aquí pretende incluir animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios, y reptiles. Cuando las moléculas de Fn3 se administran junto con otro agente, los dos se pueden administrar en cualquier orden o de forma simultánea.

35 En una realización, se pueden utilizar las moléculas de unión con base en Fn3 (y variantes, fusiones y conjugados de las mismas) de la invención para detectar los niveles del objetivo unidos por la molécula. Esto se puede lograr, por ejemplo, al poner en contacto una muestra (tal como una muestra in vitro) y una muestra de control con la molécula bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre la molécula y el objetivo. Cualesquier complejos formados entre la molécula y el objetivo se detectan y se comparan en la muestra y el control. Por ejemplo, se pueden realizar los métodos de detección estándar, bien conocidos en la técnica, tales como ELISA, FACS, y ensayos de citometría de flujo, utilizando las composiciones de la invención.

40 También dentro del alcance de la descripción hay equipos que comprenden las composiciones (por ejemplo, moléculas de unión con base en Fn3, variantes, fusiones y conjugados de las mismas) de la invención y las instrucciones para uso. El equipo puede contener adicionalmente por lo menos un reactivo adicional, o una o más moléculas de unión con base en Fn3 adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno objetivo distinto de la primera molécula). Los equipos normalmente incluyen un marcador que indica el uso destinado de los contenidos del equipo. El término marcador incluye cualquier material escrito, o registrado suministrado en o con el equipo, o que de otra acompaña al equipo.

45 Como se describió anteriormente, las moléculas de la presente invención se pueden emplear en todas las áreas de los campos de investigación, terapéuticos, y de diagnóstico. Ejemplos de enfermedades/trastornos que se pueden tratar utilizando las moléculas de unión con base en Fn3 de la presente invención (y variantes, fusiones y conjugados de las mismas) incluyen trastornos autoinmunes, cánceres, infecciones y otras indicaciones patogénicas.

50 Ejemplos específicos de afecciones autoinmunes en las que se pueden utilizar las moléculas de unión con base en Fn3 de la invención incluyen, pero no se limitan a, las siguiente: esclerosis múltiple y otras enfermedades

desmielinizantes; artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino; lupus eritematoso sistémico; diabetes Tipo I, trastornos inflamatorios de la piel, síndrome de Sjogren, y rechazo de trasplante.

5 Ejemplos específicos de cánceres en los que se pueden utilizar las moléculas de unión con base en Fn3 de la invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: de pulmón; de mama; de próstata; de vejiga, melanoma, linfoma no Hodgkin, de colon y de recto; pancreático; endometrial, renal, de piel (no melanoma), leucemia, y de tiroides.

10 Ejemplos específicos de enfermedades asociadas con VEGF incluyen, por ejemplo, un número de afecciones asociadas con angiogenia inapropiada, que incluyen pero no se limitan a trastornos autoinmunes (por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal o psoriasis); trastornos cardíacos (por ejemplo, aterosclerosis o reestenosis de vasos sanguíneos); retinopatías (por ejemplo, retinopatías generalmente proliferativas, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad o glaucoma neovascular), enfermedad renal (por ejemplo, nefropatía diabética, nefrosclerosis maligna, síndromes de microangiopatía trombótica; rechazo de trasplante; enfermedad renal inflamatoria; glomerulonefritis; glomerulonefritis mesangioproliferativa; síndrome hemolítico-urémico, y nefrosclerosis hipertensiva); hemangioblastoma; hemangiomas; hiperplasias de tiroides; trasplantes de tejidos; inflamación crónica; síndrome de Meigs; derrame pericárdico, derrame pleural; enfermedades autoinmunes; 15 diabetes; endometriosis; asma crónica; fibrosis indeseable (particularmente fibrosis hepática) y cáncer, así como también complicaciones que surgen de cáncer, tales como derrame pleural y ascitis. Se pueden utilizar moléculas de unión con base en Fn3 para el tratamiento o prevención de enfermedades hiperproliferativas o cáncer y la diseminación metastásica de cánceres. Ejemplos no limitantes de cánceres incluyen cáncer de vejiga, sangre, 20 hueso, cerebro, mama, cartílago, riñón, colon, hígado, pulmón, ganglios linfáticos, tejido nervioso, ovario, páncreas, próstata, músculo esquelético, piel, médula espinal, bazo, estómago, testículos, timo, tiroides, tráquea, tracto urogenital, uréter, uretra, útero, o vaginal. Se pueden encontrar afecciones tratables adicionales en el documento U.S.P.N. 6,524,583, incorporado aquí mediante referencia. Otras referencias que describen usos para los polipéptidos de unión de VEGFR -2 incluyen: McLeod DS et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002 Feb;43(2):474-82; 25 Watanabe et al. Exp Dermatol. 2004 Nov;13(11): 671-81; Yoshiji H et al., Gut. 2003 Sep;52(9): 1347-54; Verheul et al., Oncologist. 2000;5 Suppl 1:45-50; Boldicke et al., Stem Cells. 2001;19(1):24-36. Como se describe aquí, las enfermedades asociadas con angiogenia incluyen, pero no se limitan a, cáncer dependiente de angiogenia, que incluye, por ejemplo, tumores sólidos, tumores de sangre tales como leucemias, y metástasis tumorales; tumores benignos, por ejemplo hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomias, y granulomas piógenos; 30 trastornos inflamatorios tales como inflamación inmune y no inmune; reumatismo articular crónico y psoriasis; enfermedades angiogénicas oculares, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía de prematuridad, degeneración macular, rechazo de injerto de córnea, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rubeosis; síndrome de Osler-Webber; angiogenia miocárdica; neovascularización de placa; telangiectasia; articulaciones hemofílicas; angiofibroma, y granulación de heridas y cicatrización de heridas; telangiectasia esclerodermia psoriasis, granuloma piógeno, colaterales coronarias, angiogenia de extremidad isquémica, enfermedades de la córnea, rubeosis, artritis, 35 neovascularización diabética, fracturas, vasculogenia, hematopoyesis (véase, por ejemplo, WO2005056764).

Los ejemplos específicos de infecciones en las que se pueden utilizar las moléculas de unión con base en Fn3 de la invención incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: celular, fúngica, bacteriana, y vírica.

40 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deben interpretar como adicionalmente limitantes. Los contenidos de todas las figuras y todas las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas citadas a lo largo de esta solicitud se incorporan expresamente aquí mediante referencia.

Ejemplificación

Ejemplo 1

Producción de colecciones de moléculas de unión con base en fibronectina

45 En general, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, por ejemplo, tecnología de anticuerpos), y técnicas estándar en preparación de polipéptidos. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); and Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992). Se encuentran otros métodos, técnicas y secuencias adecuadas para uso en llevar a cabo la presente invención en las Patentes Estadounidenses Nos. 7,153,661; 7,119,171; 7,078,490; 6,703,199; 6,673,901; y 6,462,189.

La 10^a proteína de fibronectina humana (Fn3¹⁰) se utiliza para diseñar, aislar y crear con ingeniería ligadores mono-específicos. Se aíslan primero independientemente los ligadores iniciales a partir de dos colecciones utilizando métodos de selección estándar. Luego se somete a mutagenia esta población enriquecida, y se realizan rondas sucesivas de mutagenia aleatoria y enriquecimiento cayo para alcanzar los ligadores mono-específicos deseados.

5 Construcción de la colección

Se utiliza la secuencia Fn3¹⁰ tipo natural como se muestra en SEQ ID NO: 1 como la base para generar colecciones de ligadores que utilizan los bucles superiores o inferiores.

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSK
STATISGLKPGVDYITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 1)

10 Utilizando modelos computacionales, dos grupos de regiones variables del Fn3¹⁰ tipo natural se seleccionan para ser aleatorias. El primer grupo que comprende los bucles superiores BC, DE y FG expuestos al solvente se designan colección A y se aleatorizan en la región mostrada en negrita en la SEQ ID NO: 2.

Colección A (intercalación beta con bucles superiores BC, DE y FG expuestos a solventes).

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWD**APAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSK**
STATISGLKPGVDYITVYAVT**GRGDSPASSKPISINYRTEI** (SEQ ID NO: 2)

15 El segundo grupo que comprende los bucles inferiores AB, CD, EF expuestos a solventes y terminal C se designa colección B y se aleatoriza en las regiones subrayadas que aparecen en cursiva.

Colección B (intercalación beta con bucles inferiores AB, CD, EF expuestos a solventes y terminal C).

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKS
TATISGLKPGVDYITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 3)

20 Se han optimizado secuencias de ADN correspondientes a las dos colecciones para la expresión en E. coli en Genearth AG, Alemania. Las regiones en negrita o subrayadas en cursiva de las SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente, se sintetizan como posiciones degeneradas. Las colecciones se ensamblan a partir de oligonucleótidos sintéticos degenerados y genes correspondientes a fragmentos de longitud completa purificados en gel. La amplificación se realiza con cebadores terminales y ligación posterior de la colección amplificada en vectores de clonación pCR - Script produce las colecciones de partida. Luego se detectan las colecciones A y B de forma independiente para identificar ligadores mono-específicos como se describe en el Ejemplo 2 adelante.

25 **Ejemplo 2**

Detección de moléculas de unión con base en fibronectina mono-específicas

30 El presente ejemplo describe cómo detectar ligadores mono-específicos de fibronectina generados a partir de las Colecciones A y B descritas en el Ejemplo 1. Ambas colecciones A y B se subclonan independientemente en un vector de presentación en levadura tal como pYD1 (Invitrogen), utilizando métodos de recombinación homóloga y se transforman en una cepa adecuada, tal como EBY100 utilizando técnicas de biología molecular convencionales.

La presentación y selección de ligadores con base en fibronectina contra lisozima blanca de huevo de gallina se realiza siguiendo esencialmente el protocolo previamente publicado por Lipovsek, D. et al, (J Mol Biol. 2007 May 11;368(4):1024-41) con algunas modificaciones menores. Ambas colecciones se revisan de forma independiente para los ligadores de lisozima blanca de huevo de gallina.

35 (i) Selección para unión a lisozima blanca de huevo de gallina mediante la clasificación de perlas magnéticas

Para todas las selecciones, los cultivos de levaduras que presentan colección A o colección B de moléculas con base en ¹⁰Fn3 se inducen durante 18 horas a 30° C en medio que contiene galactosa (90% de SG-CAA/10% de SD - CAA, 50 µg/mL de kanamicina, 100 U/ml de penicilina G, 200 U/ml de estreptomycin). 10⁹ células de levadura inducidas de las colecciones A o B se lavan con 25 mL de solución salina regulada con fosfato enfriada con hielo

(PBS), pH 7.4, de ácido etilendiaminotetraacético 2 mM (EDTA), 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA) y luego se incuban en 5 mL del mismo regulador que contiene lisozima blanca de huevo de gallina biotinilada 1 μ M (HEL-b, Sigma, St. Louis, MO) durante 1 h a temperatura ambiente con rotación suave. Luego de incubación, la muestra se enfría en hielo, se lava con 25 mL de PBS enfriado con hielo, pH 7.4, EDTA 2 mM, 0.5% de BSA y se resuspende en 2.5 mL del mismo regulador. Se agregan 100 μ L de alícuotas de microperlas magnéticas de estreptavidina (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) a la levadura y se incuba en hielo durante 10 min. Se agrega PBS enfriado con helio, pH 7.4, EDTA 2 mM, 0.5% de BSA a la muestra a un volumen total de 25 mL inmediatamente antes de que se someta a separación en un Separador de Células AutoMACS (Miltenyi Biotec), utilizando el programa preestablecido para selección positiva de células raras (possel_s). Las células seleccionadas se recogen en 6 mL de SD-CAA, pH 4.5, 50 μ g/mL de kanamicina, 100 U/ml de penicilina G, 200 U/ml de estreptomycin; se cuantifica mediante dilución en serie seguida de colocación en placas de agar SD-CAA, y se hacen crecer en 50 mL del mismo medio durante 2 días a 30° C.

(ii) Selección para unión a lisozima blanca de huevo de gallina utilizando clasificación de células activadas por fluorescencia

Se realizan rondas de selección posteriores mediante FACS, comenzando con 2×10^6 a 3×10^6 células de levadura inducidas. Las células se lavan con 1 mL de PBS, pH 7.4, 0.1% de BSA, se resuspenden en 100 μ L de la misma solución reguladora que contiene lisozima blanca de huevo de gallina biotinilada, y se incuban a temperatura ambiente con rotación suave durante 1 h.

Después de ser lavados con 1 mL de PBS enfriado con hielo, pH 7.4, 0.1% de BSA, las células se marcan con anticuerpos y estreptavidina. Se utiliza anticuerpo anti-c-myc conjugado con FITC monoclonal de ratón (ABD Serotec) para marcar la levadura para la presentación en superficie de imitadores de anticuerpos marcados c-myc, y se utilizan estreptavidina PE-marcada (Invitrogen) o anticuerpo anti-biotina (Miltenyi) para el marcador HEL-b asociado con imitadores de anticuerpo de unión a lisozima. Las clases de FACS se realizan en células de levadura marcadas con anticuerpo anti-c-myc conjugado con FITC de ratón y estreptavidina PE-conjugada (Invitrogen).

Se clasifican células de levadura doblemente marcadas en un clasificador de células a alta velocidad Dako MoFlo con un láser de 488 nm, en 6000-10,000 células/s. Las puertas se ajustan para recolectar las células de levadura con la más alta 0.1-1% de la señal asociada con HEL-b (PE) y en la mitad superior de la señal asociada con expresión (FITC). Las muestras duplicadas marcadas con el mismo anticuerpo y reactivos de estreptavidina, pero en ausencia de HEL-b se utilizan para evitar seleccionar células que se unen a reactivos de detección en lugar de lisozima.

Para todas las colecciones, las dos primeras clases de FACS se realizan en la levadura marcada con 1 μ M de HEL-b. Una vez que se observa una población de células que se marca con PE en la presencia pero no en ausencia de HEL-b, la concentración de HEL-b en la ronda posterior se reduce en un orden de magnitud. Las células seleccionadas se recolectan en 0.5 mL de SD-CAA, pH 4.5, 50 μ g/mL de kanamicina, 100 U/ml de penicilina G, y 200 U/ml de estreptomycin. Las células recolectadas se cultivan hasta saturación en 5 mL del mismo medio, con agitación, durante 2 días a 30° C, antes de ser inducida y marcado para la siguiente ronda de clasificación.

Después de diversas rondas de clasificación FACS la población final enriquecida se coloca en placas SDCAA y se incuba a 30° C durante 2 días. Las colonias individuales se recogen utilizando un Genetix Clonepix y se re-disponen en placas de 96 pozos que contienen medio SD-CAA. Después de la incubación durante 24 horas, las células se recolectan mediante centrifugación y se resuspenden en medio SD-GAA para inducción de superficie expresada en moléculas de Fn3 únicas. Los clones positivos se identifican mediante ELISA estándar. El plásmido de ADN correspondiente a los clones positivos de Fn3 únicos se purifica y secuencia para identificar ligadores mono-específicos.

Una vez se identifican los ligadores mono-específicos y se seleccionan de cualquiera de las colecciones A o B, se pueden utilizar de forma independiente para generar moléculas terapéuticas. En particular, los ligadores mono-específicos generados a partir de la colección B utilizando los bucles inferiores de la molécula de Fn3 se pueden utilizar para generar moléculas de unión terapéutica nuevas contra un objetivo de interés. Se pueden combinar diversos ligadores mono-específicos de la colección B con ligadores para producir una molécula de unión de Fn3 que es capaz de unirse a una o más regiones de un único objetivo (por ejemplo, TNF). Alternativamente, una molécula de unión de Fn3 que comprende ligadores de la Colección B también se puede diseñar para unirse a una o más regiones de múltiples objetivos (por ejemplo, una o más regiones de HSA y TNF).

Adicionalmente, se pueden combinar los ligadores mono-específicos generados a partir de la Colección A y Colección B utilizando la técnica de biología molecular estándar para generar ligadores bis-específicos y multiespecíficos como se describe en el Ejemplo 3 adelante.

55 Ejemplo 3

Generación de moléculas de unión con base en fibronectina bifuncionales

5 El modelado por ordenador de las regiones aleatorias en la estructura de rayos x de Fn3 humano muestra que al combinar ligadores mono-específicos de cada una de las colecciones A y B, se puede crear moléculas de unión a fibronectina biespecíficas. Estas moléculas de unión se pueden diseñar por ingeniería de tal manera que reconocen diferentes regiones de la misma molécula objetivo, o que los diferentes sitios de unión de la molécula de fibronectina biespecífica o multiespecífica se pueden unir a diferentes regiones en dos o más objetivos diferentes.

Por ejemplo, una secuencia adecuada que corresponde al ligador A (obtenido al detectar la colección A) y una secuencia adecuada que corresponde al ligador B (obtenido al detectar la colección B) se pueden combinar en una única molécula para generar una molécula biespecífica.

10 Ligador A identificado al detectar la colección A (intercalación beta con bucles superiores BC, DE y FG expuestos a solventes).

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWXXXXXXXXRYRITYGETGGNSPVQEFTVPXXX
XTATISGLKPGVDYITITVYAVTXXXXXXXXXXXPISINYRTEI (SEQ ID NO: 4)

donde X es cualquier secuencia de aminoácidos.

15 Ligador B identificado al detectar la colección B (intercalación beta con bucles inferiores AB, CD, EF expuestos a solventes y terminal C).

VSDVPRDLEVVAATZZSLLISWDAPAVTVRYRITYGZZZZZZVQEFTVPGSKST
ATZZZZGZDYITITVYAVTGRGDSPASSKPISINYZZZZ (SEQ ID NO: 5)

donde Z es cualquier secuencia de aminoácidos.

20 Ligador C identificado al combinar las secuencias obtenidas al detectar la colección A (intercalación beta con bucles superiores BC, DE y FG expuestos a solventes) y B (intercalación beta con bucles superiores BC, DE y FG expuestos a solventes). La fusión de las dos secuencias en una molécula lleva al Ligador biespecífico C.

VSDVPRDLEVVAATZZSLLISWXXXXXXXXRYRITYGZZZZZZVQEFTVPXXX
TATZZZZGZDYITITVYAVTXXXXXXXXXXXPISINYZZZZ (SEQ ID NO: 6)

donde X y Z son cualesquier secuencias de aminoácidos.

25 El ADN que corresponde a la secuencia de aminoácidos combinada del Ligador C luego se sintetiza, y optimiza para la expresión en E. coli en Geneart AG, Alemania. La clonación en E. coli y purificación posterior sigue los protocolos estándar como se indica en el capítulo 4 (Métodos de fabricación).

Alternativamente, una molécula de unión con base en Fn3 bifuncional se puede generar al ligar dos o más moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas.

Ejemplo 4

30 Generación de moléculas de unión con base en fibronectina mono-específicas que utilizan los bucles inferiores para unir un objetivo

Los detalles experimentales descritos en el Ejemplo 2 se repiten para generar moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas que utilizan los bucles inferiores de la fibronectina para unirse al extensor de semivida, HSA. Se utiliza una colección separada para generar moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas que utilizan los bucles inferiores para unirse a lizozima.

35 (a) Aislamiento del grupo enriquecido a partir de levadura

Se determinan secuencias de poblaciones seleccionadas después de diversas rondas de selección. El ADN del plásmido se extrae de 1 mL de cultivo saturado de cada población de levadura seleccionada utilizando un equipo Zymoprep (Zymo Research, Orange, CA), y 2 µL del plásmido se transforma en la mejor E. coli electro-competente (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las minipreparaciones de plásmido se preparan y se secuencian para 96 colonias.

5 (b) Sub-clonación en E. coli

Los genes que codifican los grupos de fibronectina enriquecidos se clonan en el vector pNAT40 mostrado en la Figura 6 y las construcciones transformadas en cepa de Acella E. coli electro-competente (Gaithersburg, MD). Se seleccionan un número de clones y se secuencian. Las secuencias de aminoácidos de clones seleccionados de ligadores con base en Fn3 potenciales para HSA se muestran en la Figura 7, junto con una secuencia de unión consenso (SEQ ID NO: 42). La Figura 8 muestra las secuencias de aminoácidos de los clones seleccionados de ligadores con base en Fn3 potenciales para la lisozima.

Se seleccionan y utilizan clones individuales a partir de la colección de HSA para inocular 1 ml de medio OvernightExpress (Novagen, Gibbstown, NJ) que contiene 100 µg/ml de kanamicina en una placa de 96 pozos de profundidad utilizando un selector de colonia (Genetix Clonepix2, Boston, MA) y se cultivan durante la noche a 37° C con agitación vigorosa. Al día siguiente se recogen los sedimentos celulares mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 min y se descarta el sobrenadante. Las placas de pozos profundos se congelan dos veces durante 30 min a -80° C y se descongelan a temperatura ambiente. Posteriormente, se agrega 250 µl de regulador de lisis que contiene TBS con 0.2 mg/ml de lisozima y EDTA 1 mM y las placas se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora seguido de la adición de 250 µl de TBS que contiene 0.1 mg/ml de ADNasa, MgCl₂ 10 mM e incubación durante 20 1 hora a temperatura ambiente.

La suspensión de células lisadas se transfiere a HTS Multiscreen de 96 pozos (Millipore, Billerica, MA) y el sobrenadante se depura por centrifugación. El sobrenadante depurado que contiene los ligadores con base en Fn3 potenciales para HSA se utiliza posteriormente para el ensayo ELISA como se describe adelante en el Ejemplo 5.

Ejemplo 5

25 Caracterización de unión de moléculas de unión con base en fibronectina mono-específicas

Este ejemplo ilustra, por primera vez, que se pueden generar moléculas de unión con base en Fn3 al modificar por lo menos uno de los bucles inferiores de Fn3 (por ejemplo, bucles AB, CD y/o EF), para producir con éxito de moléculas con base en Fn3 que se unan a un objetivo utilizando los bucles inferiores. En este Ejemplo, se examinan los ligadores con base en Fn3 potenciales para HSA.

30 Para evaluar las características de unión, se utilizan ensayos ELISA. Cada pozo de una placa de ELISA pretratada (Nunc Maxisorb) se recubre con 100 µl de 1.0 de µg/mL de HSA en PBS cubierto con película de plástico y se incuban a 4° C durante la noche. Al día siguiente, la solución de revestimiento se elimina y las placas se lavan dos veces con PBS. Los pozos se bloquean mediante al agregar 200 µL 25 mg/ml de caseína/PBS por pozo y se incuban durante 1 hora a 37° C, en un recipiente sellado húmedo. Después de eliminar la solución de bloqueo y lavar dos veces con 50 µl de PBS se agrega el lisado de E. coli preparado anteriormente que expresa ligadores mono-específicos potenciales y se incuba con agitación durante 1 hora. Posteriormente las placas se lavan 5 veces con regulador de PBS/Tween 20 (0.05%) seguido por la adición de preparación del anticuerpo anti His-tag conjugado HRP (Abcam, Cambridge, MA) diluida en 0.25% de caseína/PBS, 50 µL por pozo. Después de incubación durante 1 hora, la solución de anticuerpo His-tag se elimina y las placas se lava 5 veces con PBS/Tween 20 (0.05 %). Por último, el ELISA se desarrolla al agregar la solución de sustrato (solución de sustrato de micropozos SureBlue TMB, KPL) 50 µL por pozo. Se seleccionan clones positivos y, posteriormente, se detecta expresión para identificar candidatos para producción a escala.

La Figura 9 muestra ejemplos no limitantes, representativos de un análisis de ELISA específico a albúmina de suero humana de proteína de fibronectina etiquetada His a partir de clones seleccionados. Los lisados crudos de dominios FN10 de fibronectina solubles se agregan a los pozos de una placa ELISA, que se recubren con el antígeno de HSA y, adicionalmente se bloquean con PBS +1% de caseína. La detección de ligadores con base en Fn3 para HSA se realiza utilizando un anticuerpo anti-His conjugado HRP monoclonal. El ELISA se desarrolla mediante un sustrato TMB como se describió anteriormente. Los valores de OD (eje Y) se miden a 450 nm mediante un lector de ELISA. Cada barra representa un extracto de clon individual. Los datos muestran un número de clones que son ligadores con base en Fn3 positivos para HSA que visualiza la unión que es aproximadamente 3 veces mayor que el antecedente. Los resultados demuestran, por primera vez, que se pueden utilizar los bucles inferiores de la molécula de fibronectina para unirse a un objetivo, tal como HSA.

Para purificar los ligadores con base en Fn3 mono-específicos expresados a HSA, el lisado depurado se transfiere a un bloque de 96 pozos bien profundo y se agrega 20 µL de una suspensión al 50% (v/v) de perlas MagneHis

cargadas con Ni²⁺ (Promega). La purificación automatizada se realiza con un Robot KingFisher (Thermo Scientific). Después de una incubación de 30 minutos, las perlas se lavan dos veces con 1 ml de regulador de lavado/pozo (fosfato 50 mM, NaCl 1 M, imidazol 20 mM, pH 7.6). Finalmente se eluye la proteína de fibronectina unida con 200 µl de PBS + imidazol 300 mM a pH 7.6. Se analizan las alícuotas de extracto crudo y electroforesis en gel SDS (datos no mostrados).

5 Para demostrar adicionalmente que los ligadores con base en Fn3 secundarios inferiores para HSA se pueden expresar con éxito, se lleva a cabo un experimento de expresión total a pequeña escala en E. coli. Se analizan las muestras de la expresión total de 24 construcciones en un Novex Bis Tris 4-2% de gel NuPAGE, 26 pozos (Invitrogen). El carril 1 contiene el marcador de tamaño SeeBlue plus2 (Invitrogen). Los resultados muestran la expresión exitosa de moléculas de fibronectina con bucles inferiores modificados en E.coli. Una banda de proteína a aproximadamente 16 kDa (que corresponde a fibronectina Fn10 (~ 11-12 kDa) más His-tag de terminal N, S-tag y sitio de división de preescisión) aparece en la mayoría de los clones seleccionados, como se muestra en la Figura 10. Estos resultados demuestran adicionalmente que la molécula de unión con base en Fn3 mono-específica se puede expresar con éxito en E. coli y retener la actividad de unión.

15 Para mostrar que las proteínas expresadas se pueden purificar sin efecto adverso en la estructura de la proteína (por ejemplo, degradación), se purifican las muestras como se describió anteriormente y se analizan en un Novex Bis Tris 4-12% de gel NuPAGE, 26 pozos (Invitrogen). El carril 1 contiene el marcador de tamaño Mark 12 (Invitrogen). La banda de 16 kDa aparece claramente en la mayoría de los clones, como se muestra en la Figura 10. El análisis de espectrometría de masas confirma la presencia de fibronectina en el peso molecular correcto que se purifica, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Análisis de Espectrometría de Masas de Moléculas de unión de fibronectina con base en Fn3

Número de Clon	Peso Molecular
Clon 1	16076
Clon 2	16265
Clon 3	12112
Clon 4	ND
Clon 5	16395
Clon 6	ND
Clon 7	16274
Clon 8	16321
Clon 9	ND
Clon 10	ND
Clon 11	ND
Clon 12	16274
Clon 13	16394

(continuación)

Número de Clon	Peso Molecular
Clon 14	ND
Clon 15	ND
Clon 16	ND
Clon 17	ND
Clon 18	16482
Clon 19	16275
Clon 20	16380
Clon 21	16274
Clon 22	18319
Clon 23	ND
Clon 24	ND
ND= no determinado	

5 Colectivamente, los resultados mostrados para el primer momento en que se pueden generar las moléculas de unión con base en Fn3 en las que por lo menos se modifica uno de los bucles inferiores de tal manera que se une a un objetivo. A la fecha, normalmente se han analizado los bucles superiores para unión a objetivos, principalmente debido al mejor alineamiento de los bucles superiores con las secuencias de anticuerpos comparadas con los bucles inferiores. Los resultados presentados aquí demuestran que se pueden modificar los bucles inferiores sin afectar de forma adversa la estabilidad de la molécula. Así, se puede generar una colección de moléculas de unión con base en Fn3 en la que por lo menos se modifica uno de los bucles inferiores de tal manera que se une a un objetivo. Con la colección HSA, los bucles inferiores se mantienen a la misma longitud como el Fn3 tipo natural y modificado. Con la colección de lizozima, los bucles inferiores varían en longitud en comparación con el Fn3 tipo natural sin efectos adversos sobre la estructura de la proteína. Adicionalmente, estas moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas con los bucles inferiores modificados, mantienen estabilidad conformacional y se pueden expresar y purificar mientras que retienen la capacidad de unión. Así, se pueden utilizar los métodos de la invención para generar una colección de moléculas de unión con base en Fn3 que tienen por lo menos un bucle inferior modificado así como también moléculas de unión con base en Fn3 que utilizan la cara inferior para unir un objetivo.

Ejemplo 6

Generación y caracterización de moléculas de unión con base en fibronectina multiespecíficas

20 Este ejemplo demuestra la producción y caracterización de una molécula de unión con base en Fn3 multiespecífica, en la que dos moléculas de unión con base en Fn3 mono-específicas separadas se ligan en una forma similar a perla, utilizando una secuencia ligadora para generar una molécula multiespecífica, por ejemplo, biespecífica. La molécula biespecífica se diseña como sigue. La secuencia de unión a VEGFR2 mostrada adelante (SEQ ID NO: 117) se fusiona al ligador HSA de lado inferior identificado, identificado en la Figura 7 y se muestra adelante (SEQ ID No: 8), utilizando una secuencia ligadora GS corta GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 118), para generar una molécula de unión con base en Fn3 multiespecífica con la SEQ ID NO: 119, mostrada adelante. Las construcciones se sintetizan por ADN 2.0 y sub-clonan en el vector de expresión pJExpress 401. La clonación, purificación y ELISA siguen los protocolos estándar como se describió anteriormente.

Secuencia de lado superior VEGFR

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRHPHPTRYRITYGETGGNSPVQEF
 TVPLQPPLATISGLKPGVDYTITVYAVTKERNGRELFTPISINYRT (SEQ ID NO:
 117)

Secuencia de lado inferior 8 de la Figura 7

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGRRTDAKSTRKE
 FTVPGSKSTATIGELKRGRDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRPEK (SEQ ID
 NO: 8)

5 VEGFR2-Secuencia inferior 8 de la Figura fusionada con ligador GS (clon 87)

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRHPHPTRYRITYGETGGNSPVQEF
 TVPLQPPLATISGLKPGVDYTITVYAVTKERNGRELFTPISINYRTGGGGSGGGGS
 VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGRRTDAKSTRKEFTVPGSK
 STATIGELKRGRDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRPEKENLYFQGHHHHHH
 (SEQ ID NO: 119)

Los estudios de unión ELISA de la molécula multiespecífica se muestran en la Figura 13 y se discuten con más detalle en el Ejemplo 7.

10 Para demostrar que la molécula de unión con base en Fn3 multiespecífica se puede purificar a partir de una
 expresión a gran escala de la molécula, se utiliza el procedimiento descrito por Gräslund, et al., (Gräslund et al.
 Nature Methods (2008) 5, 135 -146). Se utilizan cultivos iniciadores de 10 ml (~ 1/100 del volumen de cultivo final)
 para inocular Medio Mínimo que contiene 25 ug/ml de kanamicina y se incuban durante la noche a 37° C a 175 rpm.
 A la mañana siguiente, se utilizan 10 ml del cultivo iniciador para inocular en 1 litro de medios OvernightExpress con
 100 ug/ml de kanamicina en un matraz de agitación Fernbach de 2.8 L. Las células se incuban a 37° C a 175 rpm
 15 hasta que se alcanza una densidad óptica a 600 nm (DO600) de 1-1.5. Luego se reduce la temperatura del cultivo a
 18° C para cambiar sobre la expresión y los cultivos mantenidos durante la noche a 18° C durante expresión
 continuada. Las células se recogen mediante centrifugación a 4500 x g durante 10 min. Las células se pesan, y se
 agrega 1 volumen (v/p) de regulador de lisis (fosfato de sodio 0.1 M, pH 8.0, NaCl 1.0 M, imidazol 20 mM, 10% (v/v)
 de glicerol, TCEP 1 mM, y 20 unidades/ml de Benzonasa). Se agrega 1 mg/ml de lisozima a la suspensión de células
 20 y después de incubación durante 30 min en hielo, la suspensión se somete a sonicación intermitentemente durante
 1-2 minutos. El lisado se diluye con 2-3 volúmenes de regulador de lisis y se agrega 1 ml de resina de Ni-NTA. Se
 realiza la unión al girar lentamente el sobrenadante en un frasco cónico de 250 ml a 4° C durante 1 hora. La resina
 se recolecta en una columna desechable de 20 ml y se lava con regulador de carga (fosfato de sodio 0.05 M, pH 8.0,
 NaCl 0.5 M, imidazol 20 mM, 5 % (v/v) de glicerol, TCEP 0.5 mM) hasta que no haya más proteína eluida (20-30
 25 volúmenes de columna de cada una). La proteína unida se eluye con regulador de elución (fosfato de sodio 0.05 M,
 pH 8.0, NaCl 0.5 M, imidazol 0.3 M, 5% (v/v) de glicerol, TCEP 0.5 mM). Se identifican fracciones pico, se agrupan y
 se cargan en una columna equilibrada MonoS 5/50 GL (GE) con regulador S (Hepes 50 mM, NaCl 50 mM pH 7.6). El
 eluido de Ni-NTA se diluye 10 veces con regulador S y se carga en la columna pre-equilibrada. Después de lavar
 con 10 volúmenes de Regulador S la proteína se eluye con un gradiente lineal de NaCl 50 mM a 1 M en regulador
 30 de S. Las fracciones se analizan mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas.

Figura 12. El panel de la izquierda muestra el SDS-PAGE de las diferentes etapas de purificación del clon 87. Carril
 1, proteína total, carril 2, extracto crudo; carril 3, flujo de Ni- NTA, carril 4, lavado de Ni- NTA; carril 5, Ni- NTA,
 eluido: carril 6, Eluido Mono S. El panel derecho muestra el espectro de masas de la muestra purificada (MW 23404
 D) consistente con la masa esperada de la proteína dividida de metionina de terminal N del clon 87.

35 **Ejemplo 7**

Generación y caracterización de moléculas de unión con base en fibronectina biespecíficas

Este ejemplo demuestra la producción y caracterización de una molécula de unión con base en Fn3 biespecífica en la que una única molécula de fibronectina tiene los bucles superiores y los bucles inferiores modificados de tal manera que la molécula de fibronectina única se puede unir a dos objetivos separados, por ejemplo, VEGFR2 y HSA.

- 5 Una molécula biespecífica se genera al elaborar a mano la secuencia de bucle de HSA de la parte inferior en los ligadores VEGFR2 del lado superior que generan una molécula con funcionalidad biespecífica en la que los bucles superior e inferior de la misma molécula de Fn3 se pueden utilizar para unirse a dos diferentes moléculas objetivo. Para crear la molécula biespecífica, los bucles de ligador de la parte inferior (SEQ ID NO: 8) (mostrados anteriormente) se elaboran a mano en el ligador de VEGFR2 (SEQ ID NO: 117) (mostrado anteriormente) al dividir los bucles inferiores e insertarlos en el ligador VEGFR2, produciendo la molécula VEGFR2 -HAS (SEQ ID NO: 120). Las construcciones se sintetizan mediante ADN2.0 y sub-clonan en el vector de expresión pJExpress 401. La clonación, purificación y ELISA siguen los protocolos estándar como se describió anteriormente.

VEGFR2/lado inferior SEQ ID NO: 8 molécula fusionada (clon 89)

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRHPHPTRYRITYGRDTRDAKSTRKEF
TVPLQPPLATIGELKRGRDYTITVYAVTKERNGRELFTPIISINYRPEKENLYFQGH
HHHHH (SEQ ID NO: 120)

- 15 (a) ELISA para moléculas de unión a fibronectina específicas dobles de los Ejemplos 6 y 7:

La característica de unión de los ligadores multiespecíficos y biespecíficos de los Ejemplos 6 y 7 se evalúan como sigue. La proteína de fusión de VEGFR2 - Fc se inmoviliza sobre una placa ELISA pretratada (NuncMultisorb) y adicionalmente se bloquea con PBS + 1% de caseína. Las alícuotas del lisado depurado de Fn10 tipo natural (carril 1), clon 87 (multiespecífico) (carril 2), clon 89 (biespecífico) (carril 3) y PBS se agrega a los pozos y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Estos se realizan a diferentes concentraciones de 1, 2 y 3. Después de lavar 5 veces con PBS/0.05% de Tween, los pozos se incuban con 1µg/ml de HSA en PBS. La detección se realiza con anticuerpo HSA anti-humano de pollo conjugado HRP (Abcam). El ELISA se desarrolla con un sustrato TMP y valores de DO medidos a 450 nm. Los resultados se muestran en la Figura 13.

25 Se obtienen resultados reproducibles consistentes con moléculas de unión con base en Fn3 multiespecíficas y biespecíficas presentes en el extracto crudo, que muestran que el clon 87 (multiespecífico) y el clon 89 (biespecífico) se unen a HSA y VEGFR2. Estos datos demuestran que se pueden producir moléculas de Fn3 multiespecíficas y biespecíficas en donde las moléculas de unión a fibronectina mono-específicas tienen por lo menos un bucle inferior modificado (AB, DE, FG) que se puede unir a HSA (véase Figura 13).

30 La molécula Fn3 multiespecífica (clon 87) tiene dos moléculas de Fn3 mono-específicas separadas ligadas mediante un ligador GS. Una molécula de Fn3 mono-específica ha modificado los bucles inferiores que unen a HSA, mientras que la otra molécula de Fn3 mono-específica ha modificado los bucles superiores que unen a VEGFR2. La molécula multiespecífica resultante retiene la capacidad de unirse a dos objetivos diferentes utilizando cada una de las moléculas de fibronectina mono-específicas. Estos datos muestran que las moléculas de Fn3 mono-específicas se pueden ligar en una forma similar a perla para crear una molécula de Fn3 multiespecífica; que el ligador no interfiere con la capacidad de unión de cada una de las moléculas de Fn3 monoméricas, y que la molécula d Fn3 multiespecífica es capaz de unirse a dos objetivos diferentes sin ningún problema de impedimento estérico.

40 La molécula de fibronectina biespecífica (clon 89) es una molécula de fibronectina única diseñada de tal manera que los bucles inferiores se unen a HSA y los bucles superiores se unen a VEGFR2. La molécula de fibronectina biespecífica única se une con éxito a HSA y VEGFR2. La Figura 13 muestra que la molécula de fibronectina biespecífica única es capaz de unirse a HSA y VEGFR2 sin ningún problema de impedimento estérico. Estos datos muestran, por primera vez, que se pueden producir moléculas de fibronectina biespecíficas; que se retiene la capacidad de unión de los bucles en cada lado de la molécula de fibronectina biespecífica; que se mantienen la confirmación estructural de la molécula biespecífica con los bucles inferior y superior que se modifican al mismo tiempo; que los bucles superior e inferior funcionan independientemente el uno del otro para unir objetivos separados, y que la molécula de Fn3 biespecífica es capaz de unirse a dos objetivos diferentes sin ningún problema de impedimento estérico.

- (b) Biacore para moléculas de unión a fibronectina específicas dobles de los Ejemplos 6 y 7:

La cinética de unión de proteínas de unión de proteínas andamio con base en fibronectina al objetivo se mide utilizando BIAcore T100 (GE). Se inmovilizan anticuerpos específicos Fc Anti- IgG Hu (GE, grupo de captura de IgG

humano) en un chip de sensor CM5 y proteína de fusión de VEGFR2-huFc soluble capturada en la superficie. El clon 87 de fibronectina soluble (multiespecífico) se inyecta a 100 nM (línea superior) y 200 nM (línea inferior) en regulador 0 (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, 0.005 % de Tween 20, pH 7.4). Se obtienen sensogramas en cada concentración y se determinan las constantes de velocidad k_a (kon) y K_D (koff). Se calcula la constante de afinidad, K_D a partir de la relación de constantes de velocidad k_{off}/k_{on} .

Los resultados para el clon 87 se muestran en las Figuras 14 y 15 para el VEGFR2 de unión al bucle superior y HSA de unión al bucle inferior de unión, respectivamente. Estos datos muestran que la fibronectina multiespecífica que comprende dos moléculas Fn3 mono-específicas separadas ligadas con un ligador GS, se une con éxito a dos moléculas objetivo separadas utilizando los bucles inferior y superior.

El mismo experimento se repite para el clon 89, la molécula de Fn3 biespecífica única y se obtienen resultados similares (datos no mostrados).

Colectivamente, estos resultados muestran por primera vez, que se pueden producir moléculas de fibronectina multiespecíficas y biespecíficas. Estas moléculas se expresan con éxito en *E. coli*, se purifican sin degradación, retienen la capacidad de unión, y son capaces de unirse a dos objetivos separados.

Equivalentes

Aquellos expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar, utilizando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descrita aquí. Dichos equivalentes están destinados a ser abarcados por las siguientes reivindicaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

110> NOVARTIS AG

<120> MOLÉCULAS DE UNIÓN CON BASE EN FIBRONECTINA MEJORADA Y USOS DE LAS MISMAS

<130> 52536-WO-PCT

<150> Documento US 61/050142
<151> 02-05-2008

<160> 123

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 96

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile
 85 90 95

<210> 2
 <211> 96
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60

10 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile
 85 90 95

<210> 3
 <211> 96
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

ES 2 620 285 T3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile
85 90 95

<210> 4
<211> 96
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
10 <221> misc_feature
<222> (23)..(29)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
15 <221> misc_feature
<222> (52)..(55)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
20 <221> misc_feature
<222> (77)..(86)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<400> 4

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

25 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Tyr Tyr

ES 2 620 285 T3

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile
 85 90 95

- 5 <210> 5
- <211> 96
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

- 10 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (38)..(44)
- <223> Glx tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

- 15 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (60)..(64)
- <223> Glx tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

- 20 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (93)..(93)
- <223> Glx tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

- 25 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (95)..(96)
- <223> Glx tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

- 30 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (95)..(96)
- <223> Glx tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

- 35 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (95)..(96)
- <223> Glx tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

- <400> 5

ES 2 620 285 T3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Glx Glx
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glx Glx Glx Glx Glx Glx Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Glx Glx Glx Glx Glx
 50 55 60
 Gly Glx Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Glx Thr Glx Glx
 85 90 95

- 5 <210> 6
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
- 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(16)
 <223> Glx tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural
- 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23) .. (29)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural
- 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (38)..(44)
 <223> Glx tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural
- 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (52)..(55)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural
- 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (60)..(64)
 <223> Glx tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural
- 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (66)..(66)
 <223> Glx tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural
- 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (77)..(86)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural
- 45 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (93)..(93)

<223> Glx tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

5

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (95)..(96)

<223> Glx tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (95)..(96)

<223> Glx tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

15

<400> 6

20

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Glx Glx
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glx Glx Glx Glx Glx Glx Val Gln Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Ala Thr Ile Glx Glx Glx Glx Glx
 50 55 60

Gly Glx Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Glx Thr Glx Glx
 85 90 95

25

<210> 7

<211> 96

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

ES 2 620 285 T3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Lys Thr Glu Gly His Arg His Ser His Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys His
50 55 60

Gly Asp Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Met Glu Lys
85 90 95

<210> 8
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 8

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Thr Asp Ala Lys Ser Thr Arg Lys Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Gly Glu Leu Lys Arg
50 55 60

Gly Arg Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Pro Glu Lys
85 90 95

<210> 9
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 9

ES 2 620 285 T3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Gln Leu Asp Lys Lys His His Asp Ala Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Thr Arg Leu Lys Arg
50 55 60

Gly Arg Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ser Pro Glu Arg
85 90 95

<210> 10
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Lys Thr Gly His Lys Ser Ser Asp His Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Gly Gly Met Lys Gly
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Phe Glu Arg
85 90 95

<210> 11
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

ES 2 620 285 T3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Lys Lys Asp Arg Ala Ser His Leu Lys Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Gly His Ile Lys Gly
50 55 60

Gly Tyr Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ser Gly Glu Pro
85 90 95

<210> 12
<211> 96
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Thr Lys Gly Lys Ser Lys Leu Lys Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Pro Gly Leu Lys Glu
50 55 60

Gly Glu Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Met Phe Glu Arg
85 90 95

<210> 13
15 <211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 13

ES 2 620 285 T3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Thr Ser Val Asp Asp Arg Lys Leu Arg Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Arg Leu Lys Arg
50 55 60

Gly Arg Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Ala Glu Asn
85 90 95

<210> 14
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 14

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Val Leu Ser Ser Thr Lys His Leu Lys Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Leu
50 55 60

Gly Arg Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Met Glu Ser
85 90 95

<210> 15
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

15

<400> 15

ES 2 620 285 T3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Ser Arg Ala Ser His Arg Lys Leu Thr Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Thr
50 55 60

Gly Arg Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu His
85 90 95

<210> 16
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 16

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Ile Thr Gly Lys Glu Lys Ser Phe Val Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Arg Asp Val Lys Lys
50 55 60

Gly Lys Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Ala Glu Thr
85 90 95

<210> 17
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 17

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

ES 2 620 285 T3

Arg Ile Thr Tyr Gly Tyr Gly Ala Ala Asn Arg Arg Ala His Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Arg
 50 55 60

Gly Arg Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg His Glu Leu
 85 90 95

<210> 20
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 20

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Lys Leu Gly Gly Lys Pro Lys Val Arg Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Leu Gly Leu Lys Pro
 50 55 60

Gly Leu Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ile His Glu Gln
 85 90 95

<210> 21
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 21

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Asp Ser Arg His His Pro Arg Ala His Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Thr Gly Cys Lys Arg

ES 2 620 285 T3

50 55 60

Gly His Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Tyr Glu His
85 90 95

<210> 22
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 22

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Lys Ser His Gly His Arg Gln Lys His Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Asp Tyr Arg Gln
50 55 60

Gly Gly Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Lys Gly Glu Leu
85 90 95

10

<210> 23
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 23

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Val Met Gly Asp Thr Lys Lys Val Lys Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Glu Arg Ile Lys Leu
50 55 60

Gly Arg Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

ES 2 620 285 T3

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Lys Glu His
 85 90 95

<210> 24
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 24

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ala Ser Lys Asn His Arg Gln His Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Arg Ile Lys Arg
 50 55 60

Gly Thr Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ser Pro Glu Ser
 85 90 95

<210> 25
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Lys Pro Arg Lys Tyr Arg Ser Ser Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Arg His Ser Lys His
 50 55 60

Gly Lys Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Met Arg Glu Ile
 85 90 95

<210> 26
 <211> 96
 <212> PRT

ES 2 620 285 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15
Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30
Arg Ile Thr Tyr Gly Lys Thr Ala Arg Lys Tyr His Met Gln Glu Phe
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Ile Lys Arg
50 55 60
Gly Thr Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80
Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Asn Ser Glu His
5 85 90 95

<210> 27

<211> 96

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 27

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15
Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30
Arg Ile Thr Tyr Gly Leu Thr Lys Arg Lys Ser Leu Ile Ser Glu Phe
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ile Gly Leu Lys Ala
50 55 60
Gly Lys Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80
Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Lys Thr Glu Asn
15 85 90 95

<210> 28

<211> 96

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

ES 2 620 285 T3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Lys Val Lys Ala Lys Ala Pro Leu Val Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Leu Lys Thr
50 55 60

Gly Lys Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Tyr Glu Gly
85 90 95

<210> 29
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 29

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Asp Arg Ala Lys Asn Thr Arg Ile Lys Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Arg
50 55 60

Gly Arg Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Leu Glu Gly
85 90 95

<210> 30
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 30

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

ES 2 620 285 T3

Arg Ile Thr Tyr Gly Ile Pro Ala Lys Lys His His Thr His Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Thr Gly Leu Lys Ser
 50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Thr
 85 90 95

<210> 31
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 31

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Val His Gly His His Thr Ala His Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Val Arg Leu Lys Arg
 50 55 60

Gly Lys Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Cys Pro Glu Arg
 85 90 95

<210> 32
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 32

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Met Ile Ser Gly Asp Lys Arg Arg Arg Glu Phe
 35 40 45

15

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Asp Arg Leu Lys Leu
 50 55 60

Gly Arg Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Leu Glu Ser
 85 90 95

<210> 33
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 33

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Val Met His Asp Lys His Pro Lys Lys Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Arg
 50 55 60

Gly Arg Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Lys Ser Glu Ala
 85 90 95

10

<210> 34
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 34

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Thr Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Val Ala Gly Lys Thr Lys Pro Arg Ser Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Pro His Leu Lys Leu
 50 55 60

Gly His Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80

ES 2 620 285 T3

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Ala Glu His
 85 90 95

<210> 35
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 35

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Lys Asn Gly Arg His Asn Leu Asp His Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Arg
 50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr His Asn Glu Asn
 85 90 95

10

<210> 36
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 36

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Asn Ile Val Ala Ala Asn Ala Leu Pro Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Thr Gly Leu Met Ser
 50 55 60

Gly Ile Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ser Thr Glu Tyr
 85 90 95

20

<210> 37
 <211> 96
 <212> PRT

ES 2 620 285 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Lys Leu Ser Gln Pro Thr Lys Arg Arg Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Arg Leu Lys Pro
 50 55 60

Gly Leu Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr His Tyr Glu Leu
 85 90 95

5

<210> 38

<211> 96

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 38

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Lys Ser Ser His Asn Ser Ala Ala Lys Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Thr Arg Leu Lys Ser
 50 55 60

Gly Thr Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Lys Pro Glu Tyr
 85 90 95

15

<210> 39

<211> 96

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 39

ES 2 620 285 T3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Lys Lys His Lys His Thr Thr Val Arg Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ala Gly Lys Ser Leu
50 55 60

Gly Gly Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Thr Ser Glu Thr
85 90 95

<210> 40
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 40

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Pro Gly His Asn Ser Lys Val His Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Asp Gly Ala Lys Lys
50 55 60

Gly His Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ile Met Glu His
85 90 95

<210> 41
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 41

Val Ser Asn Ile Pro Lys Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr

ES 2 620 285 T3

20 ----- 25 ----- 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Gln Thr Met Asn Gly Gln Ser Asn Val Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Pro Ser Lys Leu
 50 55 60

Gly Leu Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Leu Ser Glu Thr
 85 90 95

<210> 42
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 42

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Lys Thr Gly Gly Lys Ser Lys Val His Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Arg
 50 55 60

Gly Arg Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Pro Glu His
 85 90 95

10

<210> 43
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 43

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Glu Ala Tyr Arg Ser Glu Gly Gln Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Tyr Gly Gln
 50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Glu Gly Ser Glu
 85 90 95

<210> 44
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 44

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser Ser Leu Gly Ser Glu Gln Glu Phe Thr
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Ala Pro Tyr
 50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
 65 70 75 80

Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Tyr Gly Pro Gly
 85 90 95

10

<210> 45
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 45

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Gln Ala Gln Glu Glu Gly Gln Glu Phe Thr
 35 40 45

Val Pro Asp Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ala His Arg Ser Tyr
 50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser

Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Pro His Ser
 85 90 95

Tyr

<210> 48
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 48

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Gln Ser Gly Leu Ser Glu His Gln Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Leu Arg Tyr
 50 55 60

Tyr Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ala Tyr Glu Tyr
 85 90 95

<210> 49
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 49

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Arg Gly Ser Glu Ala Glu Arg Gln Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gln Ala Tyr Tyr
 50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ser Tyr Ala Ser
 85 90 95

ES 2 620 285 T3

<210> 50
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 50

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser Leu Tyr Tyr His Gln Glu Phe Thr Val
 35 40 45
 Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ala Ser Tyr Tyr Ala Val
 50 55 60
 Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro
 65 70 75 80
 Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ser Tyr His Leu
 85 90

10 <210> 51
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 51

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser Tyr Arg Arg Gly Gln Ser Gly Gln Glu
 35 40 45
 Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Pro Ser Gln
 50 55 60
 Ser Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
 65 70 75 80
 Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ser Tyr Ala
 85 90 95

Ser

20 <210> 52
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 620 285 T3

<400> 52

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser Ser Arg Ser Pro Arg Gly Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Arg Ala Glu Tyr
 50 55 60
 Arg Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
 65 70 75 80
 Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Tyr Leu Arg Gln
 85 90 95

5

<210> 53
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 53

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser Ser Pro Glu Tyr Arg Gly Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Leu Glu Glu Tyr
 50 55 60
 Glu Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
 65 70 75 80
 Ser Pro Thr Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Gln Tyr Arg Tyr
 85 90 95

15

<210> 54
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 54

ES 2 620 285 T3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser Leu Arg Ser Arg Glu Gly Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Arg Gln Glu
50 55 60

Ser Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Gly Gln Arg Tyr
85 90 95

<210> 55
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 55

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ser Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Ala Glu Pro
50 55 60

Ala Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Gly Pro Arg Tyr
85 90 95

<210> 56
<211> 95
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 56

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Tyr Leu Tyr His His Gly Gln Glu Phe Thr
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ser Ala Pro
 50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
 65 70 75 80

Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg His Glu Arg
 85 90 95

<210> 57
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 57

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Gly Ser Leu Leu Tyr His Ser Gln Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Tyr Gly Pro Ala
 50 55 60

Ser Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Arg Arg Tyr
 85 90 95

10

<210> 58
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 58

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser Ser His Gly Arg Ser Gln Glu Phe Thr
 35 40 45

ES 2 620 285 T3

Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Ser Ser Arg
50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
65 70 75 80

Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Gly Tyr Arg Gly
85 90 95

<210> 59

<211> 95

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 59

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Tyr Gly Tyr Ser Arg Ser Gln Glu Phe Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Tyr Ser Ser Pro Arg
50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
65 70 75 80

Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Gly Ser Arg Tyr
85 90 95

10

<210> 60

<211> 97

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 60

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Tyr Arg Tyr Ala Tyr Ala Tyr Gly Gln Glu
35 40 45

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Arg Ser Ser
50 55 60

ES 2 620 285 T3

Pro Arg Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
65 70 75 80

Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Pro Arg Arg
85 90 95

Tyr

<210> 61
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 61

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Pro Arg Ser Glu Glu Gly Glu Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Arg Arg Tyr Ser
50 55 60

Leu Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Tyr Ser Ser Arg
85 90 95

10

<210> 62
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 62

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ala Ala Ser Ser Arg Leu Arg Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly
50 55 60

Leu Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
65 70 75 80

ES 2 620 285 T3

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Tyr Ser Ser Tyr
 85 90 95

<210> 63
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 63

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Arg Glu Arg Gln His Gly Tyr Gln Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Arg Tyr Arg Arg
 50 55 60

Arg Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Glu Pro Gly Tyr
 85 90 95

<210> 64
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 64

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Arg Arg Ser His Arg Glu Arg Gln Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Arg Arg Arg Arg
 50 55 60

Arg Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ser Arg Arg Arg
 85 90 95

<210> 65
 <211> 96
 <212> PRT

ES 2 620 285 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 65

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15
Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Arg Leu Arg Glu Gly Gly Ser Gln Glu Phe
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Arg Ala Gly Glu
50 55 60
Arg Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
65 70 75 80
Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ala Gln Tyr Pro
85 90 95

5

<210> 66

<211> 95

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 66

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15
Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Tyr Tyr Arg Ser Tyr Tyr Gln Glu Phe Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Tyr Glu Pro Pro
50 55 60
Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
65 70 75 80
Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Arg Tyr Leu
85 90 95

15

<210> 67

<211> 96

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 67

ES 2 620 285 T3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Tyr Tyr Ala Arg Pro Glu Tyr Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Tyr Tyr Glu Pro
50 55 60

Glu Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Ser Tyr Pro
85 90 95

<210> 68
<211> 96
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 68

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Tyr Tyr Arg Ser Ser Leu Pro Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Tyr Tyr Tyr Pro
50 55 60

Ser Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ser Arg Tyr Tyr
85 90 95

10 <210> 69
<211> 96
<212> PRT
15 <213> *Homo sapiens*

<400> 69

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr

ES 2 620 285 T3

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Tyr Arg Ser Ser Ser Tyr Tyr Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Tyr Pro Ser Glu
50 55 60

Arg Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Gln Ser Ser Ala
85 90 95

<210> 70
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 70

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser His Gln Gly Leu Ser Tyr Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Ser Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Tyr Tyr Arg
85 90 95

10

<210> 71
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 71

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Arg Gly Ser Gly Leu Gly Tyr Gln Glu Phe
35 40 45

ES 2 620 285 T3

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Arg Ala Tyr
 50 55 60

Arg Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ala Leu Tyr Glu
 85 90 95

<210> 72
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 72

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Arg Gly Gly Tyr Ser Ser Gln Glu Phe Thr
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Arg Tyr Arg Gln
 50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
 65 70 75 80

Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Gln Ser Tyr Ser
 85 90 95

10

<210> 73
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 73

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Arg Gly Tyr Pro Gly Gln Glu Phe Thr Val
 35 40 45

Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Ser His Ser Val
 50 55 60

Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro

ES 2 620 285 T3

<210> 76
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 76

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser Ser Gly Arg Tyr Arg Gln Glu Phe Thr
 35 40 45
 Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Arg Tyr Pro His Gly
 50 55 60
 Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
 65 70 75 80
 Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ala Lys Asn Val
 85 90 95

10

<210> 77
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 77

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Tyr Arg Arg Arg Ala Arg Gln Glu Phe Thr
 35 40 45
 Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Glu His Glu Pro Leu
 50 55 60
 Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
 65 70 75 80
 Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Tyr Ser Tyr Tyr
 85 90 95

20

<210> 78
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 78

ES 2 620 285 T3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Gln Arg Ala Arg Ser Arg Gln Glu Phe Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Glu Gln Arg Arg Arg
50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
65 70 75 80

Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Ala Leu Leu
85 90 95

<210> 79
<211> 95
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 79

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Arg Arg Arg Arg Tyr Gly Gln Glu Phe Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Gly
50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
65 70 75 80

Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Leu Tyr Pro Tyr
85 90 95

<210> 80
<211> 95
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 80

15

ES 2 620 285 T3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser Arg Arg Ser Tyr Pro Gln Glu Phe Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Ser His Arg Ser
50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
65 70 75 80

Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Ser Tyr Leu
85 90 95

<210> 81
<211> 95
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 81

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser His His Tyr Gly Pro Gln Glu Phe Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Gly Ala His
50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
65 70 75 80

Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr His Gly Leu Tyr
85 90 95

<210> 82
<211> 95
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 82

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

15

ES 2 620 285 T3

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser His His Tyr Gly Pro Gln Glu Phe Thr
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Gly Ala His
 50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
 65 70 75 80

Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr His Gly Leu Tyr
 85 90 95

<210> 83

<211> 95

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 83

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ala His Glu Tyr Tyr Tyr Gln Glu Phe Thr
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Arg Ser Ser Ser Ser
 50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
 65 70 75 80

Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Tyr Gly Arg Tyr
 85 90 95

10

<210> 84

<211> 95

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 84

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ala Gly Tyr Ser Gly Gly Gln Glu Phe Thr
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Glu Arg Ala Glu Tyr
 50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
 65 70 75 80

Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Glu Arg Arg Tyr
 85 90 95

<210> 85
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 85

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Leu Ser Arg Ser Gly Ser Gln Glu Phe Thr
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Ser Tyr Gly Tyr
 50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
 65 70 75 80

Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Glu Gln Ser Tyr
 85 90 95

<210> 86
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 86

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Leu Pro Ser Gln Gly Arg Gln Glu Phe Thr
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Arg Glu Leu
 50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
 65 70 75 80

Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Gly Ser Ser Tyr
 85 90 95

<210> 87
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 87

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ala Tyr Gly Glu Ser Tyr Gln Glu Phe Thr
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gln Ser Pro Glu Tyr
 50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
 65 70 75 80

Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ala Ser Glu Tyr
 85 90 95

<210> 88
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 88

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser Ser Ser Ser Arg Arg Gln Glu Phe Thr
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Glu Glu Ser Tyr
 50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
 65 70 75 80

Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ala Glu Glu Arg
 85 90 95

<210> 89
 <211> 95
 <212> PRT

ES 2 620 285 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 89

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15
Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Gly Arg His Pro Ser Tyr Gln Glu Phe Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Ser Arg
50 55 60
Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser
65 70 75 80
Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ser Arg Glu Arg
5 85 90 95

<210> 90

<211> 94

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 90

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15
Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Gly Glu Arg Pro Tyr Gln Glu Phe Thr Val
35 40 45
Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Tyr Ala His Tyr Ser Val
50 55 60
Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro
65 70 75 80
Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Glu Arg Arg Ser
15 85 90

<210> 91

<211> 94

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 91

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Tyr Gln Arg Ser Arg Gln Glu Phe Thr Val
35 40 45

Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Tyr Gly Gly Tyr Val
50 55 60

Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro
65 70 75 80

Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Ser Leu Arg
85 90

<210> 92
<211> 94
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 92

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Tyr Glu Arg Tyr Arg Gln Glu Phe Thr Val
35 40 45

Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Gln Ser Arg Tyr Val
50 55 60

Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro
65 70 75 80

Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Gly Arg Pro Ala
85 90

<210> 93
<211> 94
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 93

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr

Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Arg Leu Tyr Arg Arg Val
 50 55 60

Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro
 65 70 75 80

Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Tyr Arg Ser Ala
 85 90

<210> 96

<211> 94

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 96

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Tyr His Tyr Ser Glu Gln Glu Phe Thr Val
 35 40 45

Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Tyr Tyr Glu Pro Arg Val
 50 55 60

Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro
 65 70 75 80

Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr His Ser Ser Arg
 85 90

10

<210> 97

<211> 94

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 97

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Gln Arg Tyr Leu Arg Gln Glu Phe Thr Val
 35 40 45

Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Arg Ser Ala Arg Val
 50 55 60

Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro

ES 2 620 285 T3

<210> 100
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 100

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Glu Glu Glu His Pro Gln Glu Phe Thr Val
 35 40 45
 Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Pro Gln Arg Gly Val
 50 55 60
 Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro
 65 70 75 80
 Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Tyr Ser Tyr Tyr
 85 90

10 <210> 101
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 101

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Glu Ser Ser Arg Pro Gln Glu Phe Thr Val
 35 40 45
 Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gln Ala Arg Ala Arg Val
 50 55 60
 Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro
 65 70 75 80
 Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Arg Tyr Arg
 85 90

20 <210> 102
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 102

ES 2 620 285 T3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Tyr Gly Ala Leu Glu Gln Glu Phe Thr Val
35 40 45

Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Arg Ser Gln Ala Glu Val
50 55 60

Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro
65 70 75 80

Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ala Ser Tyr Tyr
85 90

<210> 103
<211> 94
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 103

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser Arg Glu Gly Gly Gln Glu Phe Thr Val
35 40 45

Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Tyr Gln Ser Glu Val
50 55 60

Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro
65 70 75 80

Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ala Arg Ser Arg
85 90

<210> 104
<211> 94
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 104

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Gly Gln Gln Gly Gly Gln Glu Phe Thr Val
 35 40 45

Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ala Tyr Arg Gly Pro Val
 50 55 60

Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro
 65 70 75 80

Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Tyr Gly Ser Tyr
 85 90

<210> 105
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 105

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Gly Arg Arg Tyr Gly Gln Glu Phe Thr Val
 35 40 45

Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Glu Leu Leu Ser Glu Val
 50 55 60

Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro
 65 70 75 80

Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ser Leu Arg Tyr
 85 90

10

<210> 106
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 106

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser Gly Tyr Arg Tyr Gln Glu Phe Thr Val
 35 40 45

ES 2 620 285 T3

Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Tyr Arg Glu His Val
50 55 60

Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro
65 70 75 80

Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Gln Glu Ser Tyr
85 90

<210> 107

<211> 94

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 107

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser Gly Arg Arg Gly Gln Glu Phe Thr Val
35 40 45

Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Pro Ser Leu Glu Val
50 55 60

Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro
65 70 75 80

Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Ser Gly Tyr
85 90

10

<210> 108

<211> 94

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 108

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Pro Arg Arg Arg Tyr Gln Glu Phe Thr Val
35 40 45

Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Pro Gly Gly Gln Ser Val
50 55 60

Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro
65 70 75 80

Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Gly Arg Gly Tyr
85 90

<210> 109
<211> 94
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 109

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Thr Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser Gly Arg Gly Ala Gln Glu Phe Thr Val
35 40 45

Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Gly Pro Pro Val
50 55 60

Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Glu Ser Pro
65 70 75 80

Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Ser Gln His
85 90

10

<210> 110
<211> 97
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 110

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser Ser Gly Tyr Ala Glu Arg Gly Gln Glu
35 40 45

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Pro Gly
50 55 60

Ala Arg Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
65 70 75 80

Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ser Ser Leu
85 90 95

Gly

5 <210> 111
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 111

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Ser Glu Gly Gly Ser Ser Arg Ser Gln Glu
 35 40 45
 Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Arg Ser Tyr
 50 55 60
 Gln Pro Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
 65 70 75 80
 Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Gly Ser Tyr
 85 90 95

10 Pro
 <210> 112
 <211> 97
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 112

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Gln Tyr Tyr His Gln Gly Arg Arg Gln Glu
 35 40 45
 Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Arg Tyr Gly
 50 55 60
 Gly Ser Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
 65 70 75 80

Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Tyr Ala Tyr
 85 90 95

Gly

<210> 113
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 113

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Arg Arg Gly Gln Tyr Gly Ser Ser Gln Glu
 35 40 45

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Pro Glu
 50 55 60

Gly Ser Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
 65 70 75 80

Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ser Arg Ser
 85 90 95

10 **Glu**

<210> 114
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 114

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Gln Arg Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gln Gln Glu
 35 40 45

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Gly Arg
 50 55 60

Ser Ser Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
 65 70 75 80

Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Arg Ser
 85 90 95

Tyr

<210> 115
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 115

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Arg Pro Ala Ser Tyr Arg Ala Ala Gln Glu
 35 40 45

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Tyr Ser
 50 55 60

Tyr Ser Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
 65 70 75 80

Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Arg Ser
 85 90 95

10 **Gly**

<210> 116
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 116

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Thr Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Pro Gln Ala Ser His Arg Pro Tyr Gln Glu
 35 40 45

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Ser Arg Ser
 50 55 60

ES 2 620 285 T3

Gln Ser Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
65 70 75 80

Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Leu Arg Glu
85 90 95

Leu

<210> 117
<211> 96
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 117

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15

Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg
20 25 30

Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45

Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Leu Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60

Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu
65 70 75 80

Arg Asn Gly Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95

<210> 118
<211> 10
15 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 118

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 119
<211> 215
25 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 119

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15

Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg
20 25 30

Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
 35 40 45
 Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Leu Ala Thr Ile Ser Gly Leu
 50 55 60
 Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu
 65 70 75 80
 Arg Asn Gly Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90 95
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Ser Asp Val Pro Arg
 100 105 110
 Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp
 115 120 125
 Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg
 130 135 140
 Thr Asp Ala Lys Ser Thr Arg Lys Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys
 145 150 155 160
 Ser Thr Ala Thr Ile Gly Glu Leu Lys Arg Gly Arg Asp Tyr Thr Ile
 165 170 175
 Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys
 180 185 190
 Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Pro Glu Lys Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
 195 200 205
 Gly His His His His His His
 210 215

<210> 120
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 120

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
 1 5 10 15
 Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg
 20 25 30
 Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Thr Asp Ala Lys Ser Thr Arg Lys
 35 40 45

5

10

ES 2 620 285 T3

Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Leu Ala Thr Ile Gly Glu Leu
50 55 60

Lys Arg Gly Arg Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu
65 70 75 80

Arg Asn Gly Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Pro
85 90 95

Glu Lys Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly His His His His His His
100 105 110

5 <210> 121
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 121

10 Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10

15 <210> 122
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 122

20 Pro Ser Thr Ser Thr Ser Thr
1 5

<210> 123
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 123

Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión con base en fibronectina de tipo III (Fn3) que comprende un dominio de Fn3, en donde por lo menos un aminoácido en el bucle de EF del dominio de Fn3 se altera en comparación con el dominio de Fn3 tipo natural que comprende la SEQ ID NO:1 para crear una secuencia de unión sin Fn3 que se une a un objetivo específico, en donde dicha molécula de unión se obtiene mediante un procedimiento de detección de una colección de ácidos nucleicos que codifica moléculas de unión con base en Fn3, cada una de las cuales contiene al menos una alteración de aminoácido en la región de bucle de EF en comparación con el ¹⁰Fn3 humano tipo natural (SEQ ID NO:1) usando dicho objetivo específico para identificar y seleccionar moléculas de unión con base en Fn3 que se unen a dicho objetivo específico, en donde dicha colección se ha producido aleatorizando sólo el dominio AB, CD, EF y C-terminal del dominio Fn3.
2. Una molécula de unión con base en fibronectina de tipo III (Fn3) de la reivindicación 1, en donde el procedimiento comprende además la etapa de preparar una colección de ácidos nucleicos que codifica moléculas de unión con base en Fn3, cada una de las cuales contiene al menos una alteración de aminoácido en la región de bucle de EF en comparación con el ¹⁰Fn3 humano tipo natural (SEQ ID NO:1).
3. La molécula de unión con base en Fn3 de la reivindicación 1, en donde dicho al menos un aminoácido se selecciona del grupo que consiste en los aminoácidos en la posición 60, 61, 62, 63 y 64 de la SEQ ID NO:1.
4. La molécula de unión con base en Fn3 de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la secuencia de unión sin Fn3 comprende todo o una porción de una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo o un receptor de célula T.
5. La molécula de unión con base en Fn3 de la reivindicación 1, en donde el objetivo específico es un extensor de semivida.
6. La molécula de unión con base en Fn3 de la reivindicación 5, en donde el extensor de semivida es albúmina de suero humana.
7. La molécula de unión con base en Fn3 de la reivindicación 1, en donde el objetivo específico es lisozima.
8. Un conjugado que comprende una molécula de unión con base en Fn3 de cualquiera de las reivindicaciones precedentes unida a una o más unidades estructurales sin Fn3.
9. El conjugado de la reivindicación 8, en donde la unidad estructural sin Fn3 comprende o se une a una molécula que aumenta la semivida de la molécula de unión con base en Fn3.
10. La molécula de unión con base en Fn3 o conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en donde la unidad estructural sin Fn3 comprende una molécula seleccionada del grupo que consiste de una región Fc de anticuerpo, albúmina de suero humana (HSA) y polietilenglicol (PEG).
11. La molécula de unión con base en Fn3 o conjugado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende adicionalmente por lo menos un residuo de aminoácido modificado en comparación con el dominio de Fn3 tipo natural que comprende la SEQ ID NO: 1 para adherir una unidad estructural funcional.
12. La molécula de unión con base en Fn3 o conjugado de la reivindicación 11, en donde el residuo de aminoácido modificado comprende la adición o sustitución de un residuo de cisteína o residuo de aminoácido no natural.
13. La molécula de unión con base en Fn3 o conjugado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende hebras beta de dos o más diferentes dominios de Fn3.
14. Una composición que comprende la molécula de unión con base en Fn3 o conjugado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un portador.
15. Una composición que comprende la molécula de unión con base en Fn3 o conjugado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un portador para uso como un medicamento.
16. Una composición según la reivindicación 15, en donde el medicamento se utiliza para tratar un sujeto por una enfermedad seleccionada del grupo que consiste de una enfermedad autoinmune, un cáncer, y una enfermedad infecciosa.

17. Un método para detectar una proteína en una muestra que comprende etiquetar la molécula de unión con base en Fn-3 o conjugado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, poner en contacto la molécula de unión marcada o conjugado con la muestra, y detectar la formación de complejo entre la molécula de unión con base en Fn3 o conjugado con la proteína.
- 5 18. Una colección de ácidos nucleicos variegada que codifica moléculas de unión con base en Fn3 de la reivindicación 1, en donde las moléculas de unión con base en Fn3 se unen a un objetivo específico.

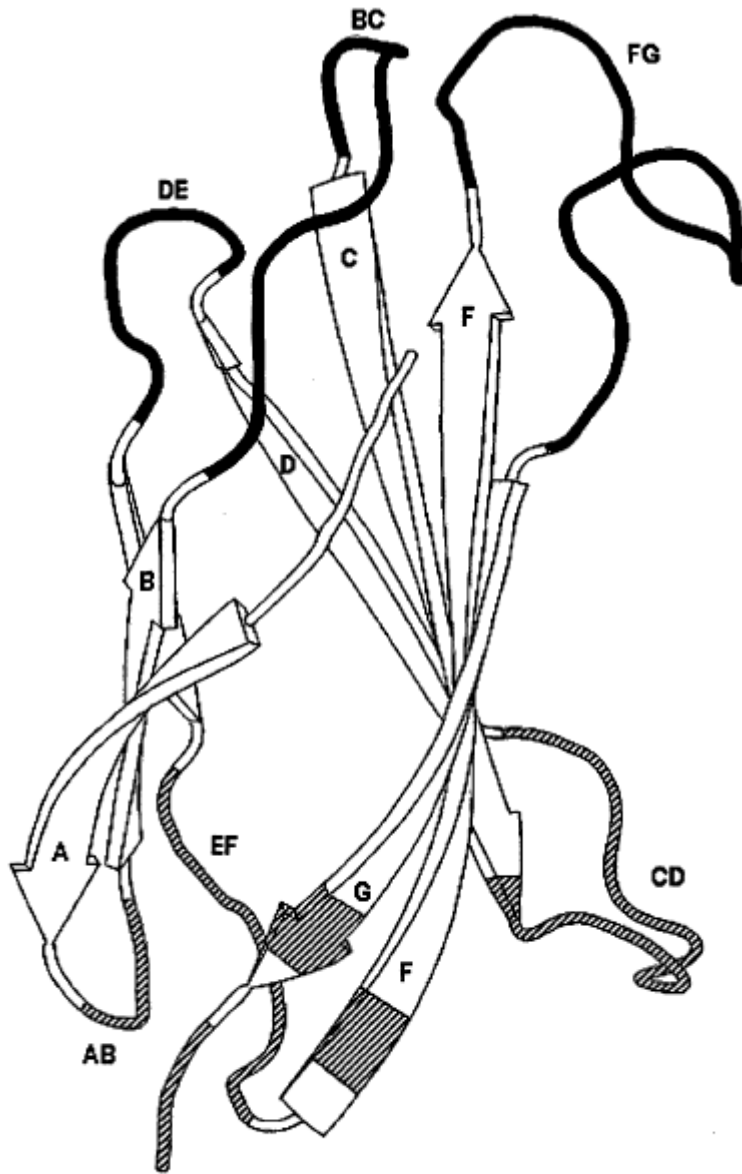


Fig. 1

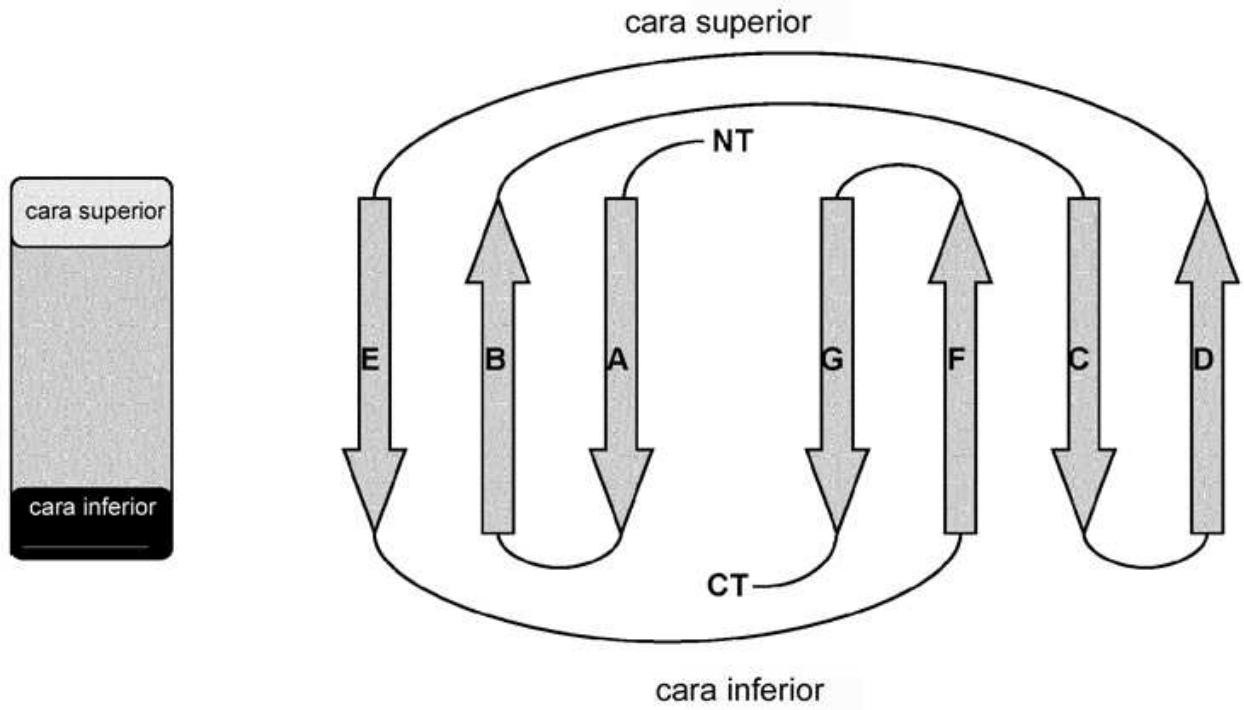


Fig. 2

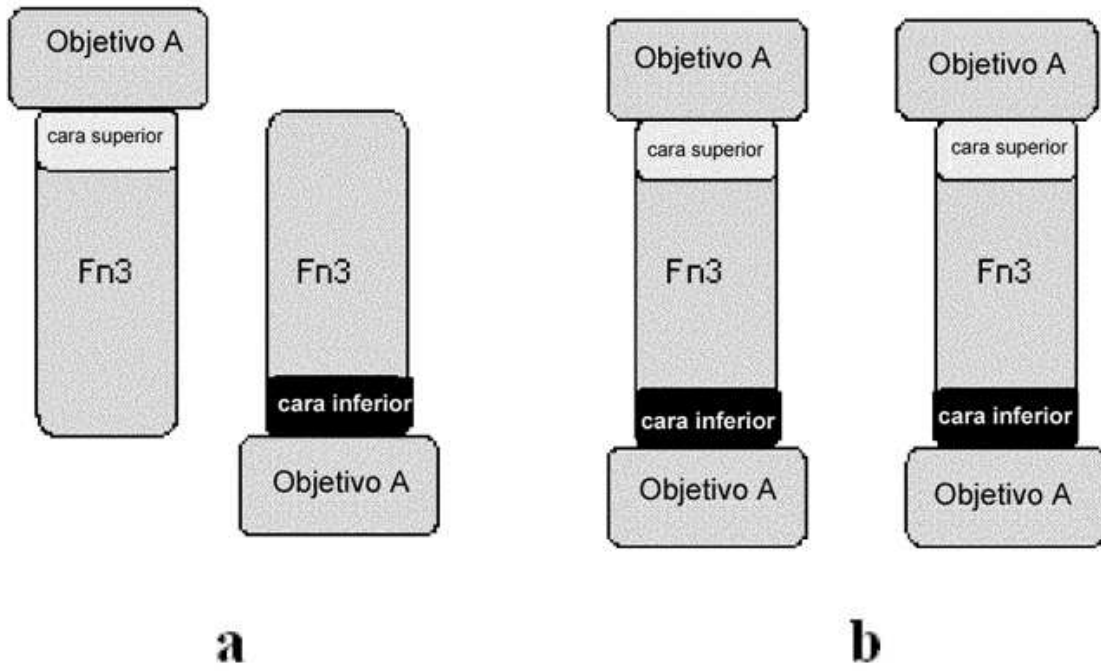


Fig. 3

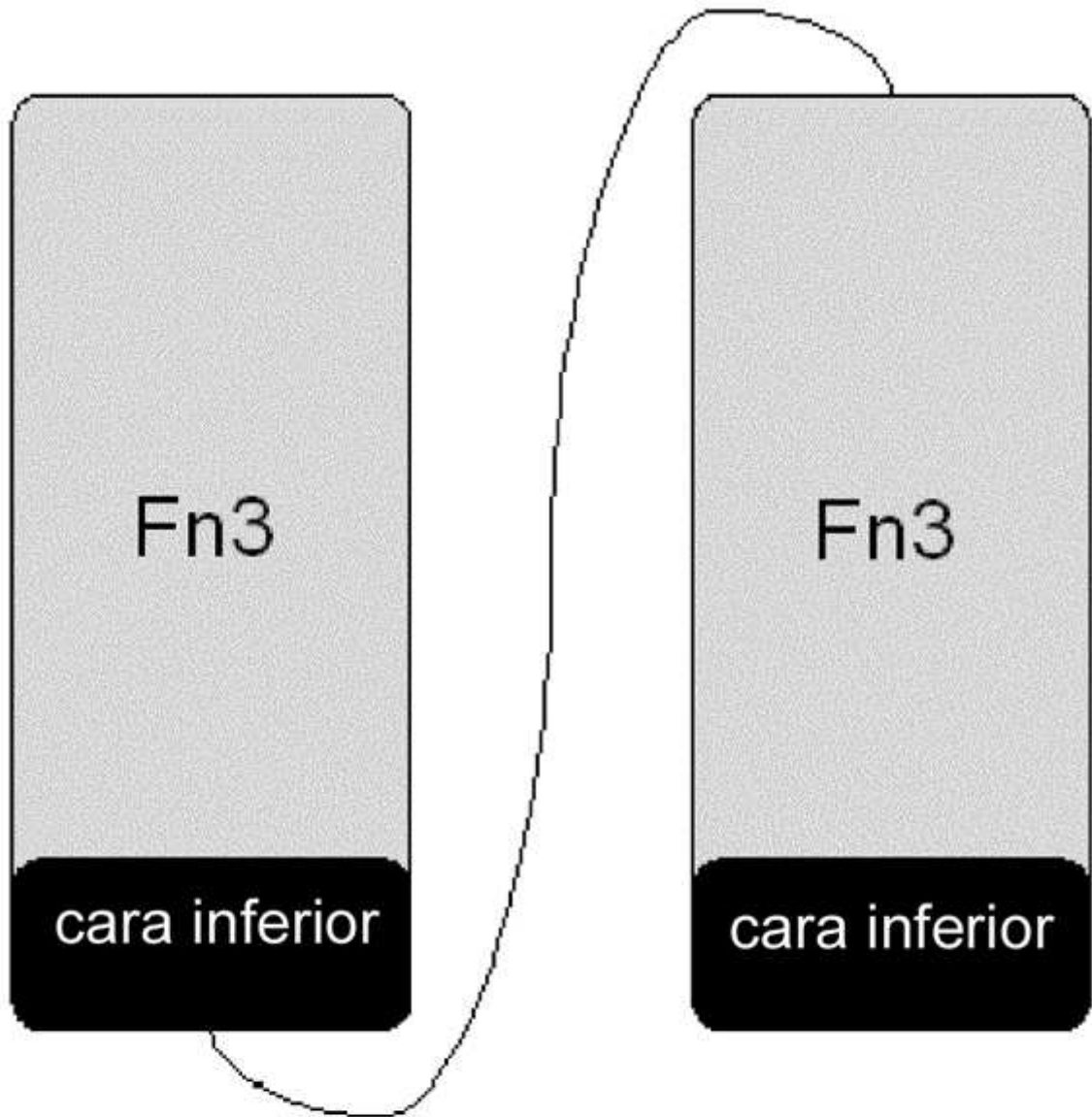


Fig. 4a

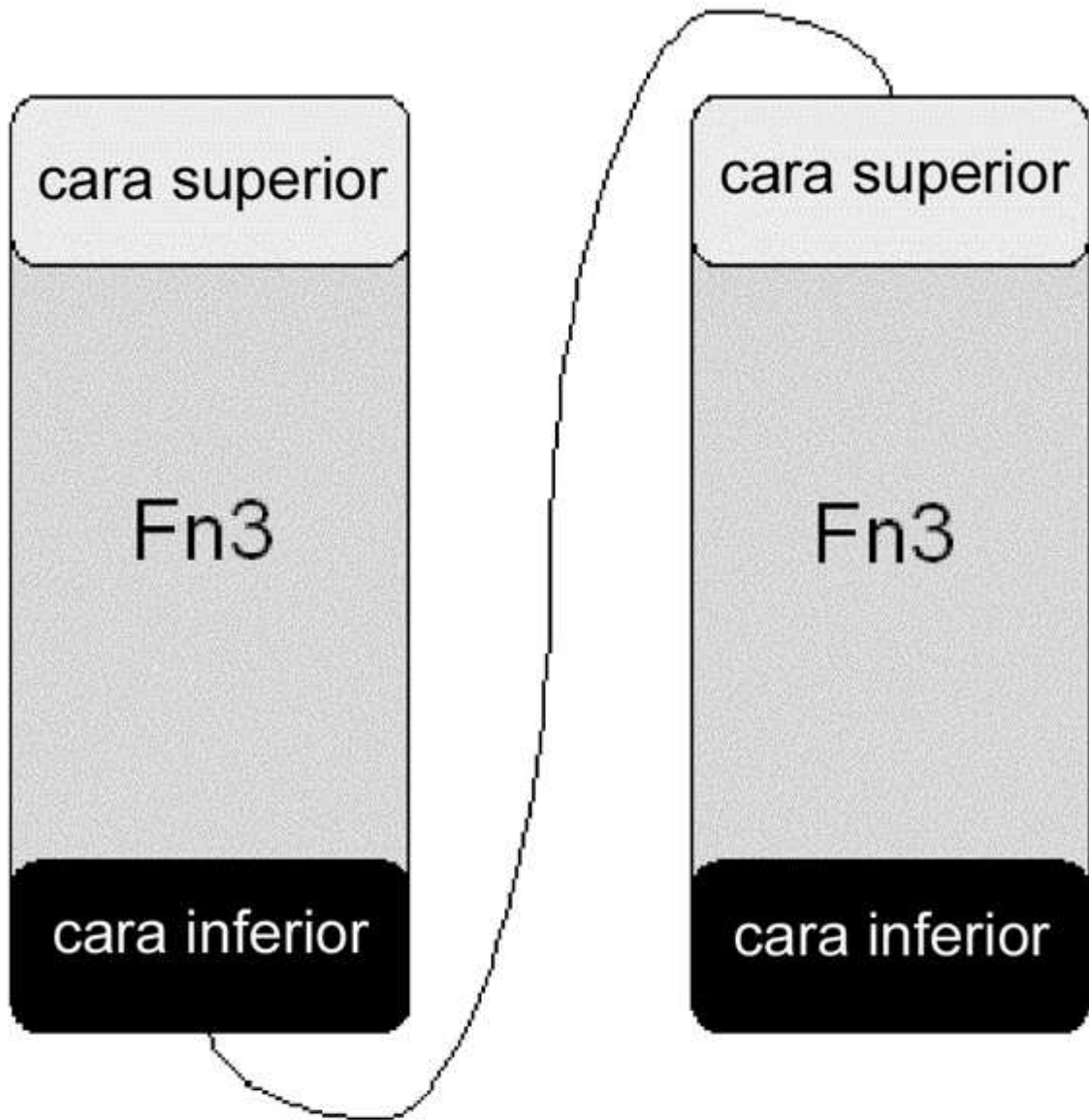


Fig. 4b

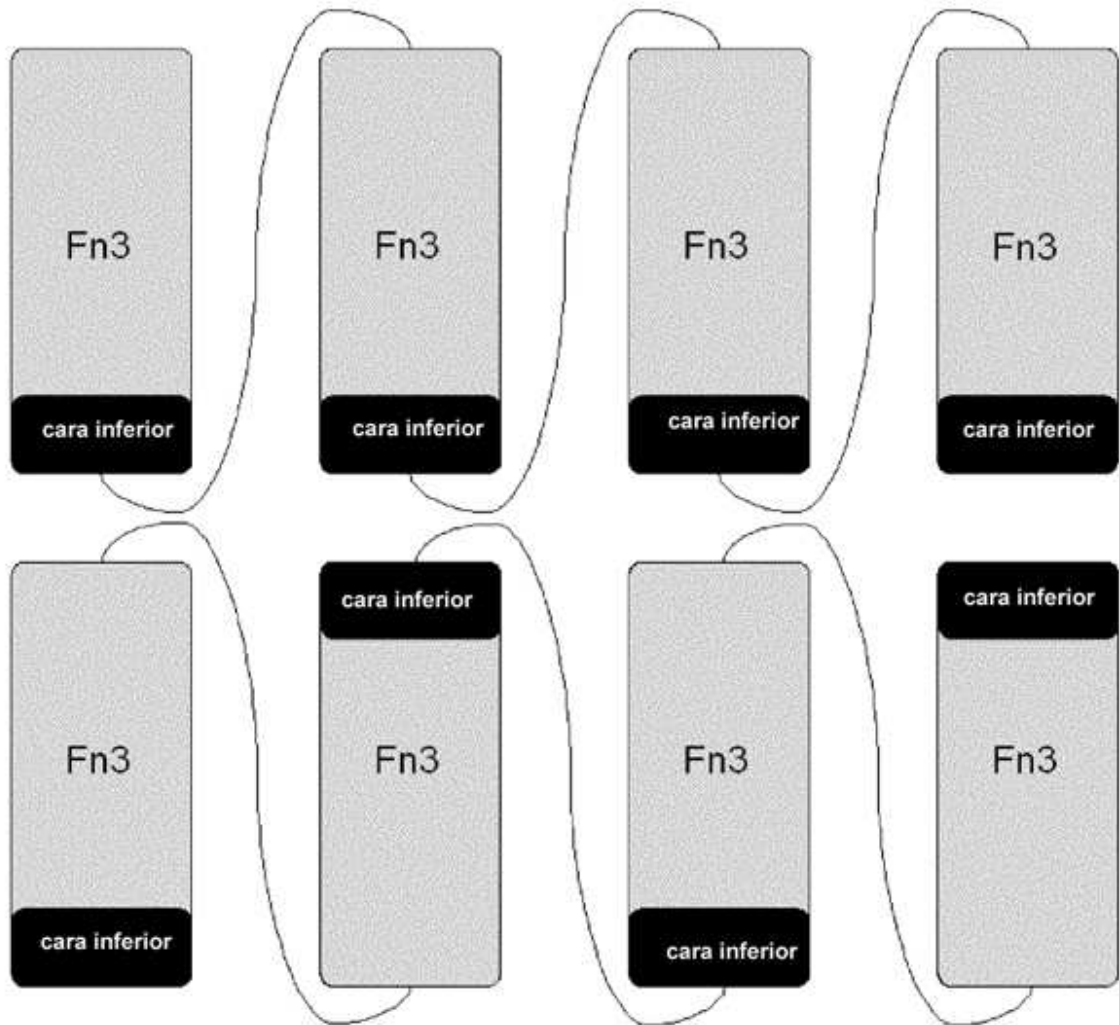


Fig. 5a

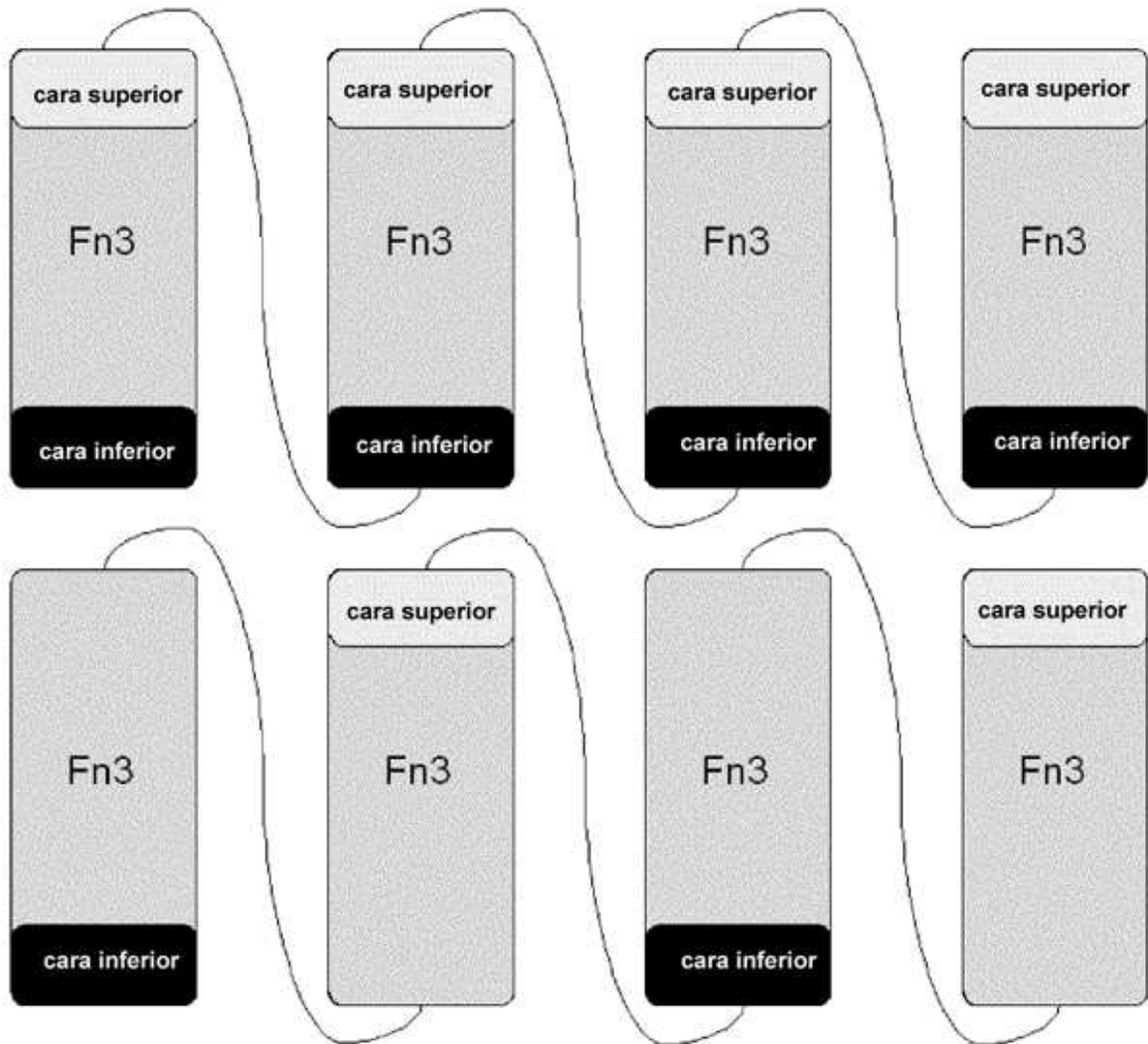


Fig. 5b

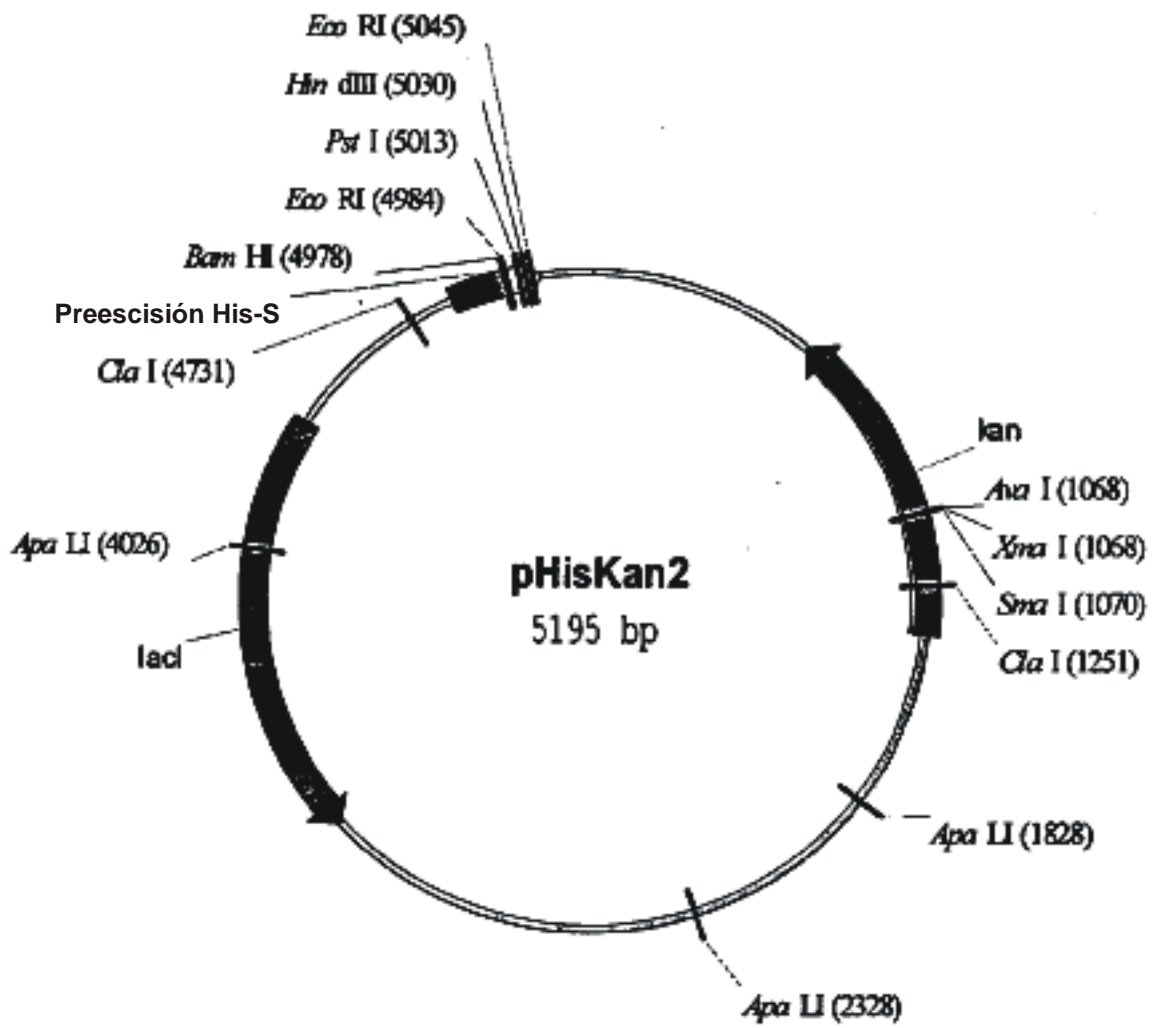


Fig. 6

7	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGKTE	GHRSHSEFTV	PGSKSTATIS	GLKHGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYRMEK
8	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGRD	AKSEKKEFTV	PGSKSTATIC	ELKRGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYRPEK
9	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGDD	KKHDAEFTV	PGSKSTATIT	RLKRGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYSPER
10	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGKD	HKSGHHEFTV	PGSKSTATIG	BMKGGVDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYTRPF
11	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGKKD	RASHLKEFTV	PGSKSTATIC	GKGGVDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYSGEP
12	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGRK	GSKLKEFTV	PGSKSTATIP	GLKQGDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYMFER
13	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGTV	DDKLRHEFTV	PGSKSTATIS	RLKRGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYRAEN
14	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGVL	STKHLKEFTV	PGSKSTATIS	GLKLGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYRMES
15	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGSR	SHRKLTEFTV	PGSKSTATIS	GLKTGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYRTEH
16	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGIG	KEKSEVEFTV	PGSKSTATIR	DVKKGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYRAET
17	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGQV	GKTKVHEFTV	PGSKSTATIR	GLKRGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYFPEI
18	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGHTA	KTRHHHEFTV	PGSKSTATIC	KSRRGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYQAEI
19	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGYGA	AMRRAHEFTV	PGSKSTATIS	GLKRGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYRHEL
20	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGKIG	GKPKVREFTV	PGSKSTATIL	GLKPGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYIHEQ
21	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGDR	HBPRAHEFTV	PGSKSTATIT	GCKRGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYRYEH
22	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGKSH	GHRQKHEFTV	PGSKSTATIS	DYRQGGDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYKDEL
23	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGVMG	DITKVKKEFTV	PGSKSTATIE	RIKLGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYRKEH
24	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGEBAS	KHRQHEFTV	PGSKSTATIS	RIKRGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYSPES
25	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGEP	RKYSSEFTV	PGSKSTATIR	HSHKGDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYWREI
26	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGKTA	RKYHQEFTV	PGSKSTATIS	GIKRGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYHSEH
27	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGELTK	RKSLJSEFTV	PGSKSTATII	GLKAGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYKTEH
28	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGKVK	AKAPLVEFTV	PGSKSTATIS	SLKTGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYRYEG
29	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGDR	KWRIKEFTV	PGSKSTATIS	GLKRGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYRLDG
30	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGIPA	KKHTHEFTV	PGSKSTATIT	GLKSGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYRTEI
31	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGEVH	GHTFAHEFTV	PGSKSTATIV	RLKRGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYCPER
32	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGMIS	GDKRRREFTV	PGSKSTATID	RJLKGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYRLES
33	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGVNH	DKHPKKEFTV	PGSKSTATIS	GLKRGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYKSEA
34	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGVAG	KTRPSEFTV	PGSKSTATIP	HLKLGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYRAEH
35	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGKNG	RHMLDHEFTV	PGSKSTATIS	GLKRGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYHNEH
36	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGNV	AAALPEFTV	PGSKSTATIT	GLMSGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYSTEH
37	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGKLS	OPTRREFTV	PGSKSTATIS	RLKSGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYHVEL
38	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGKKS	HNSAAKEFTV	PGSKSTATIT	GLKSGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYKPEY
39	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGKHH	KHITVREFTV	PGSKSTATIA	GKSLGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYTSFT
40	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGKPC	HNSKVHEFTV	PGSKSTATID	GAKKGGDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYIIMEH
41	VSMIEKDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGQTM	MGQSNVEFTV	PGSKSTATIS	P9KLGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYLSSET
WT	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGEG	GNSPVQEFV	PGSKSTATIS	GLKPGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYRTEI
42-Cons	VSDVPRDLEV	VAAPTPTSELLI	SMDAPAVTVR	YIRITYGKIG	GSKVHEFTV	PGSKSTATIS	GLKRGDDYTI	TVYAVTGRGD	SPASSKPISI	WYRPEH

51

96

Fig. 7

SEQ ID
43 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.B AYRSEGOEFT VPGSKSTATI SSVGQVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INVEGSE
44 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.S SLGSE.OEFT VPGSKSTATI SHAPIYVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYIPG
45 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.Q A.OEBGOEFT VPGSKSTATI SAHSYVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYITGE
46 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGEYR YRSEHGOEFT VPGSKSTATI SRGPAVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYSYR
47 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.R GYSERGOEFT VPGSKSTATI SESRYVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYPSY
48 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.Q GSESEHGOEFT VPGSKSTATI SBRYYVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYASY
49 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.Y GSAERGOEFT VPGSKSTATI SQAYIGVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYATAS
50 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.. SLYHGOEFT VPGSKSTATI SASIANDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYSYH
51 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGESI RSPGGOEFT VPGSKSTATI SPQSGVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYSIAS
52 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGESS RSP.RGOEFT VPGSKSTATI SRABRYVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYILRQ
53 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGESS PEY.RGOEFT VPGSKSTATI SLEHYVDYIT ITVAVTGRG EPTSSKPIIS INYQRY
54 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGESL RSR.EGOEFT VPGSKSTATI SGRQESVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYGQY
55 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGEGQ GAG.AGOEFT VPGSKSTATI SGAEPAVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYGPY
56 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.Y LYH.HGOEFT VPGSKSTATI SYRSAPVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYRHER
57 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGES LLY.HGOEFT VPGSKSTATI SYGPASVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYRRY
58 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.. SSGHRSQOFT VPGSKSTATI SSSSRVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYGRY
59 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.. YGYSRGOEFT VPGSKSTATI SYSPRVVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYGSY
60 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGEYR YAKAYGOEFT VPGSKSTATI SRSSPRVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYPRY
61 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.P RSEEGEOFT VPGSKSTATI SRRYSLVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYYSR
62 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.A ASNLROEFT VPGSKSTATI SSIYGLVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYISSY
63 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.R ERQHGIOEFT VPGSKSTATI SRYYRVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYEPY
64 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.R RSHRGOEFT VPGSKSTATI SRRRRVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYRRR
65 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.R LREGGGOEFT VPGSKSTATI SRAGERVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYAOY
66 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGEY .RSY.YOEFT VPGSKSTATI SSIEPPVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYRRL
67 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGEY AREL.YOEFT VPGSKSTATI SYIEPEVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYRYP
68 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGEY RSSL.POEFT VPGSKSTATI SYVYPSVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYSRY
69 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGEY SSI.YOEFT VPGSKSTATI SYPERVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYQSA
70 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.S HOGLSIOEFT VPGSKSTATI SPSSSVVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYRYR
71 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.R GSGLGOEFT VPGSKSTATI SRRARVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYALTE
72 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.R G.GYSSGOEFT VPGSKSTATI SSRIRQVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYQSY
73 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGE.R .GYPGOEFT VPGSKSTATI SBYSHSVVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INVAQY
74 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGEYR YRITIGESI RSRQOFT VPGSKSTATI SRQBAVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYRYE
75 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGEVG GS..QAQOFT VPGSKSTATI SREYGSVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYALQE
76 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGESS GR..YRQOFT VPGSKSTATI SRYPHVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYAKBY
77 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGESS RR..ARQOFT VPGSKSTATI SHEPLVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYISYI
78 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGEOQ AR..SROEFT VPGSKSTATI SEQRRVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYRALL
79 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGERR RR..YGOEFT VPGSKSTATI SRSRGVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYLIFY
80 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGESR RS..YPOEFT VPGSKSTATI SSSRSHVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYRSL
81 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGESH HY..GPOEFT VPGSKSTATI SLLGARVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYHGY
82 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGEAH EX..YGOEFT VPGSKSTATI SRSSSVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYVGY
83 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGELG YS..GGQOFT VPGSKSTATI SRAEYVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYERY
84 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGELS RS..GSOEFT VPGSKSTATI SRSYGVVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYEQSY
85 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGELP SQ..GROEFT VPGSKSTATI SYRREVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYGSY
86 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGEAY GE..SYQOFT VPGSKSTATI SOSPEVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYASBY
87 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SMDAPAVTVR YRITIGEAY GE..SYQOFT VPGSKSTATI SOSPEVDYIT ITVAVTGRG ESPASSKPIIS INYASBY

Fig. 8

88 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS SS..RROEFT VEGSKSTATI SCEBSYVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYAEER
89 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS HE..SYOEFT VEGSKSTATI SPYSRVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYSRER
90 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS RP..YOEFT VEGSKSTATI SYAHYSVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYERRS
91 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS R...SROEFT VEGSKSTATI SYYGXYVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYRSLR
92 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS R...YRQOFT VEGSKSTATI S9QSRVVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYGRPA
93 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS R...EYQOFT VEGSKSTATI SRVYGHVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYSGYS
94 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS H...YYQOFT VEGSKSTATI SPYAGGVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYBEBE
95 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS Y...ARQOFT VEGSKSTATI SRDYRRVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYRBA
96 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS Y...SEQOFT VEGSKSTATI SYYPBRVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYH88R
97 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS Y...LRQOFT VEGSKSTATI SRSARVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYFSA
98 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS S...RSOFT VEGSKSTATI SHSRPVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYQRY
99 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS S...HSOFT VEGSKSTATI SHSRPVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYPRSE
100 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS E...HPOFT VEGSKSTATI S9PQSGVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYYSY
101 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS S...RQOFT VEGSKSTATI SQARARVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYRRYR
102 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS A...LEQOFT VEGSKSTATI SRQALEVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYASYY
103 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS E...GGQOFT VEGSKSTATI S8YQSEVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYARBR
104 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS R...YGOFT VEGSKSTATI SELLSVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYBLRY
105 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS Y...RYOFT VEGSKSTATI SGYREHVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYQESY
106 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS R...RGOFT VEGSKSTATI SPSLEVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYRSGY
107 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS R...RYOFT VEGSKSTATI SPGGOSVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYRGGY
108 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS R...A.OEFT VEGSKSTATI SGLGPPVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYRSQH
109 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS GYAERGQOFT VEGSKSTATI S9PGARVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INY9SLG
110 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS GSSRSOFT VEGSKSTATI SR9YQFVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYGSYP
111 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS YHQRROFT VEGSKSTATI SRYGGSVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYAYG
112 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS GYXGSSOFT VEGSKSTATI S8PESVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYRSE
113 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS Y8YXQOFT VEGSKSTATI S8GRSSVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYRRSY
114 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS ASYRAAOFT VEGSKSTATI S8YSYSVDYT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYRSG
115 VSDVPRDLEV VAAATPTSILLI SWDAPAVTVR YRITYGESS ASHRYOFT VEGSKSTATI S8RSQSVDT ITVYAVTGRG ESPASSKFTS INYRREL
116

Fig. 8 cont.

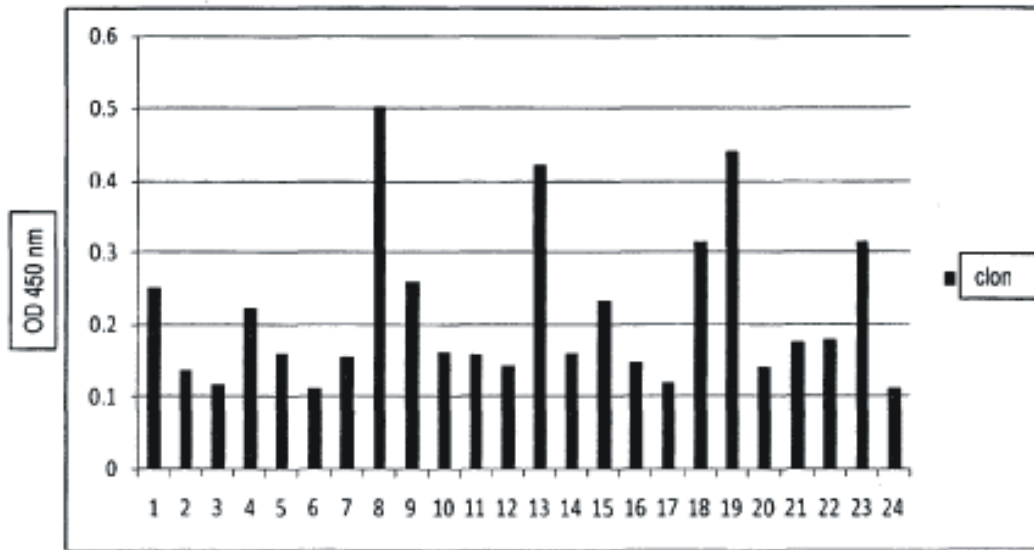


Fig. 9

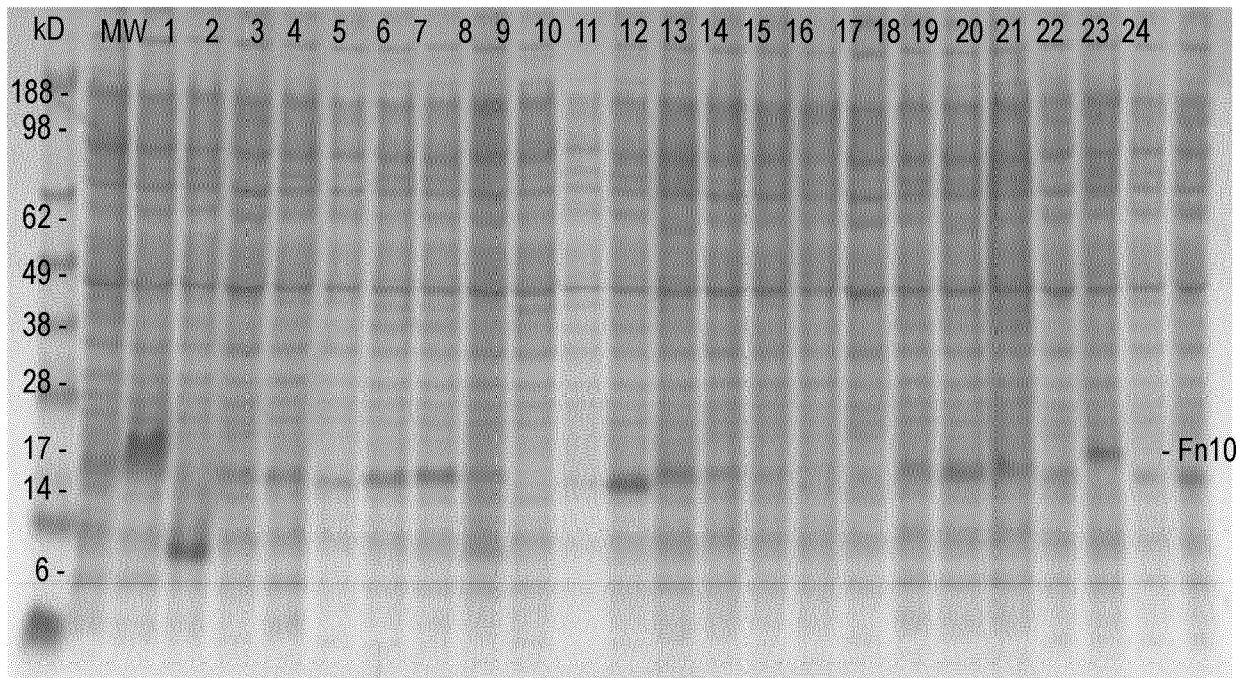


Fig. 10

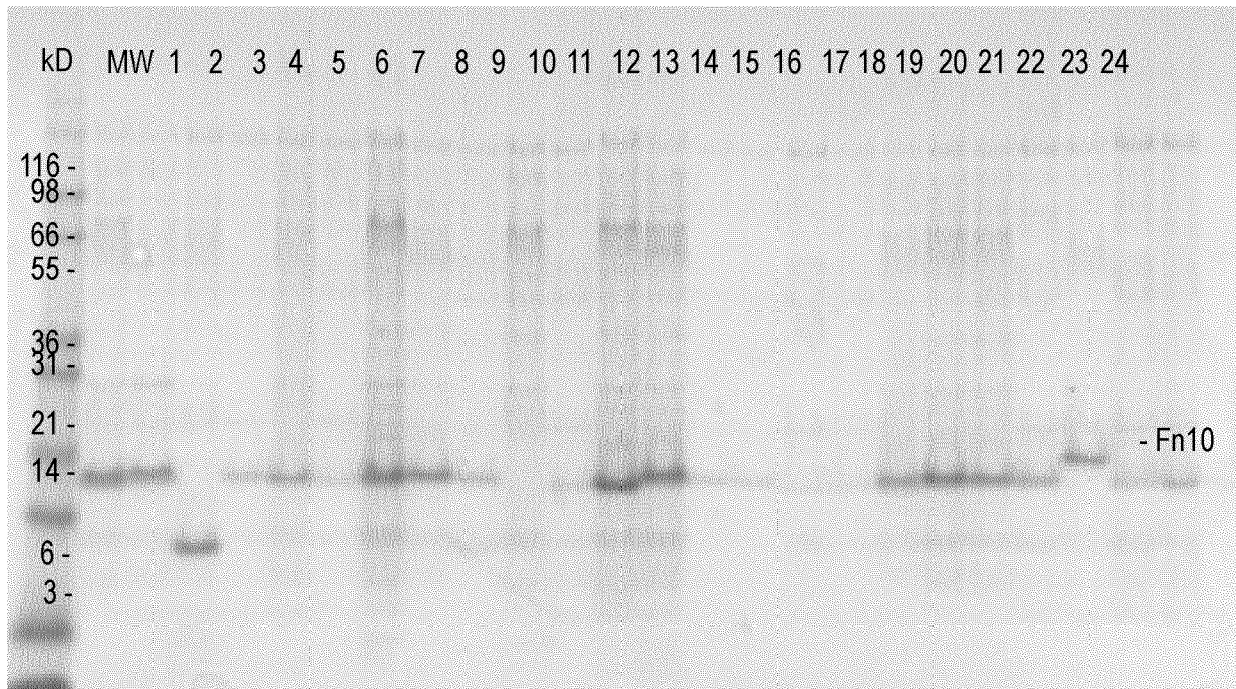


Fig. 11

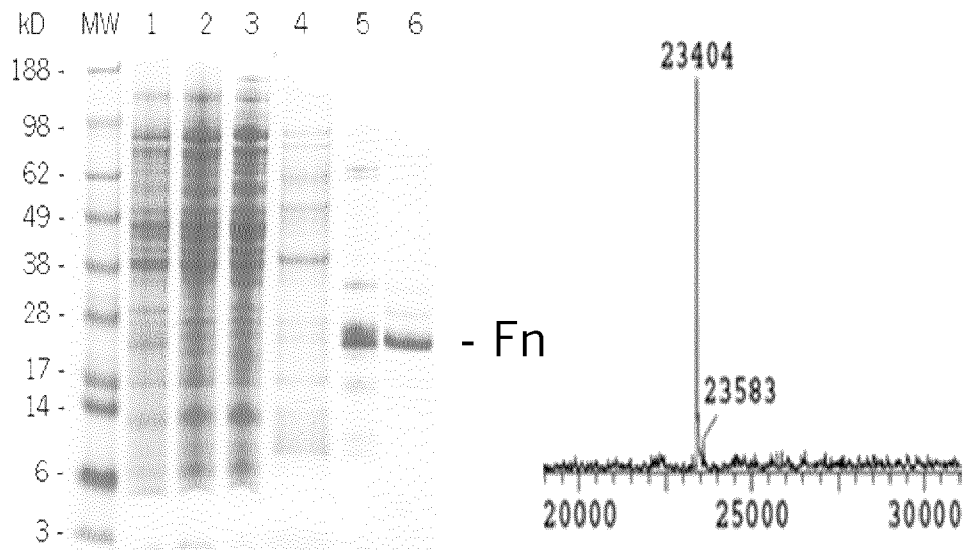


Fig. 12

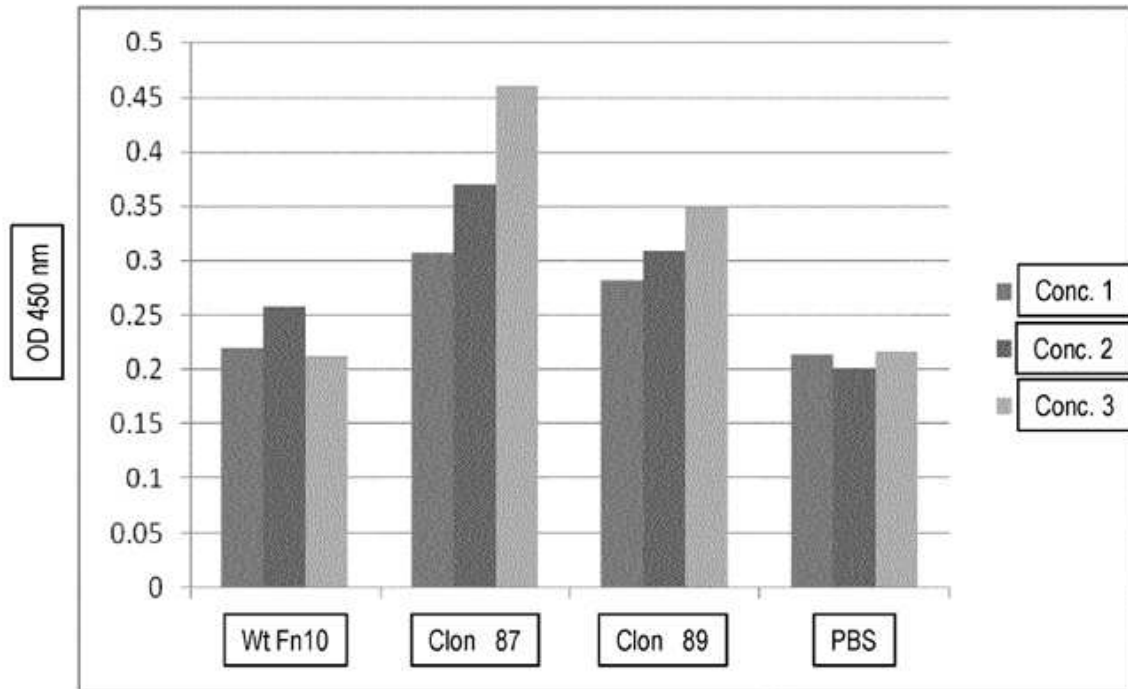


Fig. 13

Unión VEGFR2 del clon 87

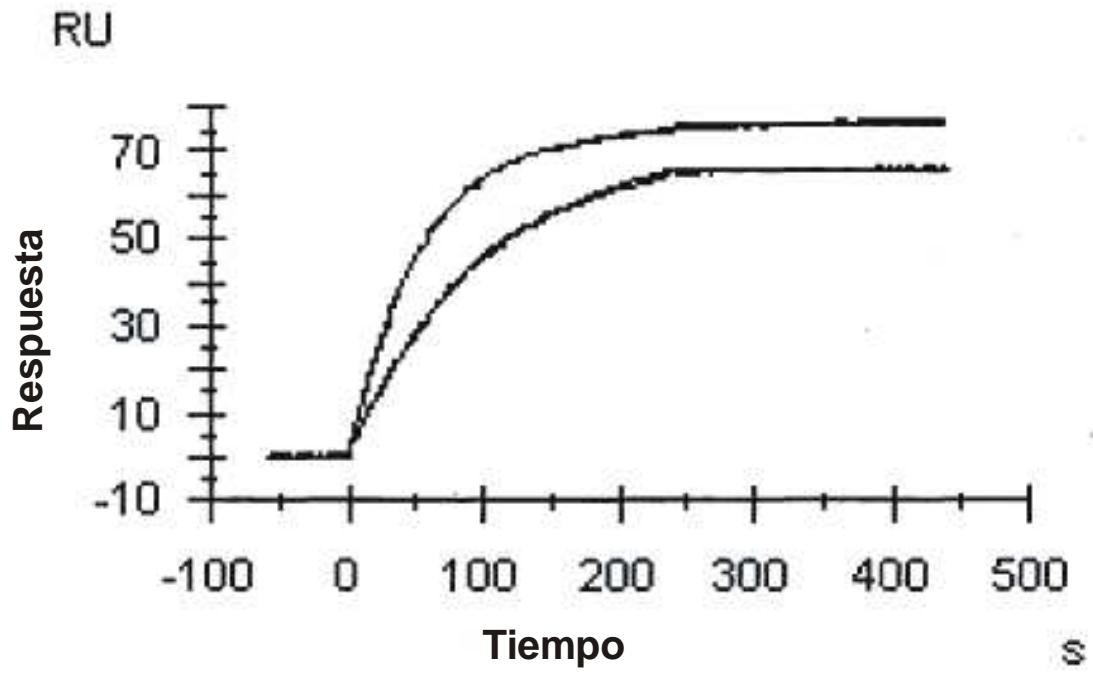


Fig. 14

Unión HSA del clon 87

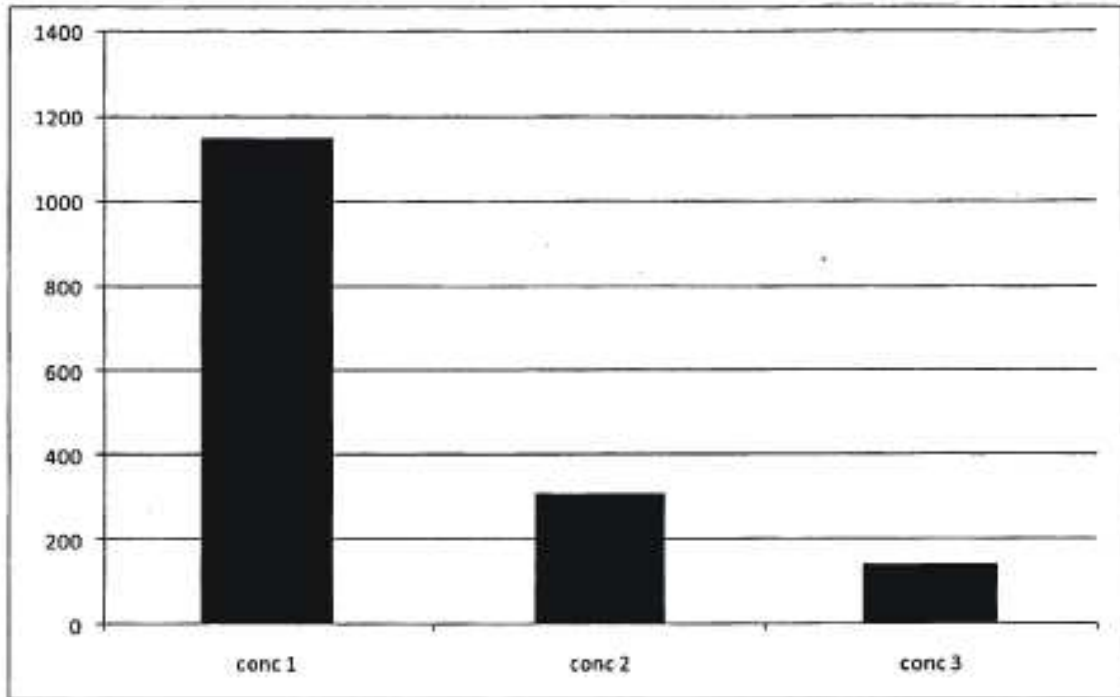


Fig. 15