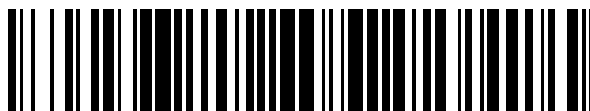


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 875**

51 Int. Cl.:

C07K 14/78 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2011** **PCT/US2011/032231**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011** **WO11130354**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2011** **E 11715372 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018** **EP 2558491**

54 Título: **Proteínas con un dominio de armazón a base de fibronectina que se unen a PCSK9**

30 Prioridad:

03.05.2010 US 330731 P

13.04.2010 US 323562 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.11.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CAMPHAUSEN, RAY;
CLOAD, SHARON T.;
DAVIS, JONATHAN H.;
DENHEZ, FABIENNE M.;
SAEED-KOTHE, AMNA;
LIPOVSEK, DASA;
LOW, CHEE MENG;
MITCHELL, TRACY S.;
RAKESTRAW, GINGER C.;
RUSSO, KATIE A.;
LO, CHING-HSIUNG FREDERICK;
MIAO, BOWMAN;
PARKER, REX A. y
SITKOFF, DOREE F.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 689 875 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas con un dominio de almacén a base de fibronectina que se unen a PCSK9

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a proteínas con dominios de almacén basados en fibronectina que se unen a la proproteína convertasa subtilisina kexina tipo 9 (PCSK9). Además, se describe en el presente documento el uso de proteínas innovadoras en aplicaciones terapéuticas para tratar la aterosclerosis, hipercolesterolemia y otras enfermedades relacionadas con el colesterol, células que comprenden dichas proteínas, polinucleótidos que codifican dichas proteínas o fragmentos de los mismos, y vectores que comprenden los polinucleótidos que codifican las proteínas innovadoras.

Introducción

La aterosclerosis es una enfermedad de las arterias responsable de la enfermedad cardíaca coronaria (CHD) que subyace en la mayoría de las muertes en países industrializados (Lusis (2000)). Se han establecido ahora varios factores de riesgo para la CHD: dislipidemias, hipertensión, diabetes, fumar, dieta mala, inactividad y estrés. La mayoría de dislipidemias clínicamente relevantes y las más comunes se caracterizan por un aumento de la lipoproteína de baja densidad y lipoproteínas de muy baja densidad (LDL y VLDL) con hipercolesterolemia en ausencia o presencia de hipertrigliceridemia (Fredrickson et al. (1967)). Una elevación aislada de colesterol LDL es uno de los factores de riesgo más comunes para la CHD. La PCSK9 (a la que también se hace referencia como HCHOLA3, NARC-1, o FH3) es una proteasa que pertenece a la subfamilia de proteinasas K de la familia de subtilasa secretoras (Naureckiene et al., Arch. Biochem. Biophys., 420:55-57 (2003)). Se ha demostrado que la PCSK9 es un regulador clave de la homeostasis del colesterol y los niveles de lipoproteínas de baja densidad. La proteína PCSK9 circulante controla el metabolismo del LDL uniéndose directamente al receptor de LDL y promoviendo su degradación en los hepatocitos. La regulación del receptor proteico de LDL mediada por PCSK9 y la actividad da lugar a un aclaramiento reducido de LDL de la circulación y suben los niveles de LDL. Se conocen varias formas mutantes de PCSK9, incluyendo S127R, N157K, F216L, R218S, y D374Y, estando S127R, F216L, y D374Y unidas a la hipercolesterolemia autosómica dominante (ADH). Se cree que la PCSK9 de tipo silvestre aumenta la tasa de retorno del receptor de LDL que produce menor aclaramiento de LDL (Maxwell et al, Proc. Natl. Acad. Sci, 102(6):2069-2074 (2005); Benjannet et al y Lallanne et al.), aunque las mutaciones de PCSK9 con pérdida de función dan como resultados el aumento de niveles del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR), aumentan el aclaramiento de LDL circulante, y se produce una disminución correspondiente en el plasma de los niveles de colesterol (Rashid et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 102(15):5374-5379 (2005)). Por eso, la PCSK9 es una diana potencial para el tratamiento de aterosclerosis, hipercolesterolemia y otras enfermedades relacionadas con el colesterol. Los epítopos particulares de PCSK9, moléculas de unión a PCSK9 y usos de los mismos se describen en el documento WO 2008/125623.

Los armazones basados en fibronectina son una familia de proteínas capaces de evolucionar para unirse a cualquier compuesto de interés. Estas proteínas, que generalmente utilizan un almacén derivado de un dominio de fibronectina tipo III (Fn3) o tipo Fn3, funcionan de una manera característica de anticuerpos naturales o modificados (es decir, anticuerpos policlonales, monoclonales, o de cadena sencilla) y, además, posee ventajas estructurales. Específicamente, la estructura de estos miméticos de anticuerpo se ha diseñado para un plegamiento, estabilidad, y solubilidad óptimos, incluso en condiciones que dan lugar normalmente a la pérdida de estructura y función de los anticuerpos. Un ejemplo de proteínas de almacén basadas en fibronectina son las Adnectinas (Adnexus, Bristol-Myers Squibb R&D Company).

Los dominios de fibronectina tipo III (Fn3) comprenden, en orden desde el extremo N al extremo C, una cadena beta o tipo beta; A; un bucle, AB; una cadena beta o tipo beta, B; un bucle BC; una cadena beta o tipo beta C; un bucle CD; una cadena beta o tipo beta D; un bucle, DE; una cadena beta o tipo beta, E; un bucle; EF; una cadena beta o tipo beta F; un bucle FG; una cadena beta o tipo beta G; Cualquiera o todos los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG pueden participar en la unión con la diana. Los bucles BC, DE, y FG son análogos tanto estructural como funcionalmente a las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las inmunoglobulinas. La Patente de EE. UU. N.º 7.115.396 describe dominios proteicos Fn3 en los que las alteraciones de los bucles BC, DE, y FG da como resultado una alta afinidad por enlazadores de TNFα. La Publicación de EE. UU. N.º 2007/0148126 describe dominios proteicos Fn3 en los que las alteraciones en los bucles BC, DE, y FG da como resultado una alta afinidad por enlazadores de VEGFR2.

Sería ventajoso obtener proteínas de almacén con dominio fibronectina que se unan a PCSK9 para el tratamiento terapéutico de aterosclerosis, hipercolesterolemia y otras enfermedades relacionadas con el colesterol.

Sumario de la invención

La solicitud proporciona Adnectinas contra la PCSK9 humana. Específicamente la invención proporciona polipéptidos que comprenden un dominio Fn3, en el que el bucle FG comprende una secuencia de acuerdo con la

fórmula $EX_4X_1X_5X_3X_1X_6GYX_4HR$ (SEQ ID NO: 451), en la que X_1 es cualquier aminoácido; X_4 es Y o F; X_5 es Y, F o W; y X_6 es S o A. El dominio Fn3 es un dominio Fn3 derivado del décimo módulo de tipo silvestre del dominio tipo III de fibronectina humana ($^{10}Fn3$). En algunas realizaciones, el polipéptido $^{10}Fn3$ de la invención es al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, o 90 % idéntico al dominio $^{10}Fn3$ humano.

5 En algunas realizaciones, se pueden extender o acortar uno o más bucles seleccionados de entre BC, DE, y FG una longitud relacionada con el bucle de fibronectina humana correspondiente.

10 Los polipéptidos de la invención comprenden un décimo dominio de fibronectina tipo III ($^{10}Fn3$), en el que el dominio $^{10}Fn3$ comprende un bucle AB; un bucle BC; un bucle CD; un bucle DE, un bucle EF; y un bucle FG; y tiene al menos un bucle seleccionado de entre BC, DE, y FG con una secuencia de aminoácidos alterada con respecto a la secuencia del bucle correspondiente del dominio $^{10}Fn3$ humano.

15 En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende un dominio Fn3 que comprende una secuencia que es al menos un 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 100 % idéntica a las regiones no bucles.

20 En algunas realizaciones, el bucle BC de la proteína de la invención comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2-17, 106-135, y 301-303. En ciertas realizaciones, el bucle BC de la proteína de la invención comprende una parte sombreada de una cualquiera de las SEQ ID NO: 2-17, 106-135, y 301-303 como se muestra en la Tabla 3. Por ejemplo, en una realización, un bucle BC comprende la secuencia PPPSHGYG (restos 3-10 de la SEQ ID NO: 2), DAPAHAYG (restos 3-10 de la SEQ ID NO: 5), EPFSRLPGGGE (restos 3-13 de la SEQ ID NO: 106), o DAPADGGYG (restos 3-11 de la SEQ ID NO: 107).

25 En algunas realizaciones, el bucle DE de la proteína de la invención comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18-27 y 136-141. En ciertas realizaciones, el bucle DE de la proteína de la invención comprende la parte sombreada de una cualquiera de las SEQ ID NO: 18-27 y 136-141 como se muestra en la Tabla 3. Por ejemplo, en una realización, el bucle DE comprende la secuencia PGKG (restos 2-5 de la SEQ ID NO: 18), VGVG (restos 2-5 de la SEQ ID NO: 27), o VSKS (restos 2-5 de la SEQ ID NO: 137).

30 En algunas realizaciones, el bucle FG de la proteína de la invención comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 28-38 y 142-172. En ciertas realizaciones, el bucle DE de la proteína de la invención comprende la parte sombreada de una cualquiera de las SEQ ID NO: 28-38 y 142-172 como se muestra en la Tabla 3. Por ejemplo, en una realización, el bucle FG comprende la secuencia EYPYKHSGYYHR (restos 1-12 de la SEQ ID NO: 28), EYPYDYSGYHR (restos 1-12 de la SEQ ID NO: 142), o EFDFVGAGYYHR (restos 1-12 de la SEQ ID NO: 167).

35 En algunas realizaciones, el dominio $^{10}Fn3$ pueden empezar y/o terminar con sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos.

40 En algunas realizaciones, la proteína de la invención comprende una secuencia de bucle de entre las secuencias de bucle BC que se muestran en las SEQ ID NO: 2-17, 106-135, y 301-303; una secuencia de bucle DE que se muestra en las SEQ ID NO: 18-27 y 136-141; y una secuencia de bucle FG que se muestra en las SEQ ID NO: 28-38 y 142-172. En ciertas realizaciones, la proteína de la invención comprende una secuencia de bucle BC que comprende la parte sombreada de una cualquiera de las SEQ ID NO: 2-17, 106-135, y 301-303 que se muestran en la Tabla 3; una secuencia de bucle DE que comprende la parte sombreada de una cualquiera de las SEQ ID NO: 18-27 y 136-141 que se muestran en la Tabla 3; y una secuencia de bucle FG que comprende la parte sombreada de las SEQ ID NO: 28-38 y 142-172 que se muestran en la Tabla 3.

45 En algunas realizaciones, la proteína de la invención comprende una secuencia de aminoácidos de los bucles BC, DE y FG que es al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 100 % idéntica a la de una cualquiera de las SEQ ID NO: 2-38, 106-172, y 301-303. En ciertas realizaciones, la proteína de la invención comprende una secuencia de aminoácidos de los bucles BC, DE, y FG que es al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 100 % idéntica a cualquiera de las partes sombreadas de los bucles BC, DE, y FG que se muestran en la Tabla 3, como se ha descrito anteriormente.

50 En algunas realizaciones, la Adnectina anti-PCSK9 comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 39-76, 173-290, y 304-309.

60 En algunas realizaciones, la Adnectina anti-PCSK9 comprende la secuencia de aminoácidos del dominio Fn3 de la posición 3-96 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 39-76, 173-290, y 304-309.

65 En un aspecto, la presente divulgación proporciona una Adnectina anti-PCSK9 que comprende un bucle BC que tiene la secuencia $SW(X_1)_ZX_2G$ (SEQ ID NO: 323) donde X_1 es cualquier aminoácido, Z es un número del 6-9 y X_2 es Y o H.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una Adnectina anti-PCSK9 que comprende un bucle DE que tiene la secuencia $PX_1X_1X_1X_3T$, (SEQ ID NO: 324) donde X_1 es cualquier aminoácido y X_3 es G o S.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una Adnectina anti-PCSK9 que comprende un bucle FG que tiene la secuencia $EX_4X_1X_5X_1X_1X_6GYX_4HRP$ (SEQ ID NO: 325), donde X_1 es cualquier aminoácido; X_4 es Y o F; X_5 es Y, F, o W; y X_6 es S o A.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una Adnectina anti-PCSK9 que comprende un bucle BC que tiene la secuencia $SW(X_1)_ZX_2G$ (SEQ ID NO: 323), un bucle DE que tiene la secuencia $PX_1X_1X_1X_3T$, (SEQ ID NO: 324), y un bucle FG que tiene la secuencia $EX_4X_1X_5X_1X_1X_6GYX_4HRP$ (SEQ ID NO: 325) como se definen en el presente documento.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una Adnectina anti-PCSK9 que comprende un bucle BC que tiene la secuencia $SWEFPSRLPGGGE$ (SEQ ID NO: 106), un bucle DE que tiene la secuencia $PX_1X_1X_1X_3T$, (SEQ ID NO: 324) y un bucle FG que tiene la secuencia $EX_4X_1X_5X_1X_1X_6GYX_4HRP$ (SEQ ID NO: 325) como se definen en el presente documento.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una Adnectina anti-PCSK9 que comprende un bucle BC que tiene la secuencia $(X_1)_ZX_2G$ (SEQ ID NO: 449) donde X_1 es cualquier aminoácido, Z es un número del 6-9, y X_2 es Y o H.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una Adnectina anti-PCSK9 que comprende un bucle DE que tiene la secuencia $X_1X_1X_1X_3$, (SEQ ID NO: 450) donde X_1 es cualquier aminoácido y X_3 es G o S.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una Adnectina anti-PCSK9 que comprende un bucle BC que tiene la secuencia $(X_1)_ZX_2G$ (SEQ ID NO: 449), un bucle DE que tiene la secuencia $X_1X_1X_1X_3$, (SEQ ID NO: 450), y un bucle FG que tiene la secuencia $EX_4X_1X_5X_1X_1X_6GYX_4HR$ (SEQ ID NO: 451) como se definen en el presente documento.

En algunas realizaciones, hay al menos una eliminación de aminoácidos del extremo N de la Adnectina PCSK9.

En algunas realizaciones, hay al menos una eliminación, inserción o sustitución de aminoácidos del extremo C de la Adnectina PCSK9.

En algunas realizaciones, se añade un enlazador en el extremo C de la Adnectina PCSK9.

En algunas realizaciones, la Adnectina PCSK9 se puede conjugar a un resto no $^{10}Fn3$ tal como la seroalbúmina humana (HSA) como se describe en las Publicaciones PCT N.º WO 2009/133208 y WO 2009/083804.

En algunas realizaciones, la Adnectina PCSK9 puede tener mutaciones en las secuencias de aminoácidos de los bucles AB, CD y EF como se describe en las Publicaciones PCT N.º WO 2009/133208 y WO 2009/083804.

En un aspecto, la Adnectina anti-PCSK9 comprende un resto farmacocinéticos (PK). En una realización, el resto PK comprende polietilenglicol (PEG) En ciertas realizaciones, el resto PK comprende una región Fc. En algunas realizaciones, el PK comprende una o más Adnectinas unidas a seroalbúmina. Las proteínas de fusión Adnectina anti-PCSK9-Fc a modo de ejemplo se muestran en la Tabla 1. Las Adnectinas unidas a seroalbúmina anti-PCSK9 a modo de ejemplo comprenden las SEQ ID NO: 618 o 619.

En ciertas realizaciones, la Adnectina anti-PCSK9 que tiene un resto PK comprende la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 322.

En un aspecto, la Adnectina anti-PCSK9 no comprende ningún resto PK (es decir, una Adnectina anti-PCSK9 "desnuda"). En ciertas realizaciones, la Adnectina anti-PCSK9 desnuda se puede administrar con una frecuencia que pueda conseguir suficientemente el efecto terapéutico deseado. En otra realización, la Adnectina anti-PCSK9 desnuda se puede administrar utilizando una formulación de liberación extendida (por ejemplo, una formulación subcutánea). En algunas realizaciones, la formulación de liberación extendida aumenta la longitud de la fase de absorción, o extiende el efecto farmacodinámico o ambos. Simplemente como ilustración, una formulación de liberación extendida comprende una solución de propilenglicol/PBS.

En un aspecto, la solicitud proporciona una Adnectina anti-PCSK9 útil en el tratamiento de aterosclerosis, hipercolesterolemia y otras enfermedades relacionadas con el colesterol.

En un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende un décimo dominio de fibronectina tipo III ($^{10}Fn3$) que se une a seroalbúmina y una Adnectina anti-PCSK9, en el que el dominio $^{10}Fn3$ de unión a la seroalbúmina se une a seroalbúmina, por ejemplo, HSA, con una Kd de 1 uM o menos. En ciertas realizaciones, el dominio $^{10}Fn3$ que se une a la seroalbúmina comprende una secuencia de aminoácidos que es al

menos un 70 % idéntica a la SEQ ID NO: 330. En una realización, el dominio ¹⁰F_n3 que se une a la seroalbúmina comprende un bucle BC que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 331, un bucle DE que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 332, y un bucle FG que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 333. En otra realización, el dominio ¹⁰F_n3 que se une a la seroalbúmina comprende uno o más de un bucle BC que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 331, un bucle DE que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 332, y un bucle FG que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 333.

En una realización, el dominio ¹⁰F_n3 que se une a la albúmina del polipéptido de fusión también se une a una o más de seroalbúminas de rhesus (RhSA), seroalbúmina de monos *Cynomolgus* (CySA), o seroalbúmina murina (MuSA). En otras realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 que se une a la seroalbúmina no reacciona de manera cruzada con una o más de entre RhSA, CySA o MuSA.

En ciertas realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 de unión a la seroalbúmina del polipéptido de fusión se une a la HSA con una K_d de 1 uM o menos. En algunas realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 de unión a la seroalbúmina se une a la HSA con una K_d de 500 nM o menos. En otras realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 de unión a la seroalbúmina se une a la HSA con una K_d de al menos 200 nM, 100 nM, 50 nM, 20 nM, 10 nM, o 5 nM.

En otras realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 de unión a la seroalbúmina del polipéptido de fusión se une al dominio I o II de la HSA. En una realización, el dominio ¹⁰F_n3 de unión a la seroalbúmina se une al dominio I y II de la HSA. En algunas realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 de unión a la seroalbúmina se une a la HSA a un pH de 5,5 a 7,4. En otras realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 de unión a la seroalbúmina se une a la HSA con una K_d de 200 nM o menos a un pH de 5,5. En otra realización, el dominio ¹⁰F_n3 de unión a la seroalbúmina se une a la HSA con una K_d de al menos 500 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 20 nM, 10 nM, o 5 nM con un intervalo de pH de 5,5 a 7,4. En una realización, el dominio ¹⁰F_n3 de unión a la seroalbúmina se une a la HSA con una K_d de al menos 500 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 20 nM, 10 nM, o 5 nM a un pH de 5,5.

En algunas realizaciones, la semivida sérica del polipéptido de fusión en presencia de seroalbúmina se al menos 5 veces mayor que la semivida sérica del polipéptido de fusión en ausencia de seroalbúmina. En ciertas realizaciones, la semivida sérica del polipéptido de fusión en presencia de seroalbúmina es al menos 2 veces, 5 veces, 7 veces, 10 veces, 12 veces, 15 veces, 20 veces, 22 veces, 25 veces, 27 veces, o 30 veces mayor que la semivida sérica del polipéptido de fusión en ausencia de seroalbúmina. En algunas realizaciones, la seroalbúmina es una cualquiera de HSA, RhSA, CySA, o MuSA.

En ciertas realizaciones, la semivida sérica del polipéptido de fusión en presencia de seroalbúmina es al menos de 20 horas. En ciertas realizaciones, la semivida sérica del polipéptido de fusión en presencia de seroalbúmina es al menos de 10 horas, 12 horas, 15 horas, 20 horas, 25 horas, 30 horas, 40 horas, 50 horas, 75 horas, 90 horas, 100 horas, 110 horas, 120 horas, 130 horas, 150 horas, 170 horas, o 200 horas. En algunas realizaciones, la semivida del polipéptido de fusión se observa en un primate (por ejemplo, en un ser humano o un mono) o en un ratón.

En cualquiera de los aspectos y realizaciones anteriores, el dominio ¹⁰F_n3 que se une a la seroalbúmina comprende una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 334, 338, 342, 346, y 348-370.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un alineamiento de las secuencia de aminoácidos de Adnectina anti-PCSK9 a modo de ejemplo. Las secuencias de aminoácidos de los bucles BC, DE, y FG se identifican por subrayado, cursiva/subrayado o negrita/subrayado, respectivamente.

La Figura 2 es una representación esquemática del ensayo de transferencia de energía en resonancia de fluorescencia (FRET) del PCSK9: dominio de homología del precursor del factor de crecimiento epidérmico (dominio EGFA) que se utilizó para medir la potencia de las Adnectinas PCSK9 que inhiben PCSK9:LDLR como se describe en el Ejemplo 2.

La Figura 3 muestra la curva generada por el ensayo FRET que se utilizó para medir la inhibición de PCSK9 humana:EGFA por los clones de Adnectina PCSK9 1459D05, 1784F03, 1813E02, 1922G04 y 1923B02 (panel A) y los clones 1459D05, 2012A04, 2011H05 y 2013E01 (panel B) como se describe en el Ejemplo 2.

La Figura 4 muestra la curva generada por un ensayo FRET que se utilizó para medir la inhibición de la interacción PCSK9 humana: AT1000972 por los clones de Adnectina PCSK9 1459D05, 1784F03, 1813E02, 1922G04 y 1923B02 (panel A) y los clones 1459D05, 2012A04, 2011H05 y 2013E01 (panel B) como se describe en el Ejemplo 2.

La Figura 5 muestra la actividad de los clones de Adnectina PCSK9 1459D05, 1784F03, 1813E02, 1922G04 y 1923B02 (panel A) y los clones 1459D05, 2012A04, 2011H05 y 2013E01 (panel B) en el ensayo FRET de unión directa de PCSK9 humana como se describe en el Ejemplo 2.

La Figura 6 muestra la inhibición de la actividad de PCSK9 en células HepG2 ensayada por el método de captación de Dil-LDL como se describe en el Ejemplo 2.

La Figura 7 muestra la inhibición del agotamiento de LDLR inducido por PCSK9 de la superficie de HepG2 por los clones de Adnectina PCSK9 1459D05, 1784F03, 2012A04, y 2011H05 (panel A) y los clones con ID

2011H05, 2012A04 y 2013E01 (panel B) como se describe en el Ejemplo 2. La CE_{50} (nM) de 1784F03, 2012A04, 2011H05, y 2013E01 son 15,98, 7,78, 8,85, y 12,41, respectivamente; el porcentaje de la inhibición de PCSK9 a 75 nM por los clones de Adnectina PCSK9 1459D05, 1784F03, 2012A04, 2011H05, y 2013E01 son 66,8, 150,2, 190,1, 177,4, y 152,2, respectivamente.

La Figura 8 muestra el efecto *in vivo* de la Adnectina PCSK9 ATI000959 (100 mg/kg) sobre el colesterol plasmático (panel A) y hPCSK9 plasmática no unida (panel B) en ratones transgénicos que sobre-expresan hPCSK9 como se describe en el Ejemplo 3. El ATI000959 contiene un NOF PEG ramificado de 40 kDa.

La Figura 9 muestra el efecto *in vivo* de la Adnectina PCSK9 ATI001114 (10 o 60 mg/kg) sobre los niveles de colesterol (panel A) y sobre los niveles plasmáticos de hPCSK9 no unida (panel B) en ratones transgénicos que sobre-expresan hPCSK9 como se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 10 muestra el efecto *in vivo* de las Adnectinas PCSK9 ATI000959 (panel A) o ATI001114 (panel B) administradas a 5 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p.), en una única dosis, sobre la hPCSK9 plasmática no unida en ratones transgénicos que expresan hPCSK9 normalmente (media $\pm$ SD) como se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 11 muestra el efecto dependiente de la dosis de la Adnectina PCSK9 ATI001114 sobre la hPCSK9 no unida en ratones transgénicos que expresan hPCSK9 normalmente (media $\pm$ SD) como se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 12 muestra el efecto de una única dosis de Adnectina PCSK9 ATI001114 (de 5 mg/kg i.v.) sobre la bajada de LDL-C en monos *Cynomolgus* (media $\pm$ SEM, $n = 3$) como se describe en el Ejemplo 3.

Figura 13. Determinación ITC de la afinidad y estequiometría de la unión de Adnectina PCSK9 a hPCSK9. Las Adnectinas PCSK9 se unen a la hPCSK9 con una estequiometría 1:1. El panel izquierdo muestra los datos de Adnectina PCSK9 ATI001081; el panel derecho muestra los datos de la Adnectina PCSK9 de la Adnectina PCSK9 ATI001174.

Figura 14. Inhibición de PCSK9: EGFA según el ensayo FRET (panel izquierdo) y PCSK9:ATI-972 según el ensayo FRET (panel derecho) por Adnectinas PCSK9.

Figura 15. Inhibición de agotamiento de LDLR inducido por PCSK9 de la superficie celular de HepG2 por Adnectinas anti-PCSK9.

Figura 16. Inhibición de la entrada de PCSK9-AF647 en células HepG2.

Figura 17. Niveles de hPCSK9 sérica no unida en ratones transgénicos tratados con PRD460 (dosificada por vía i.p.).

Figura 18. Efecto de PRD460 (15 mg/kg i.v.) sobre el LDL-C y PCSK9 libre en monos cyno (media $\pm$ SEM, $n = 3$).

Figura 19. Efecto de ATI-1081 (al que se también se hace referencia como ATI001081) sobre los niveles de PCSK9 no unida en monos *Cynomolgus*.

Figura 20. Efecto de ATI-1081 sobre los niveles de LDL-C en monos *Cynomolgus*.

Figura 21. Efecto de ATI-1081 en vehículo PBS en ratones transgénicos. La Figura ilustra el nivel de hPCSK9 plasmática no unida en ratones transgénicos.

Figura 22. Efecto de ATI-1081 dosificado por vía subcutánea en vehículo PG en ratones transgénicos. La Figura ilustra el nivel de hPCSK9 no unida en ratones transgénicos.

Figura 23. Semivida *in vivo* de HSA en ratones. Se inyectó la HSA en ratones desnudos a 20 mg/kg (panel A) o 50 mg/kg (panel B).

Figura 24. Determinación de semivida de SABA 1.1 (panel A), SABA 2.1 (panel B), SABA 3.1 (panel C), y SABA 4.1 (panel D) en ratones.

Figura 25. Gráfico que muestra el sumario de aumento de semivida de SABA 1-4 en ratones cuando se co-inyecta con HSA.

Figura 26. Determinación de la semivida de SABA 1.1 (panel A) y SABA 5.1 (panel B) en monos *Cynomolgus*.

Figura 27. Unión de SABA 1.2 a albúminas de ser humano, ratón y rata por el ensayo ELISA de unión directa.

Figura 28. Determinación de estequiometría de SABA 1.1 y HSA. SABA 1.1 y HSA se unen con una estequiometría de 1:1.

Figura 29. Análisis BIACORE® de la unión de SABA 1.2 a fragmentos del dominio recombinante de HSA.

Figura 30. Perfil farmacocinético de SABA 1.2 en monos *Cynomolgus* dosificados a 1 mpk y 10 mpk.

Figura 31. Perfil farmacocinéticos de SABA 1.2 en monos dosificado por vía intravenosa o subcutánea a 1 mpk.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Un "polipéptido" quiere decir cualquier secuencia de dos o más aminoácidos, independientemente de su longitud, modificación postraduccion, o función. "Polipéptido", "péptido" y "proteínas" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento. Los polipéptidos pueden incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales tales como los que se describen en la Patente de EE. UU. N.º 6.559.126. Los polipéptidos también se pueden modificar por cualquiera de varias maneras químicas convencionales (por ejemplo, un aminoácido se puede modificar con un grupo protector; el carboxilo del aminoácido terminal se puede hacer que sea un grupo terminal amida; el resto amino terminal se puede modificar con grupos para, por ejemplo, aumentar la lipofilia; o el polipéptido se puede glicosilar o modificar de otra manera para aumentar la estabilidad o la semivida *in vivo*). Las modificaciones del polipéptido pueden incluir la unión a otra estructura tal como un compuesto cíclico u otra molécula al polipéptido y también puede incluir polipéptidos que contienen uno o más aminoácidos en una configuración alterada (es decir, R

o S; o, L o D). Los péptidos de la invención son proteínas derivadas del décimo dominio tipo III de fibronectina que se han modificado para unirse específicamente a la PCSK9 y se hace referencia a estos en el presente documento como "Adnectina anti-PCSK9" o "Adnectina PCSK9".

- 5 El término "PK" es un acrónimo de "farmacocinética" y engloba propiedades de un compuesto que incluye, a modo de ejemplo, absorción, distribución, metabolismo, y eliminación por un sujeto. Una "proteína de modulación de la PK" o "resto PK" se refiere a cualquier proteína, péptido, o resto que afecta a las propiedades farmacocinéticas de una molécula biológicamente activa cuando se fusiona o se administra junto con la molécula biológicamente activa. Ejemplos de la proteína de modulación de la PK o resto PK incluye el PEG, enlazadores de seroalbúmina humana (HSA) (como se desvela en las Publicaciones de EE. UU. N.º 2005/0287153 y 2007/0003549, Publicaciones PCT N.º WO 2009/083804 y WO 2009/133208, y las moléculas de SABA descritas en el presente documento), seroalbúmina humana, Fc o fragmentos Fc y variantes de los mismos, y azúcares (por ejemplo, ácido siálico).

- 15 "Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" en el presente documento se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que es idéntico a los restos de aminoácidos en una secuencia seleccionada, después del alineamiento de las secuencias y la introducción de huecos, se fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y no considerando ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede conseguir por distintas maneras que están en la experiencia de la técnica, por ejemplo, utilizando el software de computadora disponible públicamente tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR®). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el alineamiento máximo sobre la longitud completa de las secuencias que se van a comparar.

- 25 Un polipéptido "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían en el diagnóstico o uso terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos y no proteínicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta más del 95 % por peso de polipéptido como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente más del 99 % por peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos restos del extremo N o secuencia de aminoácidos internos mediante el uso de un secuenciador de copa de centrífuga, o (3) hasta la homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando una tinción con azul de Coomassie o, preferentemente con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* en células recombinantes ya que al menos no estará presente un componente del ambiente natural del polipéptido. Habitualmente, sin embargo, un polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Las notaciones "mpk", "mg/kg", o "mg por kg" se refiere a miligramos por kilogramo. Todas las notaciones se utilizan de manera intercambiable a lo largo de la presente divulgación.

- 40 La "semivida" de una secuencia de aminoácidos o compuesto se puede definir en general como el tiempo que cuesta que la concentración en el suero del polipéptido se reduzca un 50 %, *in vivo*, por ejemplo, debido a degradación de la secuencia o compuesto y/o aclaramiento o secuestro de la secuencia o compuesto por mecanismos naturales. La semivida se puede determinar de cualquier manera conocida per se, tal como por análisis farmacocinéticos. Las técnicas adecuadas estarán claras para el experto en la técnica, y pueden, por ejemplo, implicar en general las etapas de administración adecuadamente al primate una dosis adecuada de la secuencia de aminoácidos o compuesto de la invención; recolectar muestras de sangre u otro compuesto de la invención en dicha muestra de sangre; y calcular, a partir de (un gráfico de) los datos obtenidos de esta manera, el tiempo hasta que el nivel o concentración de la secuencia de aminoácidos o compuesto de la invención se ha reducido al 50 % en comparación con el nivel inicial a la dosificación. Se puede hacer referencia, por ejemplo, a los libros convencionales, tales como Kenneth, A. et al, Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists y en Peters et al, Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach (1996). También se hace referencia a Gibaldi, M. et al, Pharmacokinetics, 2ª Edición Rev., Marcel Dekker (1982).

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

60 Resumen

- La presente solicitud proporciona Adnectinas contra la PCSK9 humana. Con el fin de identificar los antagonistas específicos de PCSK9, se presentó la PCSK9 a grandes bibliotecas sintéticas de Adnectinas. Las Adnectinas que se unían a PCSK9 se exploraban por la unión a PCSK9, por las propiedades biofísicas, y por la actividad inhibidora. Las Adnectinas anti-PCSK9 se mutaron y se sometieron a una presión selectiva adicional disminuyendo la concentración de la diana y seleccionando las Adnectinas PCSK9 con menor velocidad de disociación. A partir de

este procedimiento de optimización, se identificó una familia de Adnectinas como inhibidores específicos de PCSK9 con propiedades bioquímicas y biofísicas favorables.

Armazones basados en fibronectina

Un aspecto de la solicitud proporciona polipéptidos que comprenden el dominio Fn3 en el que uno o más de los bucles accesibles a los disolventes se han aleatorizado o mutado. El dominio Fn3 es un dominio Fn3 derivados del décimo módulo tipo silvestre del dominio tipo III de fibronectina humana (¹⁰Fn3): VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDA PAVTVRYRITYGETGGNSPVOEFTVPGSKS TATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 1). En la secuencia de ¹⁰Fn3, los bucles BC, DE y FG están subrayados.

Como se describe en el presente documento, las secuencias de unión no ligando de ¹⁰Fn3, es decir, el “armazón ¹⁰Fn3”, se puede alterar a condición de que el ¹⁰Fn3 mantenga la función de unión al ligando y/o la estabilidad estructural. Se ha informado de varios armazones ¹⁰Fn3 mutantes. En un aspecto, se sustituye uno o más de Asp 7, Glu 9, y Asp 23 por otro aminoácido, tal como, por ejemplo, un resto de aminoácido no cargado negativamente (por ejemplo, Asn, Lys, etc.). Se ha informado de que estas mutaciones tienen el efecto de promover una mayor estabilidad del ¹⁰Fn3 mutante al pH neutral en comparación con la forma de tipo silvestre (Véase, Publicación PCT N.º WO 02/04523). Se ha desvelado varias alteraciones adicionales en el armazón ¹⁰Fn3 que son beneficiosos o neutros. Véase, por ejemplo, Batori et al, Protein Eng., 15(12):1015-1020 (Dic. 2002); Koide et al, Biochemistry, 40(34): 10326-10333 (28 de ago de 2001).

Las proteínas ¹⁰Fn3 tanto variantes como de tipo silvestre se caracterizan por la misma estructura, a saber, siete secuencias de dominio de cadena beta denominadas A a G y seis regiones de bucle (bucle AB, bucle BC, bucle CD, bucle DE, bucle EF, y bucle FG) que conectan las siete secuencia de dominio de cadena beta. Las cadenas beta que se posicionan más cerca de los extremos N y C pueden adoptar una conformación tipo beta en solución. En la SEQ ID NO: 1, el bucle AB se corresponde con los restos 15-16, el bucle BC se corresponde con los restos 21-30, el bucle CD se corresponde con los restos 39-45, el bucle DE se corresponde con los restos 51-56, el bucle EF se corresponde con los restos 60-66, y el bucle FG se corresponde con los restos 76-87 (Xu et al, Chemistry & Biology, 9:933-942 (2002)).

En algunas realizaciones, el polipéptido ¹⁰Fn3 puede ser al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, o 90 % idéntico al dominio ¹⁰Fn3 humano, que se muestra en la SEQ ID NO: 1. La mayoría de la variabilidad se producirá en general en uno o más de los bucles. Cada una de las cadenas beta o tipo beta de un polipéptido ¹⁰Fn3 puede consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es la menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a la secuencia de una cadena beta o tipo beta correspondiente de la SEQ ID NO: 1, a condición de que dicha variación no altere la estabilidad del polipéptido en condiciones fisiológicas.

La divulgación proporciona polipéptidos que comprende un décimo dominio de fibronectina tipo III (¹⁰Fn3), en el que el dominio ¹⁰Fn3 comprende un bucle AB; un bucle CD; un bucle DE; un bucle EF; y un bucle FG; y tiene al menos un bucle seleccionado de entre el bucle BC, DE, y FG con una secuencia de aminoácidos alterada con respecto a la secuencia del bucle correspondiente del dominio ¹⁰Fn3 humano. En algunas realizaciones, los bucles BC y FG están alterados, y en algunas realizaciones, los bucles BC, DE, y FG están alterados, es decir, los dominios Fn3 comprenden bucles de origen no natural. En algunas realizaciones, los bucles AB, CD y/o EF están alterados. “Alterado” significa una o más alteraciones de secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia matriz (correspondiente al dominio de fibronectina humana) e incluye adiciones, eliminaciones, y sustituciones de aminoácidos. Al alteración de una secuencia de aminoácidos se puede conseguir mediante variación de secuencia oculta, o espontánea, generalmente de un ácido nucleico que codifica la secuencia, y puede producirse por cualquier técnica, por ejemplo, PCR, PCR tendente a error, o síntesis química de ADN.

En algunas realizaciones, se puede extender o acortar la longitud de uno o más de los bucles seleccionados de entre BC, DE, y FG con respecto al bucle de fibronectina humana correspondiente. En algunas realizaciones, la longitud del bucle se puede extender en 2-25 aminoácidos. En algunas realizaciones, la longitud del bucle puede disminuir en 1-11 aminoácidos. Para optimizar la unión al antígeno, por lo tanto, se puede alterar un bucle de ¹⁰Fn3 en longitud así como en secuencia para obtener la mayor flexibilidad y afinidad posible en la unión con el antígeno.

En algunas realizaciones, el polipéptido comprende un dominio Fn3 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 100 % a las regiones no bucle de la SEQ ID NO: 1, en el que al menos un bucle seleccionad de entre BD, DE, y FG está alterado. En algunas realizaciones, el bucle BC alterado tiene hasta 10 sustituciones de aminoácidos, hasta 4 eliminaciones de aminoácidos, hasta 10 inserciones de aminoácidos, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el bucle DE alterado tiene hasta 6 sustituciones de aminoácidos, hasta 4 eliminaciones de aminoácidos, hasta 13 inserciones de aminoácidos o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el bucle FG tiene hasta 12 sustituciones de aminoácidos, hasta 11 eliminaciones de aminoácidos, hasta 25 inserciones de aminoácidos o una combinación de las mismas.

Como se ha descrito anteriormente, los aminoácidos correspondientes a los restos 21-30, 51-56, y 76-87 de la SEQ ID NO: 1 definen los bucles BC, DE, y FG, respectivamente. Sin embargo, se debería entender que no es necesario

que cada resto de la región del bucle se modifique con el fin de conseguir un enlazador ¹⁰F_n3 que tenga una alta afinidad por una diana deseada (por ejemplo, PCSK9).

5 Por ejemplo, los restos 21 (S) y 22 (W) del bucle BC como se muestran en la SEQ ID NO: 1 no necesitan modificarse para la unión con PCSK9. Es decir, los dominios ¹⁰F_n3 con alta afinidad de unión por PCSK9 se pueden obtener modificando solo los restos 23-30 del bucle BC como se muestra en la SEQ ID NO: 1. Esto se demostró en los bucles BC ejemplificados en la Tabla 3, que indica que solo se alteraron los restos que abarcan las posiciones sombreadas. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un bucle BC de acuerdo con esta denominación comprende la parte sombreada de cualquiera de las SEQ ID NO: 2-17, 106-135 y 301-303 como se muestra en la Tabla 3. Por
10 ejemplo, en una realización, un bucle BC puede comprender la secuencia PPPSHGYG (restos 3-10 de SEQ ID NO: 2), DAPAHAYG (restos 3-10 de la SEQ ID NO: 5), EPFSRLPGGGE (restos 3-13 de la SEQ ID NO: 106), o DAPADGGYG (restos 3-11 de la SEQ ID NO: 107).

15 De manera similar, las posiciones 51 (P) y 56 (T) del bucle DE como se muestran en la SEQ ID NO: 1 no necesitan modificarse para unirse a PCSK9. Es decir, los dominios ¹⁰F_n3 con alta afinidad de unión por PCSK9 se pueden obtener modificando solo los restos 52-55 del bucle DE como se muestra en la SEQ ID NO: 1. Esto se demostró en los bucles ejemplificados en la Tabla 3 que indica que solo se alteraron los restos que abarcan las posiciones sombreadas. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un bucle DE de acuerdo con esta denominación comprende la parte sombreada de una cualquiera de las SEQ ID NO: 18-27 y 136-141, como se muestra en la Tabla 3. Por
20 ejemplo, en una realización, el bucle DE puede comprender la secuencia PGKG (restos 2-5 de la SEQ ID NO: 18), VGVG (restos 2-5 de la SEQ ID NO: 27), o VSKS (restos 2-5 de la SEQ ID NO: 137).

Al igual, la posición 87 (P) del bucle FG como se muestra en la SEQ ID NO: 1 no necesita modificarse para la unión con PCSK9. Es decir, los dominios ¹⁰F_n3 con alta afinidad de unión por PCSK9 se puede obtener modificando solo
25 los restos 76-86 del bucle FG como se muestra en la SEQ ID NO: 1. Esto se demostró en los bucles FG ejemplificados en la Tabla 3, que indica que solo se alteraron los restos que abarcan las posiciones sombreadas. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un bucle FG de acuerdo con esta denominación comprende la parte sombreada de una cualquiera de las SEQ ID NO: 28-38 y 142-172, como se muestra en la Tabla 3. Por ejemplo, en una realización, un bucle FG puede comprender la secuencia EYPYKHSGYYHR (restos 1-12 en la SEQ ID NO: 28),
30 EYPYDYSYYHR (restos 1-12 en la SEQ ID NO: 142), o EFDVFGAGYYHR (restos 1-12 en la SEQ ID NO: 167).

En algunas realizaciones, la presente solicitud demuestra que las regiones de bucle BC, DE, y FG puede describirse en general de acuerdo con secuencias de consenso. Por ejemplo, el bucle BC se puede definir en general por la secuencia de consenso SW(X₁)_ZX₂G (SEQ ID NO: 323) donde X₁ es cualquier aminoácido, Z es un número del 6-9, y X₂ es Y o H. Esta secuencia de consenso se ejemplifica por los bucles BC en la Tabla 3 excepto para el bucle BC
35 definido por la SEQ ID NO: 106. En otras realizaciones, Z es un número seleccionado de entre 2-5. En ciertas realizaciones, Z es un número seleccionado de entre 10-15. En algunas realizaciones X₂ es cualquier resto aromático (es decir, Y, F, W, o H).

40 En otra realización, el bucle DE puede definirse en general por la secuencia de consenso PX₁X₁X₁X₃T, (SEQ ID NO: 324) donde X₁ es cualquier aminoácido y X₃ es G o S. Esta secuencia de consenso se ejemplifica por los bucles DE se muestran en la Tabla 3.

45 En otra realización, el bucle FG se puede definir en general por la secuencia de consenso EX₄X₁X₅X₁X₆GYX₄HRP (SEQ ID NO: 325), donde X₁ es cualquier aminoácido; X₄ es Y o F; X₅ es Y, F, o W; y X₆ es S o A. Esta secuencia de consenso se ejemplifica por los bucles FG que se muestran en la Tabla 3.

En consecuencia, en ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona una Adnectina de unión a PCSK9 que comprende un bucle BC que tiene la secuencia SW(X₁)_ZX₂G (SEQ ID NO: 323), un bucle DE que tiene la secuencia PX₁X₁X₁X₃T, (SEQ ID NO: 324), y un bucle FG que tiene la secuencia EX₄X₁X₅X₁X₆GYX₄HRP (SEQ ID NO: 325), como se ha definido anteriormente.
50

En otra realización, la presente divulgación proporciona una Adnectina de unión a PCSK9 que comprende un bucle BC que tiene la secuencia SWEFSLPGLGGGE (SEQ ID NO: 106), un bucle DE que tiene la secuencia PX₁X₁X₁X₃T, (SEQ ID NO: 324), y un bucle FG que tiene la secuencia EX₄X₁X₅X₁X₆GYX₄HRP (SEQ ID NO: 325), como se ha definido anteriormente.
55

En ciertas realizaciones, un bucle BC puede definirse en general por la secuencia de consenso (X₁)_ZX₂G (SEQ ID NO: 449) donde X₁ es cualquier aminoácido, Z es un número del 6-9, y X₂ es Y o H. Esta secuencia de consenso se ejemplifica por los bucles BC que se muestran en la Tabla 3 excepto el bucle BC definido por la SEQ ID NO: 106. En otras realizaciones, Z es un número seleccionado de entre 2-5. En ciertas realizaciones, Z es un número seleccionado de entre 10-15. En algunas realizaciones X₂ es un resto aromático (por ejemplo, Y, F, W, o H).
60

En ciertas realizaciones, el bucle DE puede definirse en general por la secuencia de consenso X₁X₁X₁X₃, (SEQ ID NO: 450) donde X₁ es cualquier aminoácido y X₃ es G o S. Esta secuencia de consenso se demuestra por los bucles DE que se muestran en la Tabla 3.
65

El bucle FG se define por la secuencia de consenso EX₄X₁X₅X₃ X₁X₆GYX₄HR (SEQ ID NO: 451), donde X₁ es cualquier aminoácido; X₄ es Y o F; X₅ es Y, F, o W; y X₆ es S o A. Esta secuencia de consenso se ejemplifica por los bucles FG que se muestran en la Tabla 3.

5 En consecuencia, en una realización, la presente divulgación proporciona una Adnectina de unión a PCSK9 que tiene un bucle BC que comprende la secuencia (X₁)_zX₂G (SEQ ID NO: 449), un bucle DE que comprende la secuencia X₁X₁X₁X₃, (SEQ ID NO: 450), y un bucle FG que comprende la secuencia EX₄X₁X₅X₃ X₁X₆GYX₄HR (SEQ ID NO: 451), como se ha definido anteriormente.

10 En ciertas realizaciones, las proteínas tipo anticuerpo basadas en el armazón ¹⁰F_n3 se puede definir en general por la siguiente secuencia: EVVAAT(X)_aSLLI(X)_xYYRITYGE(X)_bQEFTV(X)_yATI(X)_cDYTITVYAV(X)_zISINYRT (SEQ ID NO: 328)

15 En la SEQ ID NO: 328, el bucle AB está representado por X_a, el bucle CD está representado por X_b, el bucle EF está representado por X_c, el bucle BC está representado por X_x, el bucle DE está representado por X_y, y el bucle FG está representado por X_z. X representa cualquier aminoácido y el subíndice que sigue a la X representa un entero del número de aminoácidos. En particular, a puede ser cualquiera de entre 1-15, 2-15, 1-10, 2-10, 1-8, 2-8, 1-5, 2-5, 1-4, 2-4, 1-3, 2-3, o 1-2 aminoácidos; y b, c, x, y y z puede ser cada una independientemente cualquiera de entre 2-20, 2-15, 2-10, 2-8, 5-20, 5-15, 5-10, 5-8, 6-20, 6-15, 6-10, 6-8, 2-7, 5-7, o 6-7 aminoácidos. En realizaciones preferidas, a es 2 aminoácidos, b es 7 aminoácidos, c es 7 aminoácidos, x es 9 aminoácidos, y es 6 aminoácidos, y z es 12 aminoácidos. Las secuencias de las cadenas beta pueden tener cualquiera de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, o de 0 a 1 sustituciones, eliminaciones o adiciones a lo largo de las 7 regiones de armazón con respecto a los aminoácidos correspondientes que se muestran en la SEQ ID NO: 1. En una realización a modo de ejemplo, las secuencias de las cadenas beta pueden tener cualquiera de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, o de 0 a 1 sustituciones conservadoras a lo largo de las 7 regiones de armazón con respecto a los aminoácidos correspondientes que se muestran en la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, los restos de aminoácidos centrales son fijos y cualquiera de las sustituciones, sustituciones conservadoras, eliminaciones o adiciones se producen en restos distintos de los restos de aminoácidos centrales.

30 En realizaciones a modo de ejemplo, los bucles BC, DE, y FG que se representan por (X)_x, (X)_y, y (X)_z, respectivamente se remplazan con polipéptidos que comprenden las secuencias de los bucles BC, DE, y FG de cualquiera de los enlazadores de PCSK9 que se muestran en la Tabla 3, o las porciones sombreadas de las mismas o las secuencia de consenso 323-325 o 449-451.

35 En ciertas realizaciones, las proteínas tipo anticuerpo basadas en el armazón ¹⁰F_n3 se puede definir en general por la secuencia:

EVVAATPTSLI(X)_xYYRITYGETGGNSPVQEFTV(X)_yATISGLKPGVDYTITVYAV (X)_zISINYRT (SEQ ID NO: 329)

40 En la SEQ ID NO: 329, el bucle BC está representado por X_x, el bucle DE está representado por X_y, y el bucle FG está representado por X_z. X representa cualquier aminoácido y el subíndice que sigue a la X representa un entero del número de aminoácidos. En particular, x, y y z puede ser independientemente cada uno cualquiera de 2-20, 2-15, 2-10, 2-8, 5-20, 5-15, 5-10, 5-8, 6-20, 6-15, 6-10, 6-8, 2-7, 5-7, o 6-7 aminoácidos. En realizaciones preferidas, x es 9 aminoácidos, y es 6 aminoácidos, y z es 12 aminoácidos. Las secuencias de las cadenas beta pueden tener cualquiera de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, o de 0 a 1 sustituciones, eliminaciones o adiciones a lo largo de las 7 regiones de armazón con respecto a los aminoácidos correspondientes que se muestran en la SEQ ID NO: 1. En una realización a modo de ejemplo, las secuencias de las cadenas beta pueden tener cualquiera de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, o de 0 a 1 sustituciones conservadoras a lo largo de las 7 regiones de armazón con respecto a los aminoácidos correspondientes que se muestran en la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, los restos de aminoácidos centrales están fijos y cualquiera de las sustituciones, sustituciones conservadoras, eliminaciones y adiciones se producen en los restos distintos de los restos de aminoácidos centrales. En realizaciones a modo de ejemplo, los bucles BC, DE, y FG se representan por (X)_x, (X)_y, y (X)_z, respectivamente, se remplazan con polipéptidos que comprenden las secuencias de bucle BC, DE y FG de cualquiera de los enlazadores de PCSK9 que se muestran en la Tabla 3, o las partes sombreadas de las mismas, o las secuencias de consenso 323-325 o 449-451.

En ciertas realizaciones, una Adnectina anti-PCSK9 descrita en el presente documento puede comprender la secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 328 o 329, en la que los bucles BC, DE, y FG se representan por (X)_x, (X)_y, y (X)_z, respectivamente se remplazan con un conjunto de bucles BC, DE, y FG especificados de cualquiera de los clones de la Tabla 3, o secuencias al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % idénticas las secuencia de los bucles BC, DE, y FG de los clones enumerados en la Tabla 3. En realizaciones a modo de ejemplo, una Adnectina anti-PCSK9 como se describe en el presente documento se define por la SEQ ID NO: 329 y tiene un conjunto de secuencias de bules BC, DE, y FG respectivos de cualquiera de los clones enumerados en la Tabla 3. Por ejemplo, el clon 1459D05 de la Tabla 3 comprende los bucles BC, DE, y FG que se exponen en las SEQ ID NO: 2, 18 y 28, respectivamente. Por lo tanto, una Adnectina anti-PCSK9 basada en estos bucles puede comprender la SEQ ID NO: 328 o 329, en la que (X)_x comprende la SEQ ID NO: 2, (X)_y comprende la SEQ ID NO:

18, y (X)_z comprende la SEQ ID NO: 28. Se contemplan construcciones similares que utilizan el conjunto de bucles BC, DE, y FG de los otros clones de la Tabla 3, o las secuencias de consenso 323-325 o 449-451. Las regiones de armazón de dicha Adnectina anti-PCSK9 puede comprender cualquiera de 0 a 20, de 0 a 15, de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, o de 0 a 1 sustituciones, sustituciones conservadoras, eliminaciones o adiciones con respecto a los restos de aminoácidos de armazón de la SEQ ID NO: 1. Dichas modificaciones en el armazón se pueden hacer, a condición de que la Adnectina anti-PCSK9 sea capaz de unirse a la PCSK9 con una K_D deseada.

En algunas realizaciones, el bucle BC de la proteína de la invención o comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SWPPPSHGYG (SEQ ID NO: 2), SWRPPIHAYG (SEQ ID NO: 3), SWDAPIHAYG (SEQ ID NO: 4), SWDAPAHAYG (SEQ ID NO: 5) y SWDAPAVTYG (SEQ ID NO: 6), SWSPANGYG (SEQ ID NO: 7), SWTPPPKGYG (SEQ ID NO: 8), SWRPPSHAYG (SEQ ID NO: 9), SWDPPSHAYG (SEQ ID NO: 10), SWEPPSHAYG (SEQ ID NO: 11), SWSPPSHAYG (SEQ ID NO: 12), SWRPPSNGHG (SEQ ID NO: 13), SWVPPSDDYG (SEQ ID NO: 14), SWVPSSHAYG (SEQ ID NO: 15), SWDPSSHAYG (SEQ ID NO: 16), y SWEPSSHAYG (SEQ ID NO: 17). En realizaciones adicionales, el bucle BC de la proteína de la invención comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 106-135 y 301-303. En otras realizaciones, el bucle BC de la proteína de la invención comprende la parte sombreada de una cualquiera de las SEQ ID NO: 2-17, 106-135, y 301-303 como se muestra en la Tabla 3. Por ejemplo, en una realización el bucle BC comprende la secuencia PPPSHGYG (restos 3-10 de la SEQ ID NO: 2), DAPAHAYG (restos 3-10 de la SEQ ID NO: 5), EPFSRLPGGGE (restos 3-13 de la SEQ ID NO: 106), o DAPADGGYG (restos 3-11 de la SEQ ID NO: 107).

En algunas realizaciones, el bucle DE de la proteína de la invención comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en PPGKGT (SEQ ID NO: 18), PIVEGT (SEQ ID NO: 19), PGSEGT (SEQ ID NO: 20), PGSKGT (SEQ ID NO: 21), PGSKST (SEQ ID NO: 22), PVGRGT (SEQ ID NO: 23), PVGEGT (SEQ ID NO: 24), PIGKGT (SEQ ID NO: 25), PVNEGT (SEQ ID NO: 26), y PVGVGT (SEQ ID NO: 27). En realizaciones adicionales, el bucle DE de la proteína de la invención comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 136-141. En otras realizaciones, el bucle DE de la proteína de la invención comprende la parte sombreada de una cualquiera de las SEQ ID NO: 18-27 y 136-141 como se muestra en la Tabla 3. Por ejemplo, en una realización, un bucle DE comprende la secuencia PGKG (restos 2-5 de la SEQ ID NO: 18), VGVG (restos 2-5 SEQ ID NO: 27), o VSKS (restos 2-5 de la SEQ ID NO: 137).

En algunas realizaciones el bucle FG de la proteína de la invención comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en EYPYKHSGYYHRP (SEQ ID NO: 28), EYTFKHSGYYHRP (SEQ ID NO: 29), EYTYKSGYYHRP (SEQ ID NO: 30), EYTYNGAGYYHRP (SEQ ID NO: 31), EYTYIGAGYYHRP (SEQ ID NO: 32), EYTYEGAGYYHRP (SEQ ID NO: 33), EYAYNGAGYYHRP (SEQ ID NO: 34), EYPWKSGYYHRP (SEQ ID NO: 35), EFPFKWSGYYHRP (SEQ ID NO: 36), EFPWPHAGYYHRP (SEQ ID NO: 37) y EYAFEGAGYYHRP (SEQ ID NO: 38). En realizaciones adicionales, el bucle FG de la proteína de la invención comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 142-172. En otras realizaciones, el bucle FG de la proteína de la invención comprende la parte sombreada de una cualquiera de las SEQ ID NO: 28-38 y 142-172 como se muestra en la Tabla 3. Por ejemplo, en una realización, un bucle FG comprende la secuencia EYPYKHSGYYHR (restos 1-12 de la SEQ ID NO: 28), EYPYDYSYYHR (restos 1-12 de la SEQ ID NO: 142), o EFDFVGAGYYHR (restos 1-12 de la SEQ ID NO: 167).

En algunas realizaciones, la proteína de la invención comprende una secuencia de bucle BC seleccionada de entre las secuencias de bucle BC que tiene las SEQ ID NO: 2-17, 106-135, y 301-303, o la parte sombreada de una cualquiera de las SEQ ID NO: 2-17, 106-135, y 301-303, como se muestran en la Tabla 3; una secuencia del bucle DE seleccionada de entre las secuencias de bucle DE que tienen las SEQ ID NO: 18-27 y 136-141, como se muestran en la Tabla 3; y una secuencia del bucle FG seleccionada de las secuencias de bucle FG que tiene las SEQ ID NO: 28-38 y 142-172, o la parte sombreada de una cualquiera de las SEQ ID NO: 28-38 y 142-172 como se muestra en la Tabla 3. En algunas realizaciones, la proteína de la invención comprende una secuencia de aminoácidos de los bucles BC, DE, y FG al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 100 % idéntica a la de una cualquiera de las SEQ ID NO: 2-38, 106-172, 301-303. En otras realizaciones, la proteína de la invención comprende una secuencia de aminoácidos de bucles BC, DE y FG al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 100 % idéntica a la parte sombreada de una cualquiera de las SEQ ID NO: 2-38, 106-172, 301-303 como se muestra en la Tabla 3.

En algunas realizaciones, la Adnectina anti-PCSK9 comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 39-76, 173-290, y 304-309. En algunas realizaciones, la Adnectina anti-PCSK9 comprende la secuencia de aminoácidos del dominio Fn3 desde la posición 3-96 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 39-76, 173-290, y 304-309. En algunas realizaciones, la Adnectina anti-PCSK9 comprende una secuencia de aminoácidos la menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 100 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 39-76, 173-290, y 304-309.

La fibronectina se une naturalmente a ciertos tipos de integrinas mediante su motivo de unión a la integrina, "arginina-glicina-ácido aspártico" (RGD). En algunas realizaciones, el polipéptido comprende un dominio ¹⁰Fn3 que carece del motivo de unión a la integrina (RGD). El dominio de unión a la integrina se puede eliminar alterando la

secuencia RGD mediante sustitución, eliminación o inserción de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, las moléculas de Adnectina anti-PCSK9 de la presente invención se pueden modificar para comprender una secuencia de extensión del extremo N y/o extensión del extremo C. Por ejemplo, se puede colocar una secuencia MG en el extremo N del ¹⁰Fn3 definido por la SEQ ID NO: 1. La M habitualmente se escindirá dejando un G en el extremo N. De manera alternativa, los primeros 10 aminoácidos de las Adnectinas anti-PCSK9 que se muestran en la Tabla 4 se pueden remplazar con una secuencia del extremo N alternativa, a las que se hace referencia como extensiones del extremo N, como se muestra en la Tabla 6 (es decir, las SEQ ID NO: 371-379). Además, también se pueden colocar una M, G o MG en el extremo N para cualquiera de las extensiones del extremo N que tiene las SEQ ID NO: 371-379. Las Adnectinas anti-PCSK9 descritas en el presente documento pueden comprender también secuencias de cola del extremo C alternativas, a las que se hace referencia en el presente documento como secuencias de extensión del extremo C. Por ejemplo, las secuencias de Adnectina anti-PCSK9 de la Tabla 4 pueden estar truncadas en la treonina correspondiente a T94 de la SEQ ID NO: 1 (es decir, truncadas después de la parte de la secuencia INYRT (SEQ ID NO: 636)). Dicha versión truncada se puede utilizar como moléculas terapéuticas en forma truncada, o se pueden añadir extensiones alternativas del extremo C después del resto de treonina. Se muestran secuencias de extensión del extremo C a modo de ejemplo en la Tabla 6 como las SEQ ID NO: 380-395. Las Adnectinas anti-PCSK9 a modo de ejemplo que comprende las secuencias de extensión del extremo C se muestran en la Tabla 4. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 49 (clon 1813E02) comprende la extensión del extremo C de origen natural EIDKPSQ (SEQ ID NO: 380) seguido por un marcador His6 (SEQ ID NO: 637). Sin embargo, se debería entender que el marcador His6 es completamente opcional.

En ciertas realizaciones, las secuencias de extensión del extremo C (también llamadas “colas”), comprenden los restos E y D, y pueden estar entre 8 y 50, 10 y 30, 10 y 20, y 10 y 2 y 4 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, las secuencias de cola incluyen enlazadores basados en ED en la que la secuencia comprende repeticiones en tándem de ED. En realizaciones a modo de ejemplo, la secuencia de cola comprende 2-10, 2-7, 2-5, 3-10, 3-7, 3-5, 3, 4 o 5 repeticiones de ED. En ciertas realizaciones, las secuencias de cola basadas en ED pueden incluir también restos de aminoácidos adicionales, tales como, por ejemplo: EI (SEQ ID NO: 385), EID, ES, EC, EGS, y EGC. Dichas secuencias se basan, en parte, en secuencias de cola de Adnectina conocidas, tales como EIDKPSQ (SEQ ID NO: 380), en la que los restos D y K se han eliminado. En realizaciones a modo de ejemplo, la cola basada en ED comprende los restos E, I o EI (SEQ ID NO: 385) antes de las repeticiones ED.

En otras realizaciones, las secuencias del extremo N o C se pueden combinar con otras secuencias enlazadoras conocidas (por ejemplo, SEQ ID NO: 396-419 de la Tabla 6) según sea necesario cuando se diseñe la molécula de fusión de la Adnectina anti-PCSK9. La Adnectina anti-PCSK9 a modo de ejemplo que comprende secuencias enlazadoras se muestran en la Tabla 4 (por ejemplo, las SEQ ID NO: 53, 55, y 57). En algunas realizaciones, las secuencias se pueden colocar en el extremo C del dominio ¹⁰Fn3 para facilitar la unión de un resto farmacocinéticos. Por ejemplo, se puede añadir un enlazador que contenga cisteína tal como GSGC (SEQ ID NO: 77) al extremo C para facilitar la PEGilación dirigida al sitio sobre el resto de cisteína.

Restos farmacocinéticos

En un aspecto, la solicitud proporciona Adnectinas anti-PCSK9 que comprenden adicionalmente un resto farmacocinético (PK). Se pueden evaluar farmacocinética mejorada de acuerdo con la necesidad terapéutica percibida. A menudo es deseable aumentar la biodisponibilidad y/o aumenta el tiempo entre dosis, posiblemente aumentando el tiempo en el que una proteína se mantiene disponible en el suero después de la dosificación. En algunas realizaciones, es deseable mejorar la continuidad de la concentración de suero de la proteína durante un tiempo (por ejemplo, disminuye la diferencia de la concentración del suero de la proteína poco después de la administración y poco antes de la próxima administración). La Adnectina anti-PCSK9 se puede unir a un resto que reduzca la velocidad de aclaramiento del polipéptido en un mamífero (por ejemplo, un ratón, rata o ser humano) más de tres veces con respecto a la Adnectina anti-PCSK9 no modificada. Otras medidas para mejorar la farmacocinética pueden incluir la semivida sérica, que se divide a menudo en la fase alfa y la fase beta. Se pueden mejorar cualquiera o ambas fases por la adición de un resto apropiado.

Se hace referencia a los restos que tienden a enlentecer el aclaramiento de una proteína de la sangre, como “restos PK” incluyendo restos de polioxialquileño, por ejemplo, polietilenglicol, azúcares (por ejemplo, ácido siálico), y restos proteicos bien tolerados (por ejemplo, Fc y fragmentos y variantes de los mismos, transferrina o seroalbúmina). La Adnectina anti-PCSK9 se puede fusionar a la albúmina o un fragmento (parte) o variante de albúmina descrita en la Publicación de EE. UU. N.º 2007/0048282. En algunas realizaciones, la Adnectina PCSK9 se puede fusionar con una o más Adnectinas que se unen a la seroalbúmina, como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, el resto PK es una proteína que se une a la seroalbúmina tal como los que se describen en la Publicaciones de EE. UU. N.º 2007/0178082 y 2007/0269422.

En algunas realizaciones, el resto PK es una proteína de unión a inmunoglobulina sérica tal como las que se describen en la Publicación de EE. UU. N.º 2007/0178082.

En algunas realizaciones, la Adnectina anti-PCSK9 comprende polietilenglicol (PEG). Se pueden unir una o más

moléculas de PEG en diferentes posiciones de la proteína, y dicha unión se puede conseguir por reacción con aminas, tioles u otros grupos reactivos adecuados. El resto amina puede ser, por ejemplo, una amina primaria que se encuentra en el extremo N de un polipéptido o un grupo amino presente en un aminoácido, tal como lisina o arginina. En algunas realizaciones, el resto PEG se une en una posición del polipéptido seleccionado de entre el grupo que consiste de: a) el extremo N; b) entre el extremo N y la cadena beta o cadena tipo beta más hacia el extremo N; c) un bucle posicionado enfrente del polipéptido opuesto al sitio de unión a la diana; d) entre el extremo C y la cadena beta o cadena tipo beta más hacia el extremo C; y e) el extremo C.

La pegilación se puede conseguir por pegilación dirigida al sitio, en la que un grupo reactivo adecuado se introduce en la proteína para crear un sitio donde se produce preferentemente la pegilación. En algunas realizaciones, la proteína se modifica para introducir un resto de cisteína en una posición deseada, permitiendo la pegilación dirigida al sitio sobre la cisteína. El PEG puede variar ampliamente de peso molecular y puede ser ramificado o lineal. En una realización el PEG tiene dos ramas. En otra realización, el PEG tiene cuatro ramas.

En algunas realizaciones, la Adnectina anti-PCSK9 se fusiona con un dominio Fc de inmunoglobulina, o un fragmento o variante de del mismo. En una realización a modo de ejemplo, el dominio Fc se deriva de una subclase de IgG1, sin embargo, también se pueden utilizar otras subclases (por ejemplo, IgG2, IgG3 e IgG4). Se muestra a continuación la secuencia de un dominio FC de inmunoglobulina IgG1 humana, y la posición relativa de cada región en el dominio Fc se indican basándose en el formato de numeración EU:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK_DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
SGLYSLSSTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPK_DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 315)

La secuencia bisagra central está subrayada y la región CH1 está en cursiva; las regiones CH2 y CH3 están en texto normal. Se debería entender que la lisina del extremo C es opcional.

La de fusión se puede formar uniendo una Adnectina anti-PCSK9 a cualquier extremo de la molécula Fc, es decir, las disposiciones Fc-Adnectina anti-PCSK9 o Adnectina anti-PCSK9-Fc. En ciertas realizaciones, el Fc y la Adnectina anti-PCSK9 se fusionan mediante un enlazador. Las secuencias de enlazador a modo de ejemplo incluyen AGGGGSG (SEQ ID NO: 310), GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 311), QPDEPGGS (SEQ ID NO: 312), ELQLEESAAEAQDGELD (SEQ ID NO: 313), TVAAPS (SEQ ID NO: 314), KAGGGGSG (SEQ ID NO: 620), KGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 621), KQPDEPGGS (SEQ ID NO: 622), KELQLEESAAEAQDGELD (SEQ ID NO: 623), KTVAAPS (SEQ ID NO: 624), KAGGGGSGG (SEQ ID NO: 625), KGSGSGSGSGSGSG (SEQ ID NO: 626), KQPDEPGGSG (SEQ ID NO: 627), KELQLEESAAEAQDGELDG (SEQ ID NO: 628), KTVAAPSG (SEQ ID NO: 629), AGGGGSGG (SEQ ID NO: 630), GSGSGSGSGSGSG (SEQ ID NO: 631), QPDEPGGSG (SEQ ID NO: 632), ELQLEESAAEAQDGELDG (SEQ ID NO: 633), y TVAAPSG (SEQ ID NO: 634).

En algunas realizaciones, la región Fc utilizada en la de fusión con Adnectina anti-PCSK9 comprende la región bisagra de una molécula Fc. Como se utiliza en el presente documento, la región "bisagra" comprende los restos de bisagra centrales que abarcan las posiciones 104-119 de la SEQ ID NO: 315 (DKTHTCPPCPAPELLG; SEQ ID NO: 316) de IgG1, que corresponde a las posiciones 221-236 de acuerdo con la numeración EU. En ciertas realizaciones, la de fusión Adnectina anti-PCSK9-Fc adopta una estructura multimérica (por ejemplo, un dímero) debido, en parte a los restos de cisteína 109 y 112 de la SEQ ID NO: 315 (numeración EU 226 y 229, respectivamente) en la región bisagra. En otras realizaciones, la región bisagra como se utiliza en el presente documento puede incluir adicionalmente restos derivados de la región CH1 y CH2 que flanquean la secuencia central de bisagra, como se muestra en la SEQ ID NO: 315.

En algunas realizaciones, la secuencia bisagra puede incluir sustituciones que confieren propiedades farmacocinéticas, biofísicas y/o biológicas deseables. Algunas secuencias bisagra a modo de ejemplo incluyen EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO: 317; región central de bisagra de Subrayada), EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 318; región central de bisagra de Subrayada), EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 319; región central de bisagra de Subrayada), DKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO: 320; región central de bisagra de Subrayada), y DKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 321; región central de bisagra de Subrayada). En una realización, el resto P de la posición 122 (numeración EU 238) de la SEQ ID NO: 315 se ha remplazado por S para abolir la función efectora de Fc; esta sustitución se ejemplifica en las bisagras que tienen una cualquiera de las SEQ ID NO: 318, 319, y 321. En otra realización, los restos DK en las posiciones 104-105 de la SEQ ID NO: 315 (numeración EU 221-222) se han remplazado por GS para eliminar un sitio clip potencial; esta sustitución se ejemplifica en la SEQ ID NO: 319. En otra realización la C en la posición 103 de la SEQ ID NO: 315 (numeración EU 220) se ha sustituido por S para evitar una formación inapropiada del enlace de cisteína en ausencia de cadena ligera; esta sustitución se ejemplifica en las SEQ ID NO: 317-319.

En ciertas realizaciones, una de fusión Adnectina PCSK9-Fc puede tener las siguientes configuraciones; 1) Adnectina PCSK9-bisagra-Fc o 2) bisagra-Fc- Adnectina PCSK9. Por lo tanto, cualquier Adnectina PCSK9 de la presente invención se puede fusionar a una región-Fc que comprende una secuencia bisagra de acuerdo con estas configuraciones. En algunas realizaciones se puede utilizar un enlazador para unir la Adnectina PCSK9 al resto bisagra-Fc, por ejemplo, una proteína de fusión a modo de ejemplo puede tener la configuración bisagra-Adnectina PCSK9-enlazador-Fc. Adicionalmente, dependiendo del sistema en el que se produce un polipéptido de fusión, se puede colocar una secuencia líder en el extremo N del polipéptido de fusión. Por ejemplo, si la de fusión se produce en un sistema de mamífero, se puede añadir una secuencia líder tal como METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 326) al extremo N de la molécula de fusión. Si la de fusión se produce en *E. coli*, la secuencia de fusión estará precedida por una metionina.

La siguiente secuencia ejemplifica una construcción Adnectina PCSK9-bisagra-Fc producida en un sistema de mamífero:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVPPSDDYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGK GTATISGLKPGVDYTITVYAVEFPWPHAGYYHRPISINYRTEIEPKSSGSTHTCPCPAPELLGGSSVFLFPPKPK_DT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVFTNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 322). Aquí, el dominio Fc humano comprende las regiones CH2 y CH3 de IgG1 de la siguiente manera: VFLFPPKPK_DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVFTNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALFTNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 448) y la secuencia de bisagra de la SEQ ID NO: 319. En la SEQ ID NO: 322, la secuencia líder está en negrita, la secuencia de Adnectina anti-PCSK9 está en cursiva, y la región bisagra está subrayada. Se debería entender que la lisina en el extremo de la SEQ ID NO: 322 es opcional. La eficacia del polipéptido de fusión como se expone en la SEQ ID NO: 322 (también descrito en el presente documento como PRD460) se demuestra en el Ejemplo 4.

Las fusiones de Adnectina PCSK9-Fc a modo de ejemplo se muestran en la Tabla 1. Todas las secuencias pueden comenzar con una metionina o una secuencia líder de mamífero (por ejemplo, la SEQ ID NO: 326).

Tabla 1. Proteínas de fusión Adnectina anti-PCSK9-Fc a modo de ejemplo

SEQ ID	Clon o Nombre	Descripción	Secuencia
Fusiones PCSK9 Adnectina-X₁-Fc en el extremo C			
452	1459D05-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente puede seleccionarse de entre E, EI, EID, EIDK, (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se seleccionan de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321, El Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWPPPSHG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPPGKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYPYKHSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV D KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPG
453	1784F03-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWRPPIHA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPIVEGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYTFKHSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV D KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPG

454	1784F03-ml-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPIHA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSEGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYTFKHSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
455	1784F03-m2-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAHA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYTFKHSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
456	1784F03-m3-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAVT YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYTFKHSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
457	1813E02-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWSPPANG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVGRGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYTYKSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
458	1923B02-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWTPPPKG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVGEGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYTYNGAGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK

459	1923B02(N82 I)-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWTTPPKG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVGEGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYTYIGAGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPG
460	1923B02(N82 E)-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWTTPPKG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVGEGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYTYEGAGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPG
461	1923B02(T80 A)-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWTTPPKG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVGEGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYAYNGAGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPG
462	1922G04-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWRPPSHA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYPWKGSYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPG
463	1922G04(R25 D)-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDPPSHA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYPWKGSYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPG

464	1922G04(R25 E)-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWEPPSHA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGT TISGLKPGVDYTITVYAVEYPPWKSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
465	1922G04(R25 S)-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWSPPSHA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGT TISGLKPGVDYTITVYAVEYPPWKSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
466	2012A04-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWRPPSNG HGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVNEGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFPFKWGSYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
467	2013E01-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWVPPSDD YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGT TISGLKPGVDYTITVYAVEFPWPHAGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
468	2011H05-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWVPSSHA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVGVGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYAFEGAGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG

469	2011H05(V23 D)-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDPSSHA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVGVGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYAFEGAGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
470	2011H05(V23 E)-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWEPSSHA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVGVGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYAFEGAGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
471	2381B02-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWEPFSRL PGGGEYYRITYGETGGNSPLQQFTVPGSK GTATISGLKPGVDYTITVYAVEYPYDYS YYHRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
472	2381B04-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWEPFSRL PGGGEYYRITYGETGGNSPLQQFTVPGSK GTATISGLKPGVDYTITVYAVEYPYEHSG YYHRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
473	2381B06-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWEPFSRL PGGGEYYRITYGETGGNSPLQQFTVPGSK GTATISGLKPGVDYTITVYAVEYPYPHSG YYHRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG

474	2381B08-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPADG GYGYRITYGETGGNSPVQFTVPSSKGT ATISGLKPGVDYITIVYAVEYTFPGAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
475	2381D02-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWEPFSRL PGGGEYRITYGETGGNSPLQQFTVPGSK GTATISGLKPGVDYITIVYAVEYPYDHSG YYHRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
476	2381D04-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWEPFSRL PGGGEYRITYGETGGNSPLQQFTVPGSK GTATISGLKPGVDYITIVYAVEFPYDHSG YYHRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
477	2381F11-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPADG GYGYRITYGETGGNSPVQFTVPVSKST ATISGLKPGVDYITIVYAVEYTFPGAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
478	2381G03-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWEPFSRL PGGGEYRITYGETGGNSPLQQFTVPGSK GTATISGLKPGVDYITIVYAVEFPYAHSG YYHRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG

479	2381G09-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAGD GYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGT ATISGLKPGVDYTITVYAVEFTFPAGAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
480	2381H03-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWEPFSRL PGGGEYRITYGETGGNSPLQQFTVPGSK GTATISGLKPGVDYTITVYAVEYPYAHSG YFHRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
481	2382A0 ₁ -Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWAAPAGG GYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGT ATIS GLKPGVDYTITVYAVEYDFPGAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
482	2382B10-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPADA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYDFPGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
483	2382B09-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPADA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFDYPGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG

484	2382C05-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPADG AYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGT ATISGLKPGVDYTITVYAVEYSFPGAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
485	2382C09-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAEG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFDPPGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
486	2382D03-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPADE AYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGT ATISGLKPGVDYTITVYAVEFDPPGAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
487	2382D05-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPADG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGT ATISGLKPGVDYTITVYAVEFDPPGAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
488	2382D08-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPADG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFPFPGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG

489	2382D09-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAEG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFDGPGAGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
490	2382F02-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGT ATISGLKPGVDYTITVYAVEFDGPGSGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
491	2382F03-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAAD AYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGT ATISGLKPGVDYTITVYAVEFNFGAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
492	2382F05-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAEA GKHYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSK GTATISGLKPGVDYTITVYAVEFDGPGAG YYHRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
493	2382F08-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAEA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFTYPGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG

494	2382F09-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAAA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYDFPGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
495	2382G04-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSKGT ATISGLKPGVDYTITVYAVEFDGAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
496	2382H10-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFDGAGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
497	2382H11-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPADG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVFKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFDYPGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
498	2382H04-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSKGT ATISGLKPGVDYTITVYAVEYDFGAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG

499	2382H07-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPADA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFDFFPGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
500	2382H09-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAAA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFDFFPGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
501	2451A02-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAAAG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFFPFGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
502	2451B05-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFDYPGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
503	2451B06-Fc de fusión (equivalente a 2382D05)	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPADG GYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGT ATISGLKPGVDYTITVYAVEFDFFGAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG

504	2451C06-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAGA ASYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKG TATISGLKPGVDYTITVYAVEFPFGAGY YHRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
505	2451D05-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAGA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFDGPGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
506	2451F03-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDPPAEG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFNFGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
507	2451G01-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFDGPGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
508	2451H07-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GITDVPRDLEWAATPTSLISWNPPDVN YGYRITYGETGGNSPLQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYPYAHAGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG

509	2382E03-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAGD GYGYRITYGETGGNSPVQFTVPVSKGT ATISGLKPGVDYITIVYAVEFDGPGAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPG
510	2382E04-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAGG GYGYRITYGETGGNSPVQFTVPVSKGT ATISGLKPGVDYITIVYAVEFTFPGAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPG
511	2382E05-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAE GYGYRITYGETGGNSPVQFTVPVSKGT ATISGLKPGVDYITIVYAVEFDGPGAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPG
512	2382E09-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAEA YGYRITYGETGGNSPVQFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYITIVYAVEYDFPGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPG
513	2381A04-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWEPFSRL PGGGEYRITYGETGGNSPLQQFTVPVSGK GTATISGLKPGVDYITIVYAVEYPYFSG YYHRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPG

514	2381A08-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPADG GYGYYRITYGETGGNSPVQFTVPVSKGT ATISGLKPGVDYITITVYAVEYDFPGAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
515	2381B10-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAGG GYGYYRITYGETGGNSPVQFTVPVSKGT ATISGLKPGVDYITITVYAVEYNFIGAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
516	2381C08-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; the Fc may optionally include a C-terminal K	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPADG AYGYYRITYGETGGNSPVQFTVPVSKGT ATISGLKPGVDYITITVYAVEFPYFAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
517	2381G06-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWSEKLDG KARRGYRITYGETGGNSPVQQFTVPVSKG GTATISGLKPGVDYITITVYAVEFPYDHSG YYHRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
518	2381H01-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWSPRDST GLVRRGYRITYGETGGNSPVQQFTVPVSKG KGATISGLKPGVDYITITVYAVEYPYDHS GYYHRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG

519	2381H06-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWGDVRTN EARQGYRITYGETGGNSPLQGFVPGSK GTATISGLKPGVDYTITVYAVEYTYEHS YYHRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
520	2381H09-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAGG GYGYRITYGETGGNSPVQFTVPVSKGT ATIS GLKPGVDYTITVYAVEFDFVGAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
521	2382B1 ₁ -Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAAA YGYRITYGETGGNSPVQFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYDFAGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
522	2382B08-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPADA YGYRITYGETGGNSPVQFTVPSSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFAFPGAGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
523	2382C1 ₁ -Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAGG YGYRITYGETGGNSPVQFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYDFAGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG

524	2382G03-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAEA EAYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKG TATISGLKPGVDYTITVYAVEYVFPAGAY YHRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
525	2382H03-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAEAG AYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGT ATISGLKPGVDYTITVYAVEYPYFAGYY HRPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
526	2451A10-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVTDVPRDMEWAATPTSLISWQPPAVT YGYRITYGETGGNSTLQFTVPVYKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYPYDHSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
527	2451B02-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAAA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFDYPGSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
528	2451C11-Fc de fusión	X ₁ es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X ₂ se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GIVDVPRDLEWAATPTSLISWDPPAGA YGYRITYGETGGNSPKQQFTVPGYKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYPYDHSGYYH RPISINYRT-X ₁ -X ₂ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK

529	2451H01-Fc de fusión	X1 es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X2 se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPAAG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYDFPGSGYYH RPISINYRT-X1-X2- VFLFPPKPK ₆ TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
530	2011B11-Fc de fusión	X1 es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X2 se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWAPPSDA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYPYSHAGYYH RPISINYRT-X1-X2- VFLFPPKPK ₆ TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
531	2971A03-Fc de fusión	X1 es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X2 se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDPPSDD YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFPWPHAGYYH RPISINYRT-X1-X2- VFLFPPKPK ₆ TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
532	2971A09-Fc de fusión	X1 es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X2 se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPADD YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFPWPHAGYYH RPISINYRT-X1-X2- VFLFPPKPK ₆ TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
533	2971E02-Fc de fusión	X1 es opcional y cuando está presente se puede seleccionar de entre E, EI, EID, EIDK (SEQ ID NO: 384), EIE, y EIEK (SEQ ID NO: 635); X2 se selecciona de entre las secuencias bisagra de SEQ ID NO: 317-321; el Fc puede incluir opcionalmente una K en el extremo C	GVSDVPRDLEWAATPTSLISWDAPSDD YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFPWPHAGYYH RPISINYRT-X1-X2- VFLFPPKPK ₆ TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
Fusiones X1-Fc-X2-Adnectina PCSK9 del extremo N			

534	Fc-1459D05 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWPPPSHG GYRITYGETGGNSPVQEFTVPPGKTAT ISGLKPGVDYITIVYAVEYYPKHSGYYHR PISINYRT-X ₃
535	Fc-1784F03 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWRPIHAY GYRITYGETGGNSPVQEFTVPIVEGTAT ISGLKPGVDYITIVYAVEYTFKHSGYYHR PISINYRT-X ₃
536	Fc-1784F03-m1 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPIHAY GYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSEGTAT ISGLKPGVDYITIVYAVEYTFKHSGYYHR PISINYRT-X ₃
537	Fc-1784F03-m2 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAHAY GYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKGTAT ISGLKPGVDYITIVYAVEYTFKHSGYYHR PISINYRT-X ₃
538	Fc-1784F03-m3 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTY GYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTAT ISGLKPGVDYITIVYAVEYTFKHSGYYHR PISINYRT-X ₃

539	Fc-1813E02 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWSPPPANGY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVGRGTAT ISGLKPGVDYITITVYAVEYTYKGSYYHR PISINYRT-X ₃
540	Fc-1923B02 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWTPPPKGY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVGEGTAT ISGLKPGVDYITITVYAVEYTYNGAGYYHR PISINYRT-X ₃
541	Fc-1923B02(N82 I) de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWTPPPKGY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVGEGTAT ISGLKPGVDYITITVYAVEYTYIGAGYYHR PISINYRT-X ₃
542	Fc-1923B02(N82 E) de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ -VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWTPPPKGY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVGEGTAT ISGLKPGVDYITITVYAVEYTYEGAGYYHR PISINYRT-X ₃
543	Fc-1923B02(T80 A) de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWTPPPKGY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVGEGTAT ISGLKPGVDYITITVYAVEYAYNGAGYYHR PISINYRT-X ₃

544	Fc-1922G04 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _b TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWRPPSHAY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGAT ISGLKPGVDYITITVYAVEYPWKGSYYHR PISINYRT-X ₃
545	Fc-1922G04(R25D) de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _b TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDPPSHAY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGAT ISGLKPGVDYITITVYAVEYPWKGSYYHR PISINYRT-X ₃
546	Fc-1922G04(R25 E) de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _b TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWEPPSHAY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGAT ISGLKPGVDYITITVYAVEYPWKGSYYHR PISINYRT-X ₃
547	Fc-1922G04(R25 S) de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _b TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWSPPSHAY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGAT ISGLKPGVDYITITVYAVEYPWKGSYYHR PISINYRT-X ₃
548	Fc-2012A04 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _b TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWRPPSNH GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVNEGAT ISGLKPGVDYITITVYAVEFPFKWSYYHR PISINYRT-X ₃

549	Fc-2013E01 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWVPPSDDY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEFPWPHAGYYHR PISINYRT-X ₃
550	Fc-2011H05 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWVPSSHAY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVGVGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEYAFEGAGYYHR PISINYRT-X ₃
551	Fc-2011H05(V23 D) de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDPSSHAY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVGVGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEYAFEGAGYYHR PISINYRT-X ₃
552	Fc-2011H05(V23 E) de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWEPSSHAY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVGVGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEYAFEGAGYYHR PISINYRT-X ₃
553	Fc-2381B02 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWEPFSRLP GGGEYYRITYGETGGNSPLQQTVPGSKG TATISGLKPGVDYTITVYAVEYPYDYSY YHRPISINYRT-X ₃

554	Fc-2381B04 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWEPFSRLP GGGEYYRITYGETGGNSPLQQFTVPGSKG TATISGLKPGVDYTITVYAVEYPYEHSGY YHRPISINYRT-X ₃
555	Fc-2381B06 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWEPFSRLP GGGEYYRITYGETGGNSPLQQFTVPGSKG TATISGLKPGVDYTITVYAVEYPYPHSGY YHRPISINYRT-X ₃
556	Fc-2381B08 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPADGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYTFPGAGYYH RPISINYRT-X ₃
557	Fc-2381D02 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWEPFSRLP GGGEYYRITYGETGGNSPLQQFTVPGSKG TATISGLKPGVDYTITVYAVEYPYDHSGY YHRPISINYRT-X ₃
558	Fc-2381D04 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWEPFSRLP GGGEYYRITYGETGGNSPLQQFTVPGSKG TATISGLKPGVDYTITVYAVEFPYDHSGY YHRPISINYRT-X ₃

559	Fc-2381F11 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPADGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKSTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYTFPGAGYYH RPISINYRT-X ₃
560	Fc-2381G03 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWEPFSRLP GGGEYRITYGETGGNSPLQQFTVPGSKG TATISGLKPGVDYTITVYAVEFPYAHSGY YHRPISINYRT-X ₃
561	Fc-2381G09 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAGDG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFTFPAGAGYYH RPISINYRT-X ₃
562	Fc-2381H03 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWEPFSRLP GGGEYRITYGETGGNSPLQQFTVPGSKG TATISGLKPGVDYTITVYAVEYPYAHSGY FHRPISINYRT-X ₃
563	Fc-2382A01 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWAAPAGGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYDFPGAGYYH RPISINYRT-X ₃

564	Fc-2382B10 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPADAY GYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSKGTAT ISGLKPGVDYITIVYAVEYDFPGSGYYHR PISINYRT-X ₃
565	Fc-2382B09 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPADAY GYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYITIVYAVEFDYPGSGYYHR PISINYRT-X ₃
566	Fc-2382C05 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPADGA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYITIVYAVEYSFPGAGYYH RPISINYRT-X ₃
567	Fc-2382C09 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEGY GYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYITIVYAVEFDYPGSGYYHR PISINYRT-X ₃
568	Fc-2382D03 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPADEA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYITIVYAVEFDYPGAGYYH RPISINYRT-X ₃

569	Fc-2382D05 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPADGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFDFFGAGYYH RPISINYRT-X ₃
570	Fc-2382D08 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPADGY GYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEFPFPGSGYYHR PISINYRT-X ₃
571	Fc-2382D09 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEGY GYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEFDFFGAGYYHR PISINYRT-X ₃
572	Fc-2382F02 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAGGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFDFFGSGYYH RPISINYRT-X ₃
573	Fc-2382F03 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAADA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFNFPAGYYH RPISINYRT-X ₃

574	Fc-2382F05 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEAG KHYGYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKG TATISGLKPGVDYTITVYAVEFDFFPGAGY YHRPISINYRT-X ₃
575	Fc-2382F08 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEAY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEFTYPGSGYYHR PISINYRT-X ₃
576	Fc-2382F09 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAAAY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEYDFPGSGYYHR PISINYRT-X ₃
577	Fc-2382G04 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ -VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAGGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSKGTAT TISGLKPGVDYTITVYAVEFDFFPGAGYYH RPISINYRT-X ₃
578	Fc-2382H10 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAGGY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEFDFFPGSGYYHR PISINYRT-X ₃

579	Fc-2382H11 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPADGY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVFKGTAT ISGLKPGVDYITIVYAVEFDYPGSGYYHR PISINYRT-X ₃
580	Fc-2382H04 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAAGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSKGTAT TISGLKPGVDYITIVYAVEYDFPGAGYYH RPISINYRT-X ₃
581	Fc-2382H07 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPADAY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKGTAT ISGLKPGVDYITIVYAVEFDYPGSGYYHR PISINYRT-X ₃
582	Fc-2382H09 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAAAAY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSKGTAT ISGLKPGVDYITIVYAVEFDYPGSGYYHR PISINYRT-X ₃
583	Fc-2451A02 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAAGY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYITIVYAVEFPFGSGYYHR PISINYRT-X ₃

584	Fc-2451B05 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVWVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAGGY GYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSKGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEFDYPGSGYYHR PISINYRT-X ₃
585	Fc-2451B06 de fusión (equivalente a 2382D05)	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVWVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPADGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFDFFPGAGYYH RPISINYRT-X ₃
586	Fc-2451C06 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVWVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAGAA SYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGT ATISGLKPGVDYTITVYAVEFPFPGAGYY HRPISINYRT-X ₃
587	Fc-2451D05 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVWVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAGAY GYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEFDFFPGSGYYHR PISINYRT-X ₃
588	Fc-2451F03 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVWVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDPPAEGY GYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEFNFPGSGYYHR PISINYRT-X ₃

589	Fc-2451G01 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLNISWDAPAGGY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSKGAT ISGLKPGVDYTITVYAVEFDPPGSGYYHR PISINYRT-X ₃
590	Fc-2451H07 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - ITDVPRDLEVVAATPTSLNISWNPPDVNY GYYRITYGETGGNSPLQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEYPYAHAGYYHR PISINYRT-X ₃
591	Fc-2382E03 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLNISWDAPAGDG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFDPPGAGYYH RPISINYRT-X ₃
592	Fc-2382E04 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLNISWDAPAGGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFTFPAGAGYYH RPISINYRT-X ₃
593	Fc-2382E05 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLNISWDAPAEAGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFDPPGAGYYH RPISINYRT-X ₃

594	Fc-2382E09 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEAY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEYDFPGSGYYHR PISINYRT-X ₃
595	Fc-2381A04 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWEPFSRLP GGGEYYRITYGETGGNSPLQQFTVPGSKG TATISGLKPGVDYTITVYAVEYPYFSGY YHRPISINYRT-X ₃
		NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEAGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYDFPGAGYYH RPISINYRT-X ₃
594	Fc-2382E09 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEAY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEYDFPGSGYYHR PISINYRT-X ₃
595	Fc-2381A04 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635) EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWEPFSRLP GGGEYYRITYGETGGNSPLQQFTVPGSKG TATISGLKPGVDYTITVYAVEYPYFSGY YHRPISINYRT-X ₃ VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPADGA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYFPYFAGYYH RPISINYRT-X ₃

599	Fc-2381G06 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWSEKLDGK ARRGYRITYGETGGNSPVQQFTVPGSKG TATISGLKPGVDYTITVYAVEFPYDHSGY YHRPISINYRT-X ₃
600	Fc-2381H01 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWSPRDSTG LVRRGYRITYGETGGNSPVQQFTVPGSK GTATISGLKPGVDYTITVYAVEYPYDHSG YYHRPISINYRT-X ₃
601	Fc-2381H06 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWGDVRTNE ARQGYRITYGETGGNSPLQGFTVPGSKG TATISGLKPGVDYTITVYAVEYTYEHSGY YHRPISINYRT-X ₃
602	Fc-2381H09 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAGGG YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEFDFVGAGYYH RPISINYRT-X ₃
603	Fc-2382B11 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAAAY GYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEYDFAGSGYYHR PISINYRT-X ₃

604	Fc-2382B08 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPADAY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSKGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEFAFPAGAYYHR PISINYRT-X ₃
605	Fc-2382C11 Fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAGGY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEYDFAGSGYYHR PISINYRT-X ₃
606	Fc-2382G03 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEAE AYGYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGT ATIS GLKPGVDYTITVYAVEYVFPAGAGYY HRPISINYRT-X ₃
607	Fc-2382H03 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEGA YGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEYPYFAGYYH RPISINYRT-X ₃
608	Fc-2451A10 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VTDVPRDMEVVAATPTSLISWQPPAVTY GYYRITYGETGGNSTLQQFTVPVYKGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEYPYDHSYYHR PISINYRT-X ₃

609	Fc-2451B02 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAAAY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYITITVYAVEFDYPGSGYYHR PISINYRT-X ₃
610	Fc-2451C11 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - IVDVPRDLEVVAATPTSLISWDPPAGAY GYYRITYGETGGNSPKQQFTVPGYKGTAT ISGLKPGVDYITITVYAVEYPYDHSGYYHR PISINYRT-X ₃
611	Fc-2451H01 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAAAY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYITITVYAVEYDFPGSGYYHR PISINYRT-X ₃
612	Fc-2011B11 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ -VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWAPPSPDAY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGTAT ISGLKPGVDYITITVYAVEYPYSHAGYYHR PISINYRT-X ₃
613	Fc-2971A03 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK(SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK _D TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDPPSDDY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGTAT ISGLKPGVDYITITVYAVEFPWPHAGYYHR PISINYRT-X ₃

614	Fc-2971A09 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK ₆ TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPADDY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGAT ISGLKPGVDYITVYAVEFPWPHAGYYHR PISINYRT-X ₃
615	Fc-2971E02 de fusión	X ₁ se selecciona de entre las secuencias bisagra SEQ ID NO: 317-321; X ₂ se selecciona de entre las secuencias enlazadoras SEQ ID NO: 310-314 y 620-634; X ₃ es opcional y cuando está presente puede ser una secuencia de cola en el extremo C seleccionada de entre SEQ ID NO: 380-395 y EIEK (SEQ ID NO: 635)	X ₁ - VFLFPPKPK ₆ TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG-X ₂ - VSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPSDDY GYYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGAT ISGLKPGVDYITVYAVEFPWPHAGYYHR PISINYRT-X ₃

En algunas realizaciones, la Adnectina anti-PCSK9 comprende un dominio Fn3 y un resto PK. En algunas realizaciones, el dominio Fn3 es un dominio ¹⁰F_n3. En algunas realizaciones, el resto PK aumenta la semivida en el suero del polipéptido más de un 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 200, 400, 600, 800, 1000 % o más con respecto al dominio Fn3 solo.

En algunas realizaciones, el resto PK es un azúcar polimérico. En algunas realizaciones, el resto PK es un resto de polietilenglicol. En algunas realizaciones, el resto PK es una proteína de unión a la seroalbúmina. En algunas realizaciones, el resto PK es una seroalbúmina humana. En algunas realizaciones, el resto PK es una proteína de unión a la inmunoglobulina sérica. En algunas realizaciones, el resto PK es la transferrina.

En algunas realizaciones, el resto PK es otra Adnectina específica de una proteína sérica, por ejemplo, HSA. La presente solicitud proporciona moléculas de Adnectina específicas que se unen a la seroalbúmina (o SABA) como se ha descrito en el presente documento. En ciertas realizaciones, se puede definir una Adnectina PCSK9 fusionada a una SABA en general de la siguiente manera. X₁- Adnectina PCSK9 central-X₂-X₃-X₄-SABA central-X₅ (SEQ ID NO: 618), o X₁-SABA central-X₂-X₃-X₄- Adnectina PCSK9 central-X₅ (SEQ ID NO: 619), en el que X₁ y X₄ representan las secuencias opcionales de extensión del extremo N, X₂ y X₅ representan secuencias opcionales de extensión del extremo C, y X₃ es un enlazador. En una realización, las Adnectinas (sea PCSK9 o de unión a la seroalbúmina) de las SEQ ID NO: 618 y 619 comprende la región "central" de la Adnectina, es decir, una secuencia de Adnectina PCSK9 central puede ser una cualquiera de las secuencia de Adnectina PCSK9 que se muestran en la Tabla 4, en las que la secuencia comienza con el resto de aminoácido que se corresponde con E8 de la SEQ ID NO: 1 y termina en el aminoácido que se corresponde con el resto T94 de la SEQ ID NO: 1; y una secuencia SABA central se puede seleccionar de cualquiera de las secuencias centrales de SABA que se muestran en la Tabla 6.

En algunas realizaciones, X₁ y X₄ son independientemente opcionales, y cuando están presentes se seleccionan independientemente de entre las SEQ ID NO: 371-379 enumeradas en la Tabla 6, y puede comprender opcionalmente una M, G o secuencia MG en el extremo N cuando dichos restos no están ya presentes. Para la expresión en un sistema de mamífero, las proteínas de fusión pueden comprender adicionalmente una secuencia líder en el extremo N, tal como METDTLLLVVLLLVPGSTG (SEQ ID NO: 326). En algunas realizaciones, X₂ y X₅ son opcionales independientemente y cuando están presentes se seleccionan independientemente de entre SEQ ID NO: 380-395 enumeradas en la Tabla 6. En ciertas realizaciones, X₃ es una secuencia líder seleccionada de entre las SEQ ID NO: 396-419 enumeradas en la Tabla 6. Las secuencias que se muestran en la Tabla 2 representan fusiones a modo de ejemplo de Adnectina anti-PCSK9 y SABA. Se debería entender que cualquier secuencia de Adnectina PCSK9 y SABA descritas en la presente solicitud puede incorporarse en estas configuraciones.

Tabla 2 Secuencias de fusión Adnectina PCSK9 – SABA a modo de ejemplo

SEQ ID	Clon o Nombre	Descripción	Secuencia
--------	---------------	-------------	-----------

616	de fusión Adnectina PCSK9-SABA	La secuencia Adnectina PCSK9 está subrayada; la secuencia de SABA está en negrita; la secuencia de Adnectina PCSK9 es la región central derivada del clon 2013E01; la secuencia de SABA se deriva de SABA 1 (SEQ ID NO: 330)	X ₁ - <u>EVVAATPTSLISWVPPSDDYGYRITY</u> <u>GETGGNSPVQEFTVPIGKTATISGLKP</u> <u>GVDYTITVYAVEFPWPHAGYYHRPISIN</u> YRT-X ₂ -X ₃ -X ₄ EVVAATPTSLISWHSYEQNSYYRITY GETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP GVDYTITVYAVYGSKYYYIPISINYRT-X₅
617	De fusión SABA- Adnectina PCSK9	La secuencia de SABA está en negrita; la secuencia de Adnectina PCSK9 está subrayada. La secuencia de SABA se deriva de SABA 1 (SEQ ID NO: 330); la secuencia de Adnectina PCSK9 es la región central derivada del clon 2013E01	X ₁ - EVVAATPTSLISWHSYEQNSYYRITY GETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP GVDYTITVYAVYGSKYYYIPISINYRT- X ₂ -X ₃ -X ₄ - <u>EVVAATPTSLISWVPPSDDYGYRITY</u> <u>GETGGNSPVQEFTVPIGKTATISGLKP</u> <u>GVDYTITVYAVEFPWPHAGYYHRPISIN</u> YRT-X ₅

Caracterización Biofísica y Bioquímica

5 La solicitud proporciona una Adnectina que comprende un dominio Fn3 que se une a PCSK9. El polipéptido que se une a una molécula diana se puede evaluar en términos de constantes de equilibrio (por ejemplo, la de disociación K_D) y en términos de constantes cinéticas (por ejemplo, constante de velocidad de asociación, K_{on} , y constante de velocidad de disociación, K_{off}). Una Adnectina se unirá en general a una molécula diana con una K_D de menos de 500 nM, 100 nM, 10 nM, 500 pM, 200 pM, 100 pM, aunque se pueden tolerar valores de K_D mayores cuando la K_{off} es lo suficientemente baja o la K_{on} es lo suficientemente alta.

10 Las SEQ ID NO de los bucles BC, DE y FG de las Adnectinas anti-PCSK9 de la invención se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3

Bucles BC, DE y FG de Adnectina anti-PCSK9

ID del clon	Afinidad (K _D , nM)	PCSK9- EGFA FRET (CE ₅₀ , nM)	Agotamiento de LDLR (% de inhibición a 75 nM, CE ₅₀ (nM))	Bucle BC	SEQ ID NO	Bucle DE	SEQ ID NO	Bucle FG	SEQ ID NO
1459D05	14,4† 1,58* 26 ^Δ	4	66,8, >200	SWPPPSHGYG	2	PPGKGT	18	EYPYKHSGYYHRP	28
1784F03	3,8 ^Δ	2	150,2, 26±13	SWRPPIHAYG	3	PIVEGT	19	EYTFKHSGYYHRP	29
1784F03-m1	nd	nd	nd, >2000	SWRPPIHAYG	4	PGSEGT	20	EYTFKHSGYYHRP	29
1784F03-m2	nd	nd	nd, >2000	SWRPPIHAYG	5	PGSKGT	21	EYTFKHSGYYHRP	29
1784F03-m3	nd	nd	nd, >2000	SWDAPAVTYG	6	PGSKST	22	EYTFKHSGYYHRP	29
1813E02	<2 ^Δ	1,3	nd,16	SWSPPPANGYG	7	PVGRGT	23	EYTYKSGSGYYHRP	30
1923B02	0,173*	2,3	178,0, 23±7	SWTPPPKGYG	8	PVGEGT	24	EYTYNGAGYYHRP	31
1923B02(N821)	nd	nd	nd, 14	SWTPPPKGYG	8	PVGEGT	24	EYTYIGAGYYHRP	32
1923B02(N82E)	nd	nd	nd,28	SWTPPPKGYG	8	PVGEGT	24	EYTYEGAGYYHRP	33
1923B02(T80A)	nd	nd	nd,42	SWTPPPKGYG	8	PVGEGT	24	EYAYNGAGYYHRP	34
1922G04	0,09*	1,2	105,1, 10±2	SWRPSPSHAYG	9	PIGKGT	25	EYPWKSGSGYYHRP	35
1922G04(R25D)	nd	2,5	nd, 29±8	SWDPSPSHAYG	10	PIGKGT	25	EYPWKSGSGYYHRP	35

1922G04(R25E)	nd	3,5	nd, 29±18	SWEPSSHAYS	11	PIKGT	25	EYPWKSGYYHRP	35
1922G04(R25S)	nd	nd	nd, 21	SWEPSSHAYS	12	PIKGT	25	EYPWKSGYYHRP	35
2012A04	0,25*	2,1	144,5, 12±6	SWRPPSNGHG	13	PVNEG	26	EFPFKWSGYHRP	36
2013E01	1,51† 0,29*	1,6	165,5, 10±4	SWVPPSDDYG	14	PIKGT	25	EFPWPHAGYYHRP	37
2011H05	0,08*	2,7	197,6, 12±5	SWVPSSHAYG	15	PVGVT	27	EYAFEGAGYXHRP	38
2011H05(V23D)	nd	5,5	nd, 18±3	SWDPSSHAYG	16	PVGVT	27	EYAFEGAGYXHRP	38
2011H05(V23E)	nd	7,4	nd, 12±3	SWEPSSHAYG	17	PVGVT	27	EYAFEGAGYXKRP	38
2381B02(1)	3,29†	2,5	125,4, nd	SWEPFSRLPGGGE	106	PGSKGT	21	EYPYDYSGYHRP	142
2381B04(1)	0,527†	2,4	121,6, nd	SWEPFSRLPGGGE	106	PGSKGT	21	EYPYEHSGYYHRP	143
2381B06(1)	nd	3,5	119,7, nd	SWEPFSRLPGGGE	106	PGSKGT	21	EYPYPHSGYYHRP	144
2381B08	4,11†	2,6	124,8, nd	SWDAPADGGYG	107	PSSKGT	136	EYTFPGAGYYHRP	145
2381D02(1)	nd	3,1	185,0, nd	SWEPFSRLPGGGE	106	PGSKGT	21	EYPYDHSGYYHRP	146
2381D04(1)	0,237†	2,9	119,2, nd	SWEPFSRLPGGGE	106	PGSKGT	21	EFPYDHSGYYHRP	147
2381F11	1,59†	4	110,2, nd	SWDAPADGGYG	107	PVSKST	137	EYTFPGAGYYHRP	145
2381G03(1)	nd	3,4	70,2, nd	SWEPFSRLPGGGE	106	PGSKGT	21	EFPYAHSGYYHRP	148

2381G09	1,12†	3,1	133,0, nd	SWDAPAGDGYG	108	PVSKGT	138	EFTFPGAGYYHRP	149
2381H03(1)	nd	3,4	89,8, nd	SWEPFSRLPGGGE	106	PVSKGT	21	EYPYAHSGYFHRP	150
2382A01	nd	12,9	119,8, nd	SWAAPAGGGYG	109	PVSKGT	138	EYDFPGAGYYHRP	151
2382B10	2,35†	3	100,2, nd	SWDAPADAYG	110	PVSKGT	136	EYDFPGSSYYHRP	152
2382B09	0,656†	3,8	105,0, nd	SWDAPADAYG	110	PVSKGT	138	EFDYPSSGYYHRP	153
2382C05	2,49†	4	105,3, nd	SWDAPADGAYG	111	PVSKGT	138	EYSFPGAGYYHRP	154
2382C09	0,757†	3,5	121,7, nd	SWDAPAEYG	112	PVSKGT	138	EFDFPGSGYYSHRP	155
2382D03	1,53†	3,3	80,4, nd	SWDAFADEAYG	113	PVSKGT	138	EFDFPGAGYYHRP	156
2382D05	0,314 †	2,6	140,5, nd	SWDAPADGGYG	107	PVSKGT	138	EFDFPGAGYYHRP	156
2382D08	nd	3,1	106,6, nd	SWDAPADGYG	114	PVSKGT	138	EFPPSPSSGYYHRP	157
2382D09	0,304†	2,6	109,1, nd	SWDAPAEYG	112	PVSKGT	138	EFDFPGAGYYHRP	156
2382F02	nd	2,6	-6,3, nd	SWDAPAGGGYG	115	PVSKGT	138	EFDFPGSGYYHSP	155
2382F03	nd	2,7	88,6, nd	SWDAPAAADAYG	116	PVSKGT	138	EFNFPGAGYYHBP	158
2382F05	4,54†	2,4	72,2, nd	SWDAPAEAGKHYG	117	PVSKGT	138	EFDFPGAGYYHRP	156
2382F08	nd	2,5	105,0, nd	SWDAPAEAYG	118	PVSKGT	138	EFTYPGSGYYHRP	159
2382F09	nd	3,1	109,7, nd	SWDAPAAAYG	119	PVSKGT	138	EYBFPGSSYYHKP	152

2382G04	1,1 lt	2,9	146,1, nd	SWDAPAGGGYG	115	PSSKGT	136	EFDFFPGAGYYHRP	156
2382H10	1,40†	2,6	118,6, nd	SWDAPAGGYG	120	PVSKGT	138	EFDFFPGSGYYHRP	155
2382H11	nd	2,9	117,2, nd	SWDAPADGYG	114	PVFKGT	139	EFDYPGSGYYHRP	153
2382H04	nd	3,2	68,2, nd	SWDAPAAAGGYG	121	PSSKGT	136	EYDFPGAGYYHRP	151
2382H07	nd	2,7	86,2, nd	SWDAPADAYG	110	PGSKGT	21	EFDFFPGSGYYHRP	155
2382H09	1,86†	0,9	101,2, nd	SWDAPAAAYG	119	PSSKGT	136	EFDFFPG5QYYHRP	155
2451A02	nd	3,2	106,4, nd	SWDAPAAAGYG	122	PVSKGT	138	EFPPPGSGYYHRP	157
2451B05	nd	6,3	91,7, nd	SWDAPAGGYG	120	PSSKGT	136	EFDYPGSGYYHRP	153
2451B06	nd	4,5	92,2, nd	SWDAPADGGYG	107	PVSKGT	138	EFDFFPGAGYYKRP	156
2451C06	1,27†	1,2	89,4, nd	SWDAPAGAASYG	123	PVSKGT	138	EFPPPSAGYYHRP	160
2451D05	nd	2,8	115,0, nd	SWDAPAGAYG	124	PVSKGT	138	EFDFFPG5QYYKRP	155
2451F03	nd	2,8	113,2, nd	SWDPPAEGYG	125	PVSKGT	138	EFMFPGSGYYHRP	161
2451G01	nd	3,8	90,8, nd	SWDAPAGGYS	120	PSSKGT	136	EFDFFPGSGYYHRP	155
2451H07(2)	2,08†	0,2	88,8, nd	SWNPPDVNYG	126	PVSKGT	138	EYPYAHAGYYHRP	162
2382E03	2,94†	2,4	89,5, nd	SWDAPAGDGYG	108	PVSKGT	138	EFDFFPGAGYYHRP	156
2382E04	nd	3	61,5, nd	SWDAPAGGGYS	115	PVSKGT	138	EFTFFPGAGYYHRP	149

2382E05	0,604†	2,8	103,5, nd	SWDAPAEAGGYG	127	PVSKGT	138	EFDFDGAGYYHRP	156
2382E09	nd	6,2	97,2, nd	SWDAPAEAYG	118	PVSKGT	138	EYDFPGSGYYHRP	152
2381A04(1)	nd	3,3	100,1, nd	SWEPFSRLPGGGE	106	PGSKGT	21	EYPYPFSGYYHRP	163
2381A08	nd	3,6	91,4, nd	SWDAPADGGYG	107	PGSKGT	21	EYDFPGAGYYHRP	151
2381B10	nd	7,3	96,4, nd	SWDAPAGGGYG	115	PVSKGT	138	EYNFIGAGYYHRP	164
2381C08	nd	0,7	15,3, nd	SWDAPADGAYG	111	PVSKGT	138	EFYPFAGYYHRP	165
2381G06(3)	nd	9	57,7, nd	SWSEKLDGKARRG	128	PGSKGT	21	EFPYDHSGYYHRP	147
2381H01(3)	nd	4	22,2, nd	SWSPRDSTGLVRRG	129	PGSKGT	21	EYPYDHSGYYHRP	146
2381H06(4)	nd	5	53,4, nd	SWGDVRTNEARQG	130	PGSKGT	21	EYTYESSGYYHRP	166
2381H09	3,23†	3,4	94,4, nd	SWDAPAGGGYG	115	PVSKGT	138	EFDFySAGYYHRP	167
2382B11	nd	2,9	88,8, nd	SWDAPAAAAYG	119	PVSKGT	138	EYDFAG5QYYHRP	168
2382B08	nd	2,9	107,2, nd	SWDAPADAYG	110	PSSKGT	136	EFAFPQAGYYHRP	169
2382C11	nd	3,7	82,9, nd	SWDAPAGGYG	120	PVSKGT	138	EYDFAGSGTYHRP	168
2382G03	nd	2,7	77,8, nd	SWDAPAEAEAYG	131	PVSKGT	138	EYVFPAGYYHRP	170
2382H03	0,677†	3,4	102,1, nd	SWDAPAEAGAYG	132	PVSKGT	138	EYPYPFAGYYHRP	171
2451A10(5)	nd	10,9	53,7, nd	SWQPPAVTYG	133	PVYKGT	140	EYPYDHSGYYHRP	146

2451B02	nd	5,3	71,4, nd	SWDAPAAAYG	119	PVSKGT	138	EFDYPGSGYYHRP	153
2451C11(6)	nd	9,7	70,3, nd	SWDPPAGAYG	134	PGYKGT	141	EYPYDHSGYYHRP	146
2451H01	nd	2,8	95,8, nd	SWDAPAAAGYG	122	PVSKGT	138	EYDFPGSGYYHRP	152
2011B11	nd	1,7	144,5, nd	SWAPPSDAYG	135	PIGKGT	25	EYPYSHAGYYHRP	172
2971A03	0,806†	nd	120,1, nd	SWDPPSDDYG	301	PIGKGT	25	EFWPWPHAGYYHRP	37
2971A09	2,79†	nd	132,3, nd	SWDAPADDYG	302	PYGKGT	25	EFWPWPHAGYYHRP	37
2971E02	1,78†	nd	126,2, nd	SWDAPSDDDYG	303	PIGKGT	25	EFWPWPHAGYYHRP	37

† K_D determinada utilizando Octet Red at 37 °C; * K_D determinada utilizando ProteOn at 25 °C; [^] K_D determinada utilizando ITC at 37 °C; (1) Además de las mutaciones en los bucles, estos clones también tienen las mutaciones V45L y E47Q; (2) Además de las mutaciones en los bucles, este clon también tiene las mutaciones VII, S2T, y V45L; (3) Además de las mutaciones en los bucles, estos clones también tiene la mutación E47Q; (4) Además de las mutaciones en los bucles, este clon también tiene las mutaciones V45L and E47G; (5) Además de las mutaciones en los bucles, este clon también tiene las mutaciones S2T, L8M, P44T, V45L, y E47Q; (6) Además de las mutaciones en los bucles, este clon tiene también las mutaciones VII, S2V, V45K, y E47Q.

Las SEQ ID NO de la familia de la Adnectina anti-PCSK9 de la invención se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4
Familia de la Adnectina anti-PCSK9

Clon	Secuencia	
	Aminoácido	Ácido nucleico
1459D05 al que también se hace referencia como AT1000891 o AT1-891	MGVSDVPRDLEWVAATPTSLLI	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGA
	SWPPPSHGYGYRITYGETGGN	TCAGCTGGCGCGCGCTCTCATGGTTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG
	SPVQEFTVPPGKGATISGLKP	CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCCGCCCTGGTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT
	GVDYTTIVYAVEYPYKHS GYYH	AAACCTGGCGGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAAATACCCGTACAAACA TTCTGGTT
	RPISINYRTEIDKPSQH HHHH	ACTACCATCGTCCAAATTTCCATTATACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA
	(SEQ ID NO:39)	CCACCACCAC (SEQ ID NO:40)
1784F03	MGVSDVPRDLEWVAATPTSLLI	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGA
	SWRPPHAYGYRITYGETGGN	TCAGCTGGAGGCGCGGATTTCATGCTTACGGGTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG
	SPVQEFTVPIVEGTATISGLKP	CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCGCTATTGTTGAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT
	GVDYTTIVYAVEYTFKHS GYYH	AAACCTGGCGGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAAATACATTTAAACATTCCGGTT
	RPISINYRTEIDKPSQH HHHH	ACTACCATCGTCCAAATTTCCATTATACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA
	(SEQ ID NO:41)	CCACCACCAC (SEQ ID NO:42)

1784F03-m1	MGVSDVPRDLEWAAATPTSLLI SWDAPIHAYGYRITYGETGGN SPVQEEFTVPGSEGTATISGLKP GVDYTIIVYAVEYTFKHS GYYH RPISINYRTEIDKPSQHSHHHH (SEQ ID NO:43)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGATTCA TGCTTACGGGTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCAC TGTGCCTGGTTCTGAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCGAATATACATTTAAACATTCCGGTT ACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO:44)
1784F03-m2	MGVSDVPRDLEWAAATPTSLLI SWDAPAHAYGYRITYGETGGN SPVQEEFTVPGSKGTATISGLKP GVDYTIIVYAVEYTFKHS GYYH RPISINYRTEIDKPSQHSHHHH (SEQ ID NO:45)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTCATGCTTACGGGTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCAC TGTGCCTGGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCGAATATACATTTAAACATTCCGGTT ACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO:46)
1784F03-m3	MGVSDVPRDLEWAAATPTSLLI SWDAPAVTYGYRITYGETGGN SPVQEEFTVPGSKSTATISGLKP GVDYTIIVYAVEYTFKHS GYYH RPISINYRTEIDKPSQHSHHHH (SEQ ID NO:47)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGTACTTACGGGTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCAC TGTGCCTGGTTCTAAATCTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCGAATATACATTTAAACATTCCGGTT ACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO:48)

1813E02	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSPANGYGYRITYGETGNN SPVQEFTVPVGRGTATISGLKP GVDYTTIVYAVEYTYKGS GYYH RPISINYRTEIDKPSQHSHHHHH (SEQ ID NO:49)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAAGCCTGCTGA TCAGCTGGTCCCAACCGGCTAACGGTTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTGGTAGAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAGTATACCTACAAAGGCTCTGGTT ACTACCATCGCCCCAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO:50)
1923B02	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWTPPPKGYGYRITYGETGNN SPVQEFTVPVGEGTATISGLKP GVDYTTIVYAVEYTYNGAGYYH RPISINYRTEIDKPSQHSHHHHH (SEQ ID NO:51)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAAGCCTGCTGA TCAGCTGGACGCCCTCCCTAAAGGGTATGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTGGTGAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAAATACACGTACAACGGTGCCGGTT ACTACCAACCGGCCAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO:52)
1923B02(N821)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWTPPPKGYGYRITYGETGNN SPVQEFTVPVGEGTATISGLKP GVDYTTIVYAVEYTYIGAGYYH RPISINYRTGSGSHSHHHHH (SEQ ID NO:53)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAAGCCTGCTGA TCAGCTGGACGCCCTCCCTAAAGGGTATGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTGGTGAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAAATACACGTACATTTGGTGCCGGTT ACTACCAACCGGCCAATTTCCATTAAATTACCGCACAGGTAGCGGTTCCCAACCATCAACCATCA C (SEQ ID NO:54)

1923B02(N82E)	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLI SWTPPPKGYGYRITYGETGNN SPVQEFTVPVGEGTATISGLKP GVDYTTIVYAVEYTYEGAGYYH RPISINYRTGSGSHHHHHH (SEQ ID NO:55)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGA TCAGCTGGACGCCTCCCCCTAAAGGGTATGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCCTGTGGTGAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCGAATACACGTACGAAGGTGCCGGTT ACTACCACCGGCCAA TTTCCA TTAATTACCGCACAGGTAGCGGTTCCACCATCACCAACCATCA C (SEQ ID NO:56)
1923B02(T80A)	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLI SWTPPPKGYGYRITYGETGNN SPVQEFTVPVGEGTATISGLKP GVDYTTIVYAVEYAYNGAGYYH RPISINYRTGSGSHHHHHH (SEQ ID NO:57)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGA TCAGCTGGACGCCTCCCCCTAAAGGGTATGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCCTGTGGTGAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCGAATACGCGTACAA CGGTGCCGGTT ACTACCACCGGCCAA TTTCCA TTAATTACCGCACAGGTAGCGGTTCCACCATCACCAACCATCA C (SEQ ID NO:58)
1922G04 al que también se hace referencia en el presente documento como AT1001057 o ATI-1057	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLI SWRPPSHAYGYRITYGETGNN SPVQEFTVPVIGKGTATISGLKP GVDYTTIVYAVEYWPWKGS GYYH RPISINYRTEIDKPSQHHHHH (SEQ ID NO:59)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGA TCAGCTGGCGGCCGCCATCTCATGCTTATGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCCTATTGGGAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCGAATACCCGTGGAAGGTTCTGGTT ACTACCATCGGCCAA TTTCCA TTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCACAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO:60)

1922G04(R25D)	MGVSDVPRDLEVVAA TPTSLLI SWDPPSHAYGYRITYGETGNN SPVQEFTVPIGKG TATISGLKP GVDY TITVYAVEYPWKGS GYYH RPISINYRTGSGSHHHHHH (SEQ ID NO:61)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACCCGCCATCTCATGCTTATGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCAGGAGTTCACGTGTCCTATTGGGAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAAATACCCGTGGAAGGTTCTGGTT ACTACCATCGGCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGGTAGCGGTTCCACCATCACCACCATCA C (SEQ ID NO:62)
1922G04(R25E)	MGVSDVPRDLEVVAA TPTSLLI SWEPPSHAYGYRITYGETGNN SPVQEFTVPIGKG TATISGLKP GVDY TITVYAVEYPWKGS GYYH RPISINYRTGSGSHHHHHH (SEQ ID NO:63)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGAACCGCCATCTCATGCTTATGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCAGGAGTTCACGTGTCCTATTGGGAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAAATACCCGTGGAAGGTTCTGGTT ACTACCATCGGCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGGTAGCGGTTCCACCATCACCACCATCA C (SEQ ID NO:64)
1922G04(R25S)	MGVSDVPRDLEVVAA TPTSLLI SWSPPSHAYGYRITYGETGNN SPVQEFTVPIGKG TATISGLKP GVDY TITVYAVEYPWKGS GYYH RPISINYRTGSGSHHHHHH (SEQ ID NO:65)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGAGCCCGCCATCTCATGCTTATGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCAGGAGTTCACGTGTCCTATTGGGAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAAATACCCGTGGAAGGTTCTGGTT ACTACCATCGGCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGGTAGCGGTTCCACCATCACCACCATCA C (SEQ ID NO:66)

2012A04	MGVSDVPRDLEVAAATPTSLLI SWRPPNSHGYYRITYGETGGN SPVQEFTV/PVNEGTAISGLKP GVDYITIVYAVEFPFKWSGYYH RPISINYRTEIDKPSQHSHHHH (SEQ ID NO:67)	ATGGGAGTTTCTGATGTCCGCGCGACCTGGAAGTGTTGCTGCCACCCCCACGAGCCTGCTGA TCAGCTGGCGGCCCCCTCTAATGGTCACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTAATGAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATTCCCTTCAAGTGGTGGGCT ACTACCATCGACCAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAA TTGACAAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCCACCAC (SEQ ID NO:68)
2013E01 al que también se hace referencia como ATI001081 o ATI-1081	MGVSDVPRDLEVAAATPTSLLI SWVPPSDDYGYRITYGETGGN SPVQEFTV/PIGKGTAISGLKP GVDYITIVYAVEFPWPHAGYYH RPISINYRTEIDKPSQHSHHHH (SEQ ID NO:69)	ATGGGAGTTTCTGATGTCCGCGCGACCTGGAAGTGTTGCTGCCACCCCCACGAGCCTGCTGA TCAGCTGGGTCCGCGCTTCAGATGATTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTATTGGTAAAGGAACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAAGTTTCCGTGGCCACATGCTGGTT ACTATCATCGGCCAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAA TTGACAAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCCACCAC (SEQ ID NO:70)
2011H05 al que también se hace referencia como ATI001091 o ATI-1091	MGVSDVPRDLEVAAATPTSLLI SWVPSSSHAYGYRITYGETGGN SPVQEFTV/PVGVGTATISGLKP GVDYITIVYAVEYAFEGAGYYH RPISINYRTEIDKPSQHSHHHH (SEQ ID NO:71)	ATGGGAGTTTCTGATGTCCGCGCGACCTGGAAGTGTTGCTGCCACCCCCACGAGCCTGCTGA TCAGCTGGGTCCGTCGTCATGCCTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTGGGGTAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATACGCTTTTCGAAGGGGCTGGTT ACTACCATCGTCCAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAA TTGACAAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCCACCAC (SEQ ID NO:72)

2011H05(V23D)	MGVSDVPRDLEVVAA TPTSLLI SWDPSSHAYGYRITYGETGGN SPVQEFTVPVGVGTATISGLKP GVDYITIVYAVEYAFEGAGYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO: 73)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACCCGTCGTCTCATGCCCTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCCTGTGGGGTAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAAATACGCTTTCGAAAGGGGCTGGTT ACTACCATCGTCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAA TTGACAAACCATCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 74)
2011H05(V23E)	MGVSDVPRDLEVVAA TPTSLLI SWEPSSHAYGYRITYGETGGN SPVQEFTVPVGVGTATISGLKP GVDYITIVYAVEYAFEGAGYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO: 75)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGAACCGTCGTCTCATGCCCTACGGTTA TTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCCTGTGGGGTAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAAATACGCTTTCGAAAGGGGCTGGTT ACTACCATCGTCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAA TTGACAAACCATCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 76)
2381B02	MGVSDVPRDLEVVAA TPTSLLI SWEPFSRLPGGGEYRITYGET GGNSPLQQFTVPGSKGTATISG LKPGVDYITIVYAVEYVPDYSG YYHRPISINYRTEIDKPSQH HHH HHH (SEQ ID NO: 173)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGAGCCGTTCA GCCGGTTGCCCGGGGGCGCGAGTATTACCGGATCACTTACGGCGGA AACAGGAGGCAATAGCCCTCTGCAGCAGTTCACTGTGCCCTGTTCTAAAGGTACAGCTACCATC AGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAAATACCCGTACGACT ATTCTGGTTACTACCATCGCCCCCA TTTCCA TTAATTACCGCACAGAAA TTGACAAACCATCCCA GCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 174)

2381B04	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLI SWEPFSRLPGGGEYRITYGET GGENSPLQQTVPSSKGTATISG LKPVDYTITVYAVEYPYEHSG YYHRPISINYRTEIDKPSQH HH HHH (SEQ ID NO: 175)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAA GTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGAGCCGTTTCCGCGGTTGCCCGGGGGCGGCGAGTATTACCGGATCACTTACGGCGGA AACAGGAGGCAATAGCCCTCTGCAGCAGTTCACTGTCCCTGGTTCTAAAGGTACAGCTACCATC AGCGGCCCTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATACCCGTACGAGC ATTCTGGGTACTATCATCGTCCGATTTCCA TTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCCA GCACCATCACCAACCAC (SEQ ID NO: 176)
2381B06	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLI SWEPFSRLPGGGEYRITYGET GGENSPLQQTVPSSKGTATISG LKPVDYTITVYAVEYPYEHSG YYHRPISINYRTEIDKPSQH HH HHH (SEQ ID NO: 177)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAA GTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGAGCCGTTTCCGCGGTTGCCCGGGGGCGGCGAGTATTACCGGATCACTTACGGCGGA AACAGGAGGCAATAGCCCTCTGCAGCAGTTCACTGTCCCTGGTTCTAAAGGTACAGCTACCATC AGCGGCCCTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATACCCGTACCCGC ATTCTGGTTACTACCATCGACCCGATTTCCA TTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCCA GCACCATCACCAACCAC (SEQ ID NO: 178)
2381B08	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLI SWDAPADGGYGYRITYGETGG NSPVQEFTVPSSKGTATISGLK PGVDYTITVYAVEYTFPGAGYY HRPISINYRTEIDKPSQH HH H (SEQ ID NO: 179)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAA GTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGAGCCGTTCCGGCTGATGGAGGGTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGG AGGCAA TAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTCCCTAGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTA TACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATACACCTTCCCGGGCGCCG GTTACTACCATCGTCCAA TTTCCA TTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCCAGCACCA TCACCAACCAC (SEQ ID NO: 180)

2381D02	MGVSDVPRDLEVAAATPTSLLI SWEFSLRPGGGEYRITYGET GGNSPLQQFTVPGSKGTATISG LPGVDYTITVYAVEYPYDHSG YYHRPISINYRTEIDKPSQH HH HHH (SEQ ID NO: 181)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGA TCAGCTGGGAGCCGTTACGCCGTTGCCCGGGGGCGGAGTATTACCGGATCATTACGGCGGA AACAGGAGGCAATAGCCCTCTGCAGCAGTTTCACTGTGCCCTGGTTCTAAAGGTACAGCTACCATC AGCGGCCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAAATACCCGTACGACC ATTCTGGTTACTACCATCGTCCCATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAAATTGACAAAACCATCCCCA GCACCATCACCAACCCAC (SEQ ID NO: 182)
2381D04	MGVSDVPRDLEVAAATPTSLLI SWEFSLRPGGGEYRITYGET GGNSPLQQFTVPGSKGTATISG LPGVDYTITVYAVEFPYDHSG YYHRPISINYRTEIDKPSQH HH HHH (SEQ ID NO: 183)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGA TCAGCTGGGAGCCGTTACGCCGTTGCCCGGGGGCGGAGTATTACCGGATCATTACGGCGGA AACAGGAGGCAATAGCCCTCTGCAGCAGTTTCACTGTGCCCTGGTTCTAAAGGTACAGCTACCATC AGCGGCCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAAATCCCGTACGACC ATTCTGGTTACTACCATCGGCCCATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAAATTGACAAAACCATCCCCA GCACCATCACCAACCCAC (SEQ ID NO: 184)
2381F11	MGVSDVPRDLEVAAATPTSLLI SWDAPADGGYGYRITYGETGG NSPVQFTVPVSKSTATISGLK PGVDYTITVYAVEYTFPGAGYY HRPISINYRTEIDKPSQH HH HH H (SEQ ID NO: 185)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGA TCAGCTGGGAGCGCTCCGGCTGACGGGGGTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGAGTTCACTGTGCCCTGGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAAATACACCTTCCCGGCGCGG GTTACTACCATCGTCCCATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAAATTGACAAAACCATCCCCAGCACCA TCACCATCACCAACCCAC (SEQ ID NO: 186)

2381G03	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLI SWEPFSRLPGGGEYRITYGET GGENSPLQQTVPVSKGTATISG LKPVDYTITVYAVEFPYAHSG YFHRPISINYRTEIDKPSQHHH HHH (SEQ ID NO: 187)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAA GTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGAGCCGTTTACGCCGTTGCCCGGGGGCGGAGTATTACCGGATCACTTACGGCGGA AACAGGAGGCAATAGCCCTCTGCAGCAGTTTCACTGTGCCTGGTTCTAAAGGTACAGCTACCATC AGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATTCCTCGTACGCGC ATTCTGGGTACTACCATCGTCCGATTTCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCA GCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 188)
2381G09	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLI SWDAPAGDGYRITYGETGG NSPVQEFTVPVSKGTATISGLK PGVDYTITVYAVEFTFPAGYY HRPISINYRTEIDKPSQHHHH H (SEQ ID NO: 189)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAA GTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGAGCGTCCGGCTGGGACGGTTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCCGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATTCACCTTCCCGGGCGCGC GTTACTACCATCGTCCAA TTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCA TCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 190)
2381H03	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLI SWEPFSRLPGGGEYRITYGET GGENSPLQQTVPVSKGTATISG LKPVDYTITVYAVEFPYAHSG YFHRPISINYRTEIDKPSQHHH HHH (SEQ ID NO: 191)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAA GTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGAGCCGTTTACGCCGTTGCCCGGGGGCGGAGTATTACCGGATCACTTACGGCGGA AACAGGAGGCAATAGCCCTCTGCAGCAGTTTCACTGTGCCTGGTTCTAAAGGTACAGCTACCATC AGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATACCCGTACGCGC ATTCTGGTTACTTCCATCGTCCGATTTCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCA GCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 192)

2382A01	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLI SWAAPAGGGYGYRITYGETGG NSPVQEFTVPVSKGTATISGLK PGVDYITIVYAVEYDFPGAGYY HRPISINYRTEIDKPSQHSHHHH H (SEQ ID NO: 193)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGCGCGCTCCGGCTGGTGGCTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCGCTGTTCTAAAGGTACAGTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATACGACTTCCCGGGCGCCG GTTACTACCATCGTCCAAATTCATTTAAATACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCA TCACCACCCAC (SEQ ID NO: 194)
2382B10	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLI SWDAPADAYGYRITYGETGNN SPVQEFTVPSSKGTATISGLKP GVDYITIVYAVEYDFPGS GYYH RPISINYRTEIDKPSQHSHHHH (SEQ ID NO: 195)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCCAGCCTGCTGA TAAGCTGGGACGCTCCGGCTGACGCGTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCGCTAGTTCTAAAGGTACAGTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATACGACTTCCCGGGCAGCGGTT ACTACCATCGTCCAAATTCATTTAAATACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCCAC (SEQ ID NO: 196)
2382B09	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLI SWDAPADAYGYRITYGETGNN SPVQEFTVPVSKGTATISGLKP GVDYITIVYAVEYDFPGS GYYH RPISINYRTEIDKPSQHSHHHH (SEQ ID NO: 197)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGACGCGTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCGCTGTTCTAAAGGTACAGTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATTCGACTACCCCGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAAATTCATTTAAATACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCCAC (SEQ ID NO: 198)

2382C05	MGVSDVPRDLEWVAATPTSLI SWDAPADGAYGYRITYGETGG NSPVQEFTVPVSKGTATISGLK PGVDYTTIVYAVEYDFPGAGYY HRPISINYRTEIDKPSQH HHH H (SEQ ID NO: 199)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGATGGGGCATACGGTTATTACCGCATCATTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTCTAAGGGTACAGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAACTACTCCTTCCCCGGCGCCG GTTACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCA TCACCACCAACCAC (SEQ ID NO: 200)
2382C09	MGVSDVPRDLEWVAATPTSLI SWDAPAEYGYRITYGETGN SPVQEFTVPVSKGTATISGLK GVDYTTIVYAVEYDFPGSGYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHH (SEQ ID NO: 201)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGAGGGTTACGGTTATTACCGCATCATTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCCCTGTTCTAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAAATTCGAAATTCGCGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCA CCACCACCAACCAC (SEQ ID NO: 202)
2382D03	MGVSDVPRDLEWVAATPTSLI SWDAPADEAYGYRITYGETGG NSPVQEFTVPVSKGTATISGLK PGVDYTTIVYAVEYDFPGAGYY HRPISINYRTEIDKPSQH HHH H (SEQ ID NO: 203)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGACGAGGCGTACGGTTATTACCGCATCATTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCCCTGTTCTAAGGTACAGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGGTGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAAATTCGAAATTCGCGGCGCCG GTTACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCA TCACCACCAACCAC (SEQ ID NO: 204)

2382D05	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWDAPADGGYGYRITYGETGG NSPQEFV/PVSKGTATISGLK PGVDYTITVYAVEFDFPGAGYY HRPISINYRTEIDKPSQHSHHH H (SEQ ID NO: 205)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGATGGTGTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCGAAATTCGACTTCCCGGCGCGG GTTACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCA TCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 206)
2382D08	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWDAPADGGYGYRITYGETGGN SPVQEFV/PVSKGTATISGLKP GVDYTITVYAVEFDFPGSGYYH RPISINYRTEIDKPSQHSHHH (SEQ ID NO: 207)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGATGGCTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCGAAATTCGCCCTTCCCGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 208)
2382D09	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWDAPAEYGYRITYGETGGN SPVQEFV/PVSKGTATISGLKP GVDYTITVYAVEFDFPGAGYYH RPISINYRTEIDKPSQHSHHH (SEQ ID NO: 209)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGAAGGTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCGAAATTCGACTTCCCGGCGCGGTT ACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 210)

2382F08	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLI SWDAPAEAYGYRITYGETGNG SPVQEFTVPVSKGTATISGLKP GVDYTITVYAVEFTYPGSGYYH RPI SINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO: 217)	ATGGGAGTTTCTGATGTCCGCGCGGACCTGGAAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCCTGCCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGAAGCATACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCGAATTCACCTACCCCGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAA TTTCCATTAA TACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCACGACCATCA CCACCACCCAC (SEQ ID NO: 218)
2382F09	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLI SWDAPAAAYGYRITYGETGNG SPVQEFTVPVSKGTATISGLKP GVDYTITVYAVEYDFPGS GYYH RPI SINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO: 219)	ATGGGAGTTTCTGATGTCCGCGCGGACCTGGAAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCCTGCCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGCAGCCTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCGAATTCACCTTCCC CGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAA TTTCCATTAA TACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCACGACCATCA CCACCACCCAC (SEQ ID NO: 220)
2382G04	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLI SWDAPAGGGYGYRITYGETGG NSPVQEFTVPSSKGTATISGLK PGVDYTITVYAVEYDFPGAGYY HRPISINYRTEIDKPSQH HHHH H (SEQ ID NO: 221)	ATGGGAGTTTCTGATGTCCGCGCGGACCTGGAAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCCTGCCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGTGGGGGATACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCCTAGTTCCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCGAATTCGACTTCCC CGGCGCCG GTTACTACCATCGTCCAA TTTCCATTAA TACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCACGACCATCA TCACCACCCACCCAC (SEQ ID NO: 222)

2382H10	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLLI SWDAPAGGYGYRITYGETGNN SPVQEFTVPVSKGTATISGLKP GVDYTITVY AVEFDYFGSGYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO: 223)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCCACCAGCC TGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTCGGGGTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGTCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCGAA TTCGACTTCCCGGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAA TTTCCA TTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCACGACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 224)
2382H11	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLLI SWDAPADGYGYRITYGETGNN SPVQEFTVPVFKGTATISGLKP GVDYTITVY AVEFDYFGSGYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO: 225)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCCACCAGCC TGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGATGGTTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGTCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCGAA TTCGACTACCCCGGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAA TTTCCA TTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCACGACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 226)
2382H04	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLLI SWDAPAAAGGYGYRITYGETGG NSPVQEFTVPSSKGTATISGLK PGVDYTITVY AVEYDFPGAGYY HRPISINYRTEIDKPSQH HHHH H (SEQ ID NO: 227)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCCACCAGCC TGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTCGGGGGGTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGTCCTAGTCTTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTATATGCTGTGCGAATACGACTTCCCGGGCGCCG GTTACTACCATCGTCCAA TTTCCA TTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCACGACCATCA TCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 228)

2382H07	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLI SWDAPADAYGYRITYGETGNN SPVQEFVPGSKGTATISGLKP GVDYITIVYAVEFDFFPGSGYYH RPISINYRTEIDKPSQHIIHHH (SEQ ID NO: 229)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGATGCTTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCAGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAAATTCGACTTCCCCGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 230)
2382H09	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLI SWDAPAAAYGYRITYGETGNN SPVQEFVPGSKGTATISGLKP GVDYITIVYAVEFDFFPGSGYYH RPISINYRTEIDKPSQHIIHHH (SEQ ID NO: 231)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGCGGCTTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTAGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAAATTCGACTTCCCCGGCTCCGGTT ACTACCATCGCCCCAAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 232)
2451A02	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLI SWDAPAAAGYGYRITYGETGNN SPVQEFVPGSKGTATISGLKP GVDYITIVYAVEFDFFPGSGYYH RPISINYRTEIDKPSQHIIHHH (SEQ ID NO: 233)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGCGGTTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAAATTCGACTTCCCCGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 234)

2451B05	MGVSDVPRDLEWAAPTSLI SWDAPAGGYGYRITYGETGN SPVQEFTVPSSKGTATISGLK GVDYTTIVYAVEFDYPGSGYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHH (SEQ ID NO: 235)	ATGGGAGTTTCTGATGTCCGCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGGGATACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCGCTAGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATTTCGACTACCCCGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAATTTCCAATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 236)
2451B06 (equivalente a 2382D05)	MGVSDVPRDLEWAAPTSLI SWDAPADGGYGYRITYGETGG NSPVQEFTVPVSKGTATISGLK PGVDYTTIVYAVEFDYFPAGYY HRPISINYRTEIDKPSQH HHH H (SEQ ID NO: 205)	ATGGGAGTTTCTGATGTCCGCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGATGGTTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCGCTGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATTTCGACTTCCCGGGCGCG GTTACTACCATCGTCCAATTTCCAATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCA TCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 206)
2451C06	MGVSDVPRDLEWAAPTSLI SWDAPAGAASYGYRITYGETG GNSPVQEFTVPVSKGTATISGL KPGVDYTTIVYAVEFPFPAGY YHRPISINYRTEIDKPSQH HHH HH (SEQ ID NO: 237)	ATGGGAGTTTCTGATGTCCGCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGGCGAGCGTCTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAAC AGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCGCTGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGC GGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATTCCCTTCCCGGGCG CCGGTTACTACCATCGTCCAATTTCCAATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCA CCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 238)

2451D05	MGVSDVPRDLEVVAA TPTSLLI SWDAPAGAGYYRITYGETGGN SPVQEFTVPVSKGTATISGLKP GVDYTIIVYAVEFDFFPGSGYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO: 239)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGCGGTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATTCGACTTCCCGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAA TTTCCATTAA TTACCGCACAGAAA TTGACAAA ACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 240)
2451F03	MGVSDVPRDLEVVAA TPTSLLI SWDPPAEGYGYRITYGETGGN SPVQEFTVPVSKGTATISGLKP GVDYTIIVYAVEFNFPFGSGYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO: 241)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACCCCTCCGGCTGAAGGTTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATTCAACTTCCCGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAA TTTCCATTAA TTACCGCACAGAAA TTGACAAA ACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 242)
2451G01	MGVSDVPRDLEVVAA TPTSLLI SWDAPAGGYGYRITYGETGGN SPVQEFTVPSSKGTATISGLKP GVDYTIIVYAVEFDFFPGSGYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO: 243)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGGGCTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCTAGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATTCGACTTCCCGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAA TTTCCATTAA TTACCGCACAGAAA TTGACAAA ACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 244)

2451H07	MGITDVPRDLEWAA TPTSLI SWNPPDVNYGYRITYGETGNN SPLQEFTVPVSKGTATISGLK GVDY TITVYAVEYPYAHAGYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO:245)	ATGGGTATACGGATGTCCGCGGAGACTTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCCAGCCTGCTGA TCAGCTGGAACCCGCGGATGTGAATTACGGTTATTATCGCATCAC TTACGGGGAACAGGAGG CAATAGCCCTTTGCAGGAGTTCACTGTCCTGTTCTTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATATCCGTACGCGACGCTGGTT ACTACCATCGTCCGATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO:246)
2382E03	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLI SWDAPAGDGYGYRITYGETGG NSPVQEFTVPVSKGTATISGLK PGVDY TITVYAVEFDFFGAGYY HRPISINYRTEIDKPSQH HHHH H (SEQ ID NO:247)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGGACGGGTACGGTTATTACCGCATCAC TTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCTGTTCTTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATTCGACTTCCCCGGCGCCG GTTACTACCATCGTCCAA TTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCA TCACCACCACCAC (SEQ ID NO:248)
2382E04	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLI SWDAPAGGGYGYRITYGETGG NSPVQEFTVPVSKGTATISGLK PGVDY TITVYAVEFTFPAGYY HRPISINYRTEIDKPSQH HHHH H (SEQ ID NO:249)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGTGGATACGGTTATTACCGCATCAC TTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCTGTTCTTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATTCACCTTCCCCGGCGCCG GTTACTACCATCGTCCAA TTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCA TCACCACCACCAC (SEQ ID NO:250)

2382E05	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLI SWDAPAEAGGYGYRITYGETGG NSPVQEFTVPVSKGTATISGLK PGVDYTTIVYAVEFDFFPGAGYY HRPISINYRTEIDKPSQH HHH H (SEQ ID NO: 251)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGAGGGCGGCTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAAATTCGACTTCCCGGCGCGG GTTACTACCATCGTCCAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCA TCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 252)
2382E09	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLI SWDAPAEAGGYRITYGETGNN SPVQEFTVPVSKGTATISGLKP GVDYTTIVYAVEYDFPGS GYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHH (SEQ ID NO: 253)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGAGGCTTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAAATACGACTTCCCGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 254)
2381A04	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLI SWEPFSRLPGGGEYYRITYGET GGNSPLQQFTVPGSKGTATISG LKP GVDYTTIVYAVEYYPFSG YYHRPISINYRTEIDKPSQH HHH HHH (SEQ ID NO: 255)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGAGCCGTTACGCCGGTTGCCCGGGCGGCGAGTATTACCGGATCACTTACGGCGGA AACAGGAGGCAATAGCCCTCTGCAGCAGTTCACCTGTGCCTGGTTCTAAAGGTACAGCTACCATC AGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAAATACCCGTACCCGT TTTCTGGTTACTACCATCGTCCCAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCA GCACCATCAACCACCACCAC (SEQ ID NO: 256)

2381A08	MGVS DVPRD LEVVAATPTSLI SWDAPADGGYGYRITYGETGG NSPVQEFTVPVSKGTATISGLK PGVDYTITVYAVEYDFPGAGYY HRPISINYRTEIDKPSQH HHH H (SEQ ID NO: 257)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAA GTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGACGGCGGGTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCTGGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGGAATACGACTTCCCGGGCGCCG GTTACTACCATCGTCCAA TTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCGAGCACCA TCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 258)
2381B10	MGVS DVPRD LEVVAATPTSLI SWDAPAGGGYGYRITYGETGG NSPVQEFTVPVSKGTATISGLK PGVDYTITVYAVEYNFIGAGYY HRPISINYRTEIDKPSQH HHH H (SEQ ID NO: 259)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAA GTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGGGTGGATACGGTTATTACCGSATCACTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCTGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGGAATACAACTTTCATCGGGCGCCG GTTACTACCATCGTCCAA TTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCGAGCACCA TCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 260)
2381C08	MGVS DVPRD LEVVAATPTSLI SWDAPADGAYGYRITYGETGG NSPVQEFTVPVSKGTATISGLK PGVDYTITVYAVEFPYFAGYY HRPISINYRTEIDKPSQH HHH H (SEQ ID NO: 261)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAA GTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGACGGTGCCTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCTGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGGAATTCCTTACCCCTTCGCCG GTTACTACCATCGTCCAA TTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCGAGCACCA TCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 262)

2381G06	MGVSDVPRDLEVVAA TPTSLI SWSEKLDGKARRGYYRITYGET GGNSPVQQFTVPGSKGTATISG LKPGVDYTTITVYAVEFPYDHS YYHRPISINYRTEIDKPSQHHH HHH (SEQ ID NO: 263)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGA TCAGCTGGTCGGAGAA GTTGACGGGAAGGCGCGCGGGTATTACCGCATCACATACGGCGA AACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGCAGTTCACTGTGCCTGGTTCTAAAGGTACAGCTACCATC AGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATTCCTCGTACGACC ATTCTGGTTACTACCATCGTCCCATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCA GCACCATCACCAACCAC (SEQ ID NO: 264)
2381H01	MGVSDVPRDLEVVAA TPTSLI SWSPRDSTGLVRRGYYRITYGE TGGNSPVQQFTVPGSKGTATIS GLKPGVDYTTITVYAVEFPYDHS YYHRPISINYRTEIDKPSQHH HHH (SEQ ID NO: 265)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGA TCAGCTGGAGCCCGGGACTCCACCGGCTTGGTGAGCGGGGTATTACCGCATCACTTACCG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTTCAGCAGTTCACCTGTGCCTGGTTCTAAAGGTACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATACCCGTACG ACCATTCGTGTTACTACCATCGGCCCATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATC CCAGCACCATCACCAACCAC (SEQ ID NO: 266)
2381H06	MGVSDVPRDLEVVAA TPTSLI SWGDRVTRNEARQGYRITYGET GGNSPLQGFVPGSKGTATISG LKPGVDYTTITVYAVEYTYEHS YYHRPISINYRTEIDKPSQHHH HHH (SEQ ID NO: 267)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGA TCAGCTGGGGCGACGTCCGGACGAACGAGCGCGGAGGGCTATTACCGGATCACTTACGGCGA AACAGGAGGCAATAGCCCTCTCCAGGGTTCACCTGTGCCTGGTTCTAAAGGTACAGCTACCATC AGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATACGTACGAGC ATTCTGGTTACTACCATCGTCCGATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCA GCACCATCACCAACCAC (SEQ ID NO: 268)

2381H09	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLI SWDAPAGGGYGYRITYGETGG NSPVQEFTVPVSKGTATISGLK PGVDYTTIVYAVEFDVFGAGYY HRPISINYRTEIDKPSQH HHH H (SEQ ID NO: 269)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGGGGGCTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAAATTCGACTTCGTCGGCGCCG GTTACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAAATACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCCAGCACCA TCACCACCACAC (SEQ ID NO: 270)
2382B11	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLI SWDAPAAA YGYRITYGETGN SPVQEFTVPVSKGTATISGLK GVDYTTIVYAVEYDFAGS GYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHH (SEQ ID NO: 271)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGGGCTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATACGACTTCGCGGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAAATACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 272)
2382B08	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLI SWDAPADAYGYRITYGETGN SPVQEFTVPSSKGTATISGLK GVDYTTIVYAVEFAFPAGAGYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHH (SEQ ID NO: 273)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGACGCGTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTAGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTATATGCTGTCGAATTCGCCCTTCCCGGGCGCCGGTT ACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAAATACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 274)

2382C11	MGVSDVPRDLEWAAPTSLI SWDAPAGGYGYRITYGETGN SPVQEFTVPVSKGTATISGLK GVDYTIIVYAVEYDFAGS GYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHH (SEQ ID NO: 275)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGAGGTTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATACGACTTCGCGGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 276)
2382G03	MGVSDVPRDLEWAAPTSLI SWDAPAEAEAYGYRITYGETG GNSPVQEFTVPVSKGTATISGL KPGVDYTIIVYAVEYVFPAGY YHRPISINYRTEIDKPSQH HHH HH (SEQ ID NO: 277)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGAAGCAGAAGCGTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAAC AGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGC GGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATACGTCCTTCCCGCGCG CCGGTTACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCA CCATCAACCACCACCAC (SEQ ID NO: 278)
2382H03	MGVSDVPRDLEWAAPTSLI SWDAPAEAGYGYRITYGETGG NSPVQEFTVPVSKGTATISGLK PGVDYTIIVYAVEYYPFAGY HRPISINYRTEIDKPSQH HHH H (SEQ ID NO: 279)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGAGGGCGCTTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATACCCCTACCCCTTCGCCG GTTACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCA TCACCACCACCAC (SEQ ID NO: 280)

2451A10	MGVTDVPRDMEVAAAPTSLI SWQPPAVTYGYRITYGETGGN STLQQFTVPYKGTATISGLKP GVDYTIIVYAVEYPYDHS GYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO:281)	ATGGGTGTACCGATGTGCCGCGCGACATGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCGCCTGCTGA TCAGCTGGCAGCCGCGGCTGTACTTACGGTTATTATCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCACTCTCCAGCAGTTCACTGTGCCTGTTTATAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATACCCGTACGACCATTTCTGGGT ACTACCATCGGCCGATTTCCATTAAATACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO:282)
2451B02	MGVSDVPRDLEWAAAPTSLI SWDAPAAAYGYRITYGETGGN SPVQEFTVPVSKGTATISGLKP GVDYTIIVYAVEFDYPGSGYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO:283)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTGCTGCTTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATTCGACTACCCCGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAAATTTCCATTAAATACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO:284)
2451C11	MGIVDVPRLDLEWAAAPTSLI SWDPPAGAYGYRITYGETGGN SPKQQFTVPYKGTATISGLKP GVDYTIIVYAVEYPYDHS GYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO:285)	ATGGGTATCGTGGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCGCCTGCTGA TCAGCTGGGACCCGCGGCTGGTGCTTACGGTTATTATCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCCAAAGCAGCAGTTCACTGTGCCTGGTTATAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATACCCGTACGACCATTTCTGGTT ACTACCATCGGCCGATTTCCATTAAATACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO:286)

2451H01	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLLI SWDAPAAAGYGYRITYGETGNN SPVQEFTVPVSKGTATISGLKP GVDY TITVY AVEYDFPGS GYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO: 287)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCTCCGGCTCGGGGTACGGTTATTACCGCATCAGCTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATACGACTTCCCGGGCTCCGGTT ACTACCATCGTCCAA TTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCGAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 288)
2011B11	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLLI SWAPPSDAYGYRITYGETGNN SPVQEFTVPIGKGTATISGLKP GVDY TITVY AVEYPYSHAGYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO: 289)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGCGCGCCCTTCTGATGCGTACGGTTATTACCGCATCAGCTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTATTGGTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATACCGTATTCACATGCTGGTT ACTACCATCGTCCAA TTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCGAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 290)
2971A03	MGVSDVPRDLEWAA TPTSLLI SWDPPSDDYGYRITYGETGNN SPVQEFTVPIGKGTATISGLKP GVDY TITVY AVEFPWPHAGYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO: 304)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACCCGCCCTTCGGATGATTACGGTTATTACCGCATCAGCTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTATTGGTAAAGGAACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAGTTTCCGTGGCCACATGCTGGTT ACTATCATCGGCCAA TTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCGAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 305)

2971A09	MGVSDVPRDLEVAAATPTSLI SWDAPADDYGYRITYGETGGN SPVQEFTVPIGKGTAISGLKP GVDYTTIVYAVEFPWPHAGYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO: 306)	ATGGGAGTTTCTGATGTCCCGCGGACCTGGAA GTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCGCCTGCGGATGATTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTATTGGTAAAGGAACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAGTTTCCGTGGCCACATGCTGGTT ACTATCATCGGCAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 307)
2971E02	MGVSDVPRDLEVAAATPTSLI SWDAPSDDYGYRITYGETGGN SPVQEFTVPIGKGTAISGLKP GVDYTTIVYAVEFPWPHAGYYH RPISINYRTEIDKPSQH HHHH (SEQ ID NO: 308)	ATGGGAGTTTCTGATGTCCCGCGGACCTGGAA GTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGA TCAGCTGGGACGCGCCTTCGGATGATTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTATTGGTAAAGGAACAGCTACCATCAGCGGCCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGAGTTTCCGTGGCCACATGCTGGTT ACTATCATCGGCAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 309)

Las SEQ ID NO de la familia de Adnectinas anti-PCSK9 de la invención se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5

Familia de Adnectinas anti-PCSK9 mutantes en cisteína para hacer posible la pegilación		
Nº de ATi / nº Clon [Descripción]	Secuencia	
	AA	NT
ATI001170 [2013E01-no marcado con His. Cys mut]	MGVSDVPRDLEWAAIPTSL LISWPPSDDYGYRITYGE TGNPSVQEFVPIGKGAT ISGLKPGVDYITIVYAVEFP WPHAGYYHRPISINYRTEID KPCQ (SEQ ID NO:78)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGAT CAGCTGGGTCCCGCCTTCAGATGATTACGGTTATTACCGCATCACATTACGGCGAAACAGGAGGCA ATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCCTATTGGTAAAGGAACAGCTACCATCAGCGGCCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAGTTTCCGTGGCCACATGCTGGTTACTA TCATCGGCCCAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATGCCAGTG (SEQ ID NO:79)
ATI001172 [2013E01-no marcado con His. Cys mut]	MGVSDVPRDLEWAAIPTSL LISWPPSDDYGYRITYGE TGNPSVQEFVPIGKGAT ISGLKPGVDYITIVYAVEFP WPHAGYYHRPISINYRTEGS GC (SEQ ID NO:80)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGAT CAGCTGGGTCCCGCCTTCAGATGATTACGGTTATTACCGCATCACATTACGGCGAAACAGGAGGCA ATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCCTATTGGTAAAGGAACAGCTACCATCAGCGGCCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAGTTTCCGTGGCCACATGCTGGTTACTA TCATCGGCCCAATTTCCATTAAATTACCGAACAGAAAGGTAGCGGTTGCTG (SEQ ID NO:81)
ATI001174* [2013E01-no marcado con His. Cys mut] Al que también se hace referencia como ATI-1174	MGVSDVPRDLEWAAIPTSL LISWPPSDDYGYRITYGE TGNPSVQEFVPIGKGAT ISGLKPGVDYITIVYAVEFP WPHAGYYHRPISINYRTEIE KPCQ (SEQ ID NO:82)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGAT CAGCTGGGTCCCGCCTTCAGATGATTACGGTTATTACCGCATCACATTACGGCGAAACAGGAGGCA ATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCCTATTGGTAAAGGAACAGCTACCATCAGCGGCCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAGTTTCCGTGGCCACATGCTGGTTACTA TCATCGGCCCAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGAGAAACCATGCCAGTG (SEQ ID NO:83)

AT1001114* [2013E01 mut Cys] Al que se también hace referencia como ATL-1114	MGVS DVP RDLE VVAATPTSL LISWPPSDDYGYRITYGE TGGNSPVQEFTVPIGKTAT ISGLKPGVDYITIVYAVEFP WPHAGYYHRPISINYRTGSG CHHHHHH (SEQ ID NO:84)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGAT CAGCTGGGTCCGCCCTTCAGATGATTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCA ATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCCTATTGGTAAAGGAACAGCTACCATCAGCGGCCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACGTGTATGCTGTCTGAGTTTCCGTGGCCACATGCTGGTTACTA TCATCGGCCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO:85)
AT1000959* [1459D05 mut cys]	MGVS DVP RDLE VVAATPTSL LISWPPPSHGYGYRITYGE TGGNSPVQEFTVPPGKGTAT ISGLKPGVDYITIVYAVEYP YKHS GYYHRPISINYRTEID KPCQH HHHH (SEQ ID NO:86)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGAT CAGCTGGCCGCCGCCGTCTCATGTGTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCA ATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCGCCCTGGTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACGTGTATGCTGTCTGCAATACCCGTACAAACA TTCTGGTTACTA CCATCGTCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATGCCAGCACCATCACACC ACCAC (SEQ ID NO:87)
AT1001063* [1784F03 mut Cys]	MGVS DVP RDLE VVAATPTSL LISWRPPIHAYGYRITYGE TGGNSPVQEFTVPIVEGTAT ISGLKPGVDYITIVYAVEYT FKHS GYYHRPISINYRTEID KPCQH HHHH (SEQ ID NO:88)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGAT CAGCTGGAGGCCGCCGATTATGCTTACGGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCA ATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCCTATTGTTGAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACGTGTATGCTGTCTGCAATATACATTTAAACATTTCCGGTTACTA CCATCGTCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATGCCAGCACCATCACACC ACCAC (SEQ ID NO:89)

AT1001119* [2012A04Cysmut]	MGVSDVPRDLEWAA TPTSL LISWRPPSNGHGYRITYGE TGGNSPVQEF TVPVNEG TAT ISGLKPGVDY TITVYAVEFP FKWSGYH RPI SINYRTGSG CHHHHHH (SEQ ID NO:90)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCCTGCTGAT CAGCTGGCGGCCCCCTCTAATGGTCA CGGTATTACCGCATC ACTTACGGCGAAACAGGAGGCA ATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTAATGAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATCCCCCTTCAAGTGGTCGGGGCTACTA CCATCGACCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO:91)
AT1001117* [2011H05Cysmut]	MGVSDVPRDLEWAA TPTSL LISWVPSSHAYGYRITYGE TGGNSPVQEF TVPVGVGTAT IS GLKPGVDY TITVYAVEYA FEGAGYYH RPI SINYRTGSG CHHHHHH (SEQ ID NO:92)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCCTGCTGAT CAGCTGGGTTCCGTCGTCCTCATGCCTACGGTTATTACCGCATC ACTTACGGCGAAACAGGAGGCA ATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTGGGGTAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATACGCTTTCGAAGGGGCTGGTTACTA CCATCGTCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO:93)
AT1001194* [2011H05(V23D) Cys mut]	MGVSDVPRDLEWAA TPTSL LISWDPSSHAYGYRITYGE TGGNSPVQEF TVPVGVGTAT IS GLKPGVDY TITVYAVEYA FEGAGYYH RPI SINYRTEGS GCHHHHHH (SEQ ID NO:94)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCCAGCCTGCTGAT CAGCTGGGACCCGTCGTCCTCATGCCTACGGTTATTACCGCATC ACTTACGGCGAAACAGGAGGCA ATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTGGGGTAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAATACGCTTTCGAAGGGGCTGGTTACTA CCATCGTCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGGAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO:95)

2011H05(V23E)- Cysmut	MGVSDVPRDLEWAA TPTSL LISWEPSSHAYGYRITYGE TGGNSPVQEF TVPVGVTAT IS GLKPGVDYTITVYAVEYA FEGAGYYHRPISINYRTEGS GCHHHHH (SEQ ID NO:96)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGAT CAGCTGGGAACCGTCGTCTCATGCCTACGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCA ATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCTGCTGGGGTAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATACGCTTTCGAAGGGGCTGGTTACTA CCATCGTCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGAAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO:97)
AT1001112 [1923B02Cysmut]	MGVSDVPRDLEWAA TPTSL LISWTPPPKGYGYRITYGE TGGNSPVQEF TVPVGEGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEYT YNGAGYYHRPISINYRTGSG CHHHHHH (SEQ ID NO:98)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGAT CAGCTGGACGCCCTCCCTTAAAGGGTATGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCA ATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCTGCTGGTGAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATACAGTACAACGGTGCCGGTTACTA CCACCGGCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO:99)
AT1001110 [1922G04Cysmut]	MGVSDVPRDLEWAA TPTSL LISWRPPSHAYGYRITYGE TGGNSPVQEF TVPIGKGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEYP WKGSGYYHRPISINYRTGSG CHHHHHH (SEQ ID NO:100)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGAT CAGCTGGCGGCCGCCATCTCATGCTTATGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCA ATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGCTGCTGGTGAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATACCGTGGAAGGTTCTGGTTACTA CCATCGGCCAAATTTCCATTAAATTACCGCACAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO:101)

AT1001128 [1922G04Cysmut]	MGVSDVPRDLEWAA TPTSL LISWRPPSHAYGYRITYGE TGNSPVQEFVPIGKGAT ISGLKPGVDY TITVYAVEYP WKGSGYYHRPISINYRTEID KPCQH HHHH (SEQ ID NO: 102)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGAT CAGCTGGCGGCGCCATCTCATGCTTATGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCA ATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGTCCTATTGGGAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATACCCGTGGAAGGTTCTGGTTACTA CCATCGGCCAA TTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATGCCAGCATCACCACCAACC ACCAC (SEQ ID NO: 103)
AT1001184* [1922G04(R23E) Cys mut]	MGVSDVPRDLEWAA TPTSL LISWEPPSHAYGYRITYGE TGNSPVQEFVPIGKGAT ISGLKPGVDY TITVYAVEYP WKGSGYYHRPISINYRTEGS GCHHHHHH (SEQ ID NO: 104)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGAT CAGCTGGGAACCGCATCTCATGCTTATGGTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCA ATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACGTGTCCTATTGGGAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATACCCGTGGAAGGTTCTGGTTACTA CCATCGGCCAA TTTCCATTAATTACCGCACAGAAAGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO: 105)
2381D04-Cys	MGVSDVPRDLEWAA TPTSL LISWEFSLRPGGEYRIT YGETGNSPLQQFTVPGSKG TATISGLKPGVDY TITVYAV EFPYDHSGYYHRPISINYRT GSGCHHHHHH (SEQ ID NO: 291)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACAGCCTGCTGAT CAGCTGGGAGCCGTTACGCCGTTGCCCGGGCGCGAGTATTACCGGATCACTTACGGCGGAAA CAGGAGGCAATAGCCCCTCTGCAGCAGTTCACGTGCCCTGGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGC GGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATTCGCCGTACGACCATTC TGGTTACTACCATCGGCCCA TTTCCATTAATTACCGCACAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCC ATCAC (SEQ ID NO: 292)

2382D09-Cys	MGVSDVPRDLEWAAPTSL LISWDAPAEAGYGYRITYGE TGNSPVQEFV/PVSKGTAT ISGLKPGVDYTITVYAVEFD FPGAGYYHRPISINYRTGSG GCHHHHHH (SEQ ID NO: 293)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGAT CAGCTGGGACGCTCCGGCTGAAGGTACGGTTATTACCGCATCATTACGGCGAAACAGGAGCA ATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAAATTCGACTTCCCGGCGCCGGTTACTA CCATCGTCCAAATTTCCATTAAATACCGCACAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO: 294)
245IB06-Cys	MGVSDVPRDLEWAAPTSL LISWDAPADGGYGYRITYG ETGNSPVQEFV/PVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEF DFPGAGYYHRPISINYRTGS GCHHHHHH (SEQ ID NO: 295)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGAT CAGCTGGGACGCTCCGGCTGATGGTTACGGTTATTACCGCATCATTACGGCGAAACAGGAG GCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCTGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAAATTCGACTTCCCGGCGCCGGTTA CTACCATCGTCCAAATTTCCATTAAATACCGCACAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO: 296)
2382E05-Cys	MGVSDVPRDLEWAAPTSL LISWDAPAEAGYGYRITYG ETGNSPVQEFV/PVSKGTA TISGLKPGVDYTITVYAVEF DFPGAGYYHRPISINYRTGS GCHHHHHH (SEQ ID NO: 297)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGAT CAGCTGGGACGCTCCGGCTGAGGGCGGCTACGGTTATTACCGCATCATTACGGCGAAACAGGAG GCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCTGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCGAAATTCGACTTCCCGGCGCCGGTTA CTACCATCGTCCAAATTTCCATTAAATACCGCACAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO: 298)

2382B09-Cys	MGVSDVPRDLEWAA TPTSL LISWDAPADAYGYRITYGE TGNSPVQEFTVPVSKGTAT ISGLKPGVDYITIVYAVEFD YPGSGYYHRPISINYRTGSG CHHHHHH (SEQ ID NO: 299)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCGCGCGACCTGGAAAGTGTTGCTGCCACCCCCCACCAGCCTGCTGAT CAGCTGGGACGCTCCGGCTGACGCGTACGGTTATTACGCGATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCA ATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCTGTTTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGCGAAATTCGACTACCCCGGCTCCGGTTACTA CCATCGTCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCATCAC
-------------	--	--

* Nota: Algunas proteínas enumeradas no se habían pegilado aun pero era posible pegilarias mediante la mutación en cisteína. Las proteínas que se habían pegilado se indican con un asterisco.

Tecnología de fusión de ácido nucleico- proteína

En un aspecto la solicitud proporciona una Adnectina que comprende dominios de fibronectina tipo III que se une a la PCSK9. Una manera para producir y ensayar los dominios Fn3 con propiedades de unión específicas es la tecnología de fusión de ácido nucleico-proteína de Adnexus, una Compañía de Bristol-Myers R&D. Esta divulgación utiliza la expresión *in vivo* y la tecnología de marcado, denominada 'PROfusion' que aprovecha las fusiones de ácido nucleico-proteína (de fusiones ARN y ADN-proteína) para identificar nuevos polipéptidos y motivos de aminoácidos que son importantes para la unión a proteínas. La tecnología de fusión ácido nucleico-proteína es una tecnología que acopla covalentemente una proteína a su información genética codificante. Para una descripción detallada de la tecnología de fusión ARN- proteína y métodos de exploración en la biblioteca de proteínas de armazón basadas en fibronectina véase Szostak et al, Patentes de EE. UU. N.º 6.258.558, 6.261.804, 6.214.553, 6.281.344, 6.207.446, 6.518.018 y 6.818.418; y Roberts et al., Proc. Natl Acad. Sci, 94:12297-12302 (1997).

Realizaciones de vectores y polinucleótidos

Los ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las distintas proteínas o polipéptidos desvelados en el presente documento se pueden sintetizar químicamente. El uso del codón se puede seleccionar de manera que se mejore la expresión en una célula. Dicho uso del codón dependerá del tipo celular seleccionado. Los patrones de uso especializado del codón se han desarrollado para *E. coli* y otras bacterias, así como para células de mamífero, células vegetales, células de levaduras y células de insecto. Véase por ejemplo, Mayfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(2):438-442 (Jan. 21, 2003); Sinclair et al., Protein Expr. Purif., 26(1):96-105 (Oct. 2002); Connell, N.D., Curr. Opin. Biotechnol, 12(5):446-449 (Oct. 2001); Makrides et al., Microbiol. Rev., 60(3):512-538 (Sep. 1996); y Sharp et al, Yeast, 7(7):657-678 (Oct. 1991).

Las técnicas generales para la modificación de ácidos nucleicos se describe por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), o Ausubel, F. et al, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing y Wiley-Interscience, New York (1987) y actualizaciones periódicas. En general, el ADN que codifica el polipéptido se une operativamente a elementos reguladores adecuados de la transcripción o traducción derivados de genes de mamífero, víricos o de insecto. dichos elementos reguladores incluyen un promotor de la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios en el ARNm de unión al ribosoma, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. La capacidad para replicarse en un huésped, habitualmente conferida por un origen de replicación, y se incorpora adicionalmente un gen indicador para facilitar el reconocimiento de los transformantes.

Las proteínas que se describen en el presente documento se pueden producir de manera recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia de señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduros. La secuencia de señal heteróloga seleccionada es preferentemente la se reconoce y procesa (es decir, se escinde por una peptidasa de señal) por la célula huésped. Una secuencia líder del extremo N para la producción de polipéptidos en un sistema de mamífero es METDTLLLVLLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 326), que se elimina por la célula huésped después de la expresión.

Para las células huésped procariotas que no reconocen y procesan una secuencia de señal nativa, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia de señal procariota seleccionada, por ejemplo, de entre el grupo de fosfatasa alcalina, penicilasa, lpp, o líderes de enterotoxina II estable al calor.

Para la secreción en levaduras la secuencia de señal nativa se puede sustituir, por ejemplo, por la invertasa líder de levadura, un factor líder (que incluye líder de factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en la Patente de EE. UU. N.º 5.631.144. En la expresión en células de mamífero, están disponibles las secuencias de señal de mamífero, así como, los líderes secretorios víricos, por ejemplo, la señal gD de herpes simple. El ADN de dichas regiones precursoras se puede ligar en la fase de lectura al ADN que codifica la proteína.

Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que hace posible que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. En general, en los vectores de clonación esta secuencia es la que hace posible que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye los orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias se conocen bien para varias bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación de plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gramnegativas, el origen plasmídico de 2 micrómetros es adecuado para levaduras y distintos orígenes víricos (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamífero. En general el componente origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión en mamífero (el origen SV40 puede utilizarse normalmente solo debido a que contiene el promotor temprano).

Los vectores de expresión y de clonación pueden contener un gen de selección, también llamado un gen indicador. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por

ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) deficiencias de complemento auxotrófico, o (c) suministro de nutrientes críticos no disponibles en el medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilos*.

- 5 Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que es reconocido por los organismos huésped y está unido operativamente al ácido nucleico que codifican la proteína de la invención, por ejemplo, una proteína de armazón basado en fibronectina. Los promotores adecuados para su uso en huéspedes procariotas incluyen el promotor *phoA*, sistemas de promotor beta-lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*), y promotores híbridos tales como el promotor *tan*. Sin embargo, son adecuados otros
- 10 promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica la proteína de la invención. Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Virtualmente, todos los genes de eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases corriente arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia que se encuentra 70 a 80 bases corriente arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una
- 15 región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 30 de la mayoría de los genes de eucariota hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola Poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en los vectores de expresión en eucariotas.

- 20 Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso en levaduras huésped incluyen los promotores de la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasas, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucocinasa.

- 25 La transcripción a partir de vectores en células huésped de mamífero se puede controlar, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus polio, virus de viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y más preferentemente el virus de Simio 40 (SV40), a partir de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, a partir de promotores de choque térmico, a condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

- 30 La transcripción de un ADN que codifica las proteínas de la invención por eucariotas superiores a menudo aumenta insertando una secuencia amplificadora en el vector. Se conocen ahora muchas secuencias amplificadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Normalmente, sin embargo, se utilizará un amplificador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen al amplificador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el amplificador del promotor temprano del citomegalovirus, el amplificador del polio en el lado tardío del origen de replicación, y amplificadores de adenovirus. Véase también, Yaniv, *Nature*, 297:17-18 (1982) sobre los elementos amplificadores para la activación de promotores de eucariotas. El amplificador puede cortarse y pegarse en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia que codifica el péptido, pero se localiza preferentemente en el sitio 5' del promotor.

- 40 Los vectores de expresión utilizando en las células huésped eucariotas (por ejemplo, de levadura, hongo, insecto, planta, animal, ser humano, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) contendrán también las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles comúnmente de regiones 5' y, ocasionalmente 3' no traducidas de ADN o ADNc víricas. Estas
- 45 regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducidas del ARN m que codifica la proteína de la invención. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO 94/11026 y el vector de expresión desvelado en el presente documento.

- 50 El ADN recombinante también puede incluir cualquier tipo de secuencia marcadora proteica que pueda ser útil para la purificación de la proteína. Ejemplos de marcadores proteicos incluyen, pero no se limitan a, marcador de histidina, un marcador FLAG, un marcador myc, un marcador HA, o un marcador GST. Los vectores de expresión y clonación apropiados para su uso en huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, de levaduras, y de mamífero se pueden encontrar en *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, (Elsevier, New York (1985)).

- 55 La construcción de expresión se introduce en la célula huésped utilizando un método apropiado para la célula huésped, como será evidente para un experto en la técnica. Se conoce varios métodos para la introducción de ácidos nucleicos en las células huésped, que incluyen, pero no se limitan a electroporación; transfección empleando cloruro cálcico, cloruro de rubidio, fosfato cálcico, DEAE-dextrano, u otras sustancias, bombardeo con microproyectiles; lipofección; e infección (cuando el vector es un agente infeccioso).
- 60

- Las células huésped adecuadas incluyen procariotas, levaduras, células de mamífero, o células bacterianas. Las bacterias adecuadas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *E. coli*, o *Bacillus* spp. Levaduras preferentemente de especies de *Saccharomyces*, tales como *S. cerevisiae*, también se pueden utilizar para la producción de polipéptidos. Se pueden emplear distintos sistemas de cultivo celular de mamífero o insecto también para expresar proteínas recombinantes. Se revisan los sistemas de Baculovirus para la producción de
- 65

proteínas heterólogas en células de insecto por Luckow et al. (Bio/Technology, 6:47 (1988)). Ejemplos de líneas celulares huésped adecuadas incluyen células endoteliales, células de riñón de mono COS-7, CV-1, células L, C127, 3T3, líneas celulares ováricas de hámster chino (CHO), células embrionarias de riñón humano, HeLa, 293 293T, y BHK. Los polipéptidos purificados se preparan cultivando sistemas huésped/vector adecuados para expresar las proteínas recombinantes. Para muchas aplicaciones, el tamaño pequeño de muchos de los polipéptidos desvelados en el presente documento produciría la expresión en *E. coli* como método preferido de expresión. La proteína se purifica entonces del medio de cultivo o extractos celulares.

Producción proteica

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos en el presente documento para la producción proteica y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para la inducción de promotores, selección de transformantes, o amplificación de genes que codifican las secuencias deseadas. En los ejemplos que se muestran en el presente documento, las células huésped utilizadas para la producción proteica de alto rendimiento (HTPP) y producción a escala media era la cepa bacteriana HMS174. Las células huésped utilizadas para producir las proteínas de la presente invención se pueden cultivar en varios medios. Los medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Mínimo Esencial ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para el cultivo de células huésped. Además, se pueden utilizar muchos de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enzymol., 58:44 (1979), Barites et al., Anal Biochem., 102:255 (1980), Patentes de EE. UU. N.º 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655, 5.122.469, 6.048.728, 5.672.502, o Patente de EE. UU. RE30.985 como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede suplementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como un fármaco con Gentamicina), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. cualquier otro suplemento necesario también se puede incluir en concentraciones apropiadas que son conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son los utilizados previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y será evidente para el experto habituado en la técnica.

Las proteínas desveladas en el presente documento también se pueden producir utilizando sistemas de traducción celular. Para dichos fines los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido se deben modificar para permitir la transcripción *in vitro* para producir ARNm y para permitir la traducción celular libre del ARNm en el sistema celular libre que se utilice (en eucariotas tal como un sistema de traducción celular libre de mamífero o en levaduras o en procariotas tal como un sistema de traducción celular libre bacteriano).

Las proteínas de la invención también se pueden producir por síntesis química (por ejemplo, por los métodos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª Edición, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984)). Las modificaciones en la proteína también se pueden producir por síntesis química.

Las proteínas de la presente invención se pueden purificar por métodos de aislamiento/purificación para las proteínas que se conoce en general en el campo de la química proteica. Ejemplos no limitantes incluyen, extracción, recristalización, precipitación en presencia de sales (por ejemplo, con sulfato amónico o sulfato sódico), centrifugación, diálisis, ultrafiltración, cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de fase normal, cromatografía de fase inversa, filtración en gel, cromatografía de penetración en gel, cromatografía de afinidad, electroforesis, distribución contracorriente o cualquier combinación de estas. Después de la purificación, los polipéptidos se pueden intercambiar en diferentes tampones y/o concentrarse por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, filtración y diálisis.

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

Se utilizó un procedimiento de fabricación en plataforma para preparar la Adnectina anti-PCSK9. La Adnectina anti-PCSK9 se produce en *Escherichia coli* (*E. coli*). Se transformaron las células de *E. coli* BLR (DE3) con el vector de expresión (pET9d/ATI001173) que produce la proteína en una forma soluble intracelularmente. La cepa recombinante se cultiva en fermentadores en contenedores con agitado. Al final de la fermentación, se recolectaron las células, se lisaron y clarificaron en la preparación para la purificación. El ATI001173 es una versión no marcada con His de ATI001114. La Adnectina anti-PCSK9 purificada se conjuga con un metoxiPEG ramificado de 40 kDa utilizando un enlazador de maleimida. El material conjugado se repurifica posteriormente para retirar el PEG libre, Adnectina anti-PCSK9 libre y las impurezas del producto relacionadas. El ensayo del control de calidad se lleva a cabo sobre la sustancia farmacológica en volumen.

Usos terapéuticos *in vivo*

La solicitud describe una Adnectina anti-PCSK9 útil en el tratamiento de aterosclerosis, hipercolesterolemia y otras enfermedades relacionadas con el colesterol. La solicitud también describe métodos para la administración de una Adnectina anti-PCSK9 a un sujeto. El sujeto puede ser un ser humano. La Adnectina anti-PCSK9 puede ser farmacéuticamente aceptable para un mamífero, en particular un ser humano. Un polipéptido "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un polipéptido que se administra a un animal sin consecuencia médicas adversas significativas, tal como esencialmente libre de endotoxinas, o con niveles de endotoxinas muy bajos.

Formulación a administración

La solicitud proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden la Adnectina anti-PCSK9 o proteínas de fusión de la misma descritas en el presente documento, cuando la composición está esencialmente libre de endotoxinas. Las formulaciones que comprenden la Adnectina anti-PCSK9 o fusiones de la misma se preparan para el almacenamiento mezclado el polipéptido descrito que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables (Osol, A., Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición (1980)), en forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones secas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores de las dosificaciones y concentraciones empleados, e incluyen tampones tales como de fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol, resorcinol, ciclohexanol; 3 pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas, polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo la glucosa, manosa, o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trealosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteínas-Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, PLURONIC® o polietilenglicol (PEG).

Las formulaciones del presente documento pueden contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se va a tratar, preferentemente la que tienen actividades complementarias que no se afectan adversamente entre ellos. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para los fines que se pretende.

Las formulaciones que se van a utilizar en la administración *in vivo* deben estar estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

El experto entenderá que la dosificación de cada agente terapéutico dependerá de la identidad del agente.

Para las aplicaciones terapéuticas, la Adnectina anti-PCSK9 o una proteína de fusión que contenga una Adnectina anti-PCSK9 se administra a un sujeto, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Se pueden administrar por vía intravenosa como una embolada o por infusión continua durante un periodo de tiempo, o por vía subcutánea. Los vehículos, diluyentes, y excipientes farmacéuticamente aceptables que sean adecuados son bien conocidos y se pueden determinar por los expertos en la técnica según demande la situación clínica. Ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) solución salina fosfato de Dulbecco, (2) solución salina al 0,9 % (NaCl al 0,9 % p/v), y (3) dextrosa al 5 % (p/v).

El método descrito en el presente documento se puede practicar *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

La administración de la Adnectina anti-PCSK9 o una fusión de la misma, y uno o más agentes terapéuticos adicionales, sea coadministrados o administrados secuencialmente, se puede producir como se ha descrito anteriormente para las aplicaciones terapéuticas. El experto en la técnica entenderá que los vehículos, diluyentes, y excipientes farmacéuticamente aceptables para la coadministración dependerán de la identidad del agente terapéutico particular que se va a administrar.

Cuando están presentes en forma de dosificación acuosa, más que cuando están liofilizados, la proteína normalmente se formulará a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, aunque se permite una amplia variación fuera de estos intervalos. Para el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de la Adnectina anti-PCSK9 o una fusión de la misma dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, la gravedad y curso de la enfermedad, si la proteína se administra con fines preventivos o terapéuticos, el curso de una terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta a la proteína y a la discreción del médico encargado. La proteína se administra adecuadamente al paciente en una vez o sobre una serie de tratamientos.

Fusiones de Adnectina de unión a seroalbúmina (SABA)

En ciertos aspectos, la aplicación proporciona proteínas de fusión que comprenden una Adnectina anti-PCSK9 fusionada a un dominio ¹⁰F_n3 que se une a la seroalbúmina humana (una Adnectina (dominio ¹⁰F_n3) de unión a la seroalbúmina o SABA). Dichas proteínas de fusión tienen semividas séricas extendidas en presencia de albúmina con respecto a la Adnectina anti-PCSK9 sola (por ejemplo, no conjugada con un resto PK).

Los dominios ¹⁰F_n3 se aclaran rápidamente de la circulación mediante filtración renal y degradación debido de su pequeño tamaño de 10 kDa ($t_{1/2}$ = 15-45 minutos en ratones; 1-3 horas en monos). La fusión de un dominio ¹⁰F_n3, tal como el de la Adnectina anti-PCSK9, a un segundo polipéptido que comprende un dominio ¹⁰F_n3 que se une específicamente a la seroalbúmina, por ejemplo, seroalbúmina humana (HSA), se puede utilizar para prolongar el $t_{1/2}$ de la Adnectina anti-PCSK9.

En ciertas realizaciones, la semivida en el suero de la Adnectina anti-PCSK9 fusionada a la SABA aumenta con respecto a la semivida sérica de la Adnectina anti-PCSK9 cuando no se conjuga a la SABA. En ciertas realizaciones, la semivida de la fusión SABA es al menos un 20, 40, 60, 80, 100, 120, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500, 1800, 1900, 2000, 2500 o 3000 % más larga con respecto a la semivida sérica de la Adnectina anti-PCSK9 cuando no es fusión SABA. En otras realizaciones, la semivida de la fusión SABA es al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,6 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 10 veces, 12 veces, 13 veces, 15 veces, 17 veces, 20 veces, 22 veces, 25 veces, 27 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, o 50 veces mayor que la semivida sérica de la Adnectina anti-PCSK9 cuando no se fusiona SABA. En algunas realizaciones, la semivida sérica de la fusión SABA es al menos de 10 horas, 15 horas, 20 horas, 25 horas, 30 horas, 35 horas, 40 horas, 50 horas, 60 horas, 70 horas, 80 horas, 90 horas, 100 horas, 110 horas, 120 horas, 130 horas, 135 horas, 140 horas, 150 horas, 160 horas, o 200 horas.

En ciertas realizaciones, la parte de unión a seroalbúmina de la proteína de fusión SABA se une a la HSA con una K_D de menos de 3 μ M, 2,5 μ M, 2 μ M, 1,5 μ M, 1 μ M, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, 50 pM o 10 pM. En ciertas realizaciones, la parte de unión de la seroalbúmina de las proteínas de fusión SABA se unen a la HSA con una K_D de menos de 3 μ M, 2,5 μ M, 2 μ M, 1,5 μ M, 1 μ M, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, 50 pM o 10 pM a un intervalo de pH de 5,5 a 7,4 a 25 °C o 37 °C. En algunas realizaciones, la parte de unión a seroalbúmina de las proteínas de fusión SABA se unen más fuertemente a la HSA a un pH menor de 7,4 en comparación con la unión a un pH de 7,4.

En consecuencia, las moléculas de fusión SABA descritas en el presente documento son útiles para aumentar la semivida de la Adnectina anti-PCSK9 creando una fusión entre la Adnectina anti-PCSK9 y la SABA. Dichas moléculas de fusión se pueden utilizar para tratar afecciones que responden a la actividad biológica de PCSK9. Se contempla el uso de moléculas de fusión SABA en las enfermedades producidas por la desregulación de PCSK9.

La fusión se puede formar uniendo la Adnectina anti-PCSK9 a cualquier extremo de la molécula de SABA, es decir, en disposición SABA- Adnectina anti-PCSK9 o Adnectina anti-PCSK9-SABA.

La HSA tiene una concentración sérica de 600 μ M y un $t_{1/2}$ de 19 días en seres humanos. El $t_{1/2}$ extendido de la HSA se ha atribuido, en parte, a su reciclado mediante el receptor Fc neonatal (FcRn). El HSA se une a FcRn de una manera dependiente del pH después de la captación endosómica en las células endoteliales; esta interacción recicla la HSA de nuevo en la corriente sanguínea, derivándola de la degradación lisosómica. El FcRn se expresa ampliamente y se piensa que la ruta de reciclado es constitutiva. En la mayoría de los tipos celulares, la mayoría de FcRn reside en endosoma tipo intracelular. La HSA se internaliza fácilmente por un mecanismo no específico de pinocitosis en fase fluida y se rescata de la degradación en el lisosoma por el FcRn. Al pH ácido que se encuentra en el endosoma, aumenta la afinidad de la HSA por el FcRn (5 μ M a pH 6,0). Una vez que se une al FcRn, la HSA se deriva de la ruta de degradación lisosómica, se produce una transcitosis y se libera en la superficie celular.

En ciertas realizaciones, la parte de unión a la seroalbúmina de las proteínas de fusión SABA descritas en el presente documento puede unirse también a la seroalbúmina de uno o más de mono, rata o ratón. En ciertas realizaciones, la parte de unión a HSA de las proteínas de fusión SABA descritas en el presente documento se unen a la seroalbúmina de rhesus (RhSA) o seroalbúmina de mono Cynomolgus (CySA) con una K_D de menos de 3 μ M, 2,5 μ M, 2 μ M, 1,5 μ M, 1 μ M, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM o 100 pM.

En ciertas realizaciones, la parte de unión a la seroalbúmina de las proteínas de fusión SABA descritas en el presente documento se unen al dominio I y/o el dominio II de la HSA. En una realización, la parte de unión a HSA de las proteínas de fusión SABA descritas en el presente documento no se une al dominio III de la HSA.

En ciertas realizaciones, la parte de unión a la seroalbúmina de las proteínas de fusión SABA comprende una secuencia que tiene al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 % o 85 % de identidad con el dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). En una realización, al menos uno de los bucles BC, DE, o FG se han modificado con respecto al dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre. En otra realización, al menos dos de los bucles BC, DE o FG se han modificado con respecto al dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre. En otra realización, los tres bucles BC, DE o FG se modifican con respecto al dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre. En otras realizaciones, una secuencia que comprende SABA tiene al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 % de identidad de una cualquiera de las secuencias centrales de SABA que se muestran en la Tabla 6 (es decir, las SEQ ID NO: 334, 338, 342, 346, y 348-370) o una cualquiera de las secuencias de SABA extendidas que se muestran en la Tabla 6 (es decir, SEQ ID NO: 420-447, menos el marcador 6xHIS).

En ciertas realizaciones, las Adnectinas de unión al suero basadas en el armazón ¹⁰F_n3 se puede definir en general por la siguiente secuencia:

EVVAAT(X)_aSLLI(X)_xYYRITYGE(X)_bQEFTV(X)_yATI(X)_cDYTITVYAV(X)_zISINYRT (SEQ ID NO: 328)

- 5 En ciertas realizaciones, las Adnectinas de unión al suero basadas en el armazón ¹⁰F_n3 se puede definir en general por la secuencia:

EVVAATPTSLLI(X)_xYYRITYGETGGNSPVQEFTV(X)_yATISGLKPGVDYTITVYAV (X)_zISINYRT (SEQ ID NO: 329)

- 10 Como se describe en el presente documento para las SEQ ID NO: 328 y 329 se pueden definir y aplicarse a moléculas SABA de la misma manera. En realizaciones a modo de ejemplo, los bucles BC, DE, y FG se representan por (X)_x, (X)_y, y (X)_z, respectivamente, se remplazan con polipéptidos que comprenden las secuencias de los bucles BC, DE y FG de cualquiera de los enlazadores de HSA que se muestra en la Tabla 6 posterior (es decir, las SEQ ID NO: 330, 334, 338, 342, 346, y 348-370 de la Tabla 6). En ciertas realizaciones, las secuencias de bucle BC, DE, o FG que se muestran en la Tabla 6 pueden contener uno más restos adicionales flanqueando el extremo N y/o C. En particular, el bucle BC puede contener un SW en el extremo N de las secuencias bucle BC que se muestran en la Tabla 6 cuando se reemplaza (X)_x de la SEQ ID NO: 328. De manera similar, el bucle DE puede contener una P precediendo el bucle DE y el resto R a continuación del bucle DE cuando se reemplaza (X)_y en la SEQ ID NO: 328. El bucle FG puede contener una P a continuación del bucle FG cuando se reemplaza (X)_z en la SEQ ID NO: 328. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 330 indica que los bucles BC, DE, y FG comprenden HSYEQNS (SEQ ID NO: 638), YSQT (SEQ ID NO: 639), y YGSKYYY (SEQ ID NO: 640), respectivamente. Sin embargo, cuando se reemplazan (X)_x, (X)_y y (X)_z de la SEQ ID NO: 328, es decir, los bucles BC, DE, y FG, la secuencia (X)_x puede ser SWHSYEQNS (SEQ ID NO: 641), la secuencia (X)_y puede ser PYSQTT (SEQ ID NO: 642), y la secuencia (X)_z puede ser YGSKYYYP (SEQ ID NO: 643).

- 25 En ciertas realizaciones, una SABA para su uso en una fusión como se describe en el presente documento puede comprender la secuencia que se exponen en la SEQ ID NO: 328 o 329, en las que los bucles BC, DE y FG se representan por (X)_x, (X)_y, y (X)_z, respectivamente, se remplazan con un conjunto respectivo de bucles BD, DE, y FG de cualquiera de las 26 secuencias centrales de SABA (es decir, las SEQ ID NO: 330, 334, 338, 342, 346, y 348-370 de la Tabla 6), o las secuencias al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % idénticas a las secuencias de los bucles BC, DE, y FG de las 26 secuencias centrales de SABA. En realizaciones a modo de ejemplo, una SABA como se describe en el presente documento se define por la SEQ ID NO: 329 y tiene un conjunto de secuencias de bucle BC, DE y FG de cualquiera de las 26 secuencias de SABA (es decir, las SEQ ID NO: 330, 334, 338, 342, 346, y 348-370 de la Tabla 6), opcionalmente con adiciones en el extremo N o C a las secuencias de bucle como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, la SABA1 tiene la secuencia central que se expone en la SEQ ID NO: 330 y comprende los bucles BC, DE, y FG que se exponen en las SEQ ID NO: 331-333, respectivamente. Por lo tanto, una SABA basada en el centro de SABA 1 puede comprender las SEQ ID NO: 328 o 329, en las que (X)_x comprende la SEQ ID NO: 331, (X)_y comprende la SEQ ID NO: 332, y (X)_z comprende la SEQ ID NO: 333. En algunas realizaciones, las secuencias que reemplazan a (X)_x, (X)_y y (X)_z comprenden restos adicionales en cualquiera o ambos extremos de los bucles como se ha descrito anteriormente. Se contemplan construcciones similares que utilizan el conjunto de bucles BC, DE y FG de las otras secuencias centrales de SABA. Las regiones de armazón de dicha SABA pueden comprender cualquiera de entre 0 a 20, de 0 a 15, de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, o de 0 a 1 sustituciones, sustituciones conservadoras, eliminaciones o adiciones con respecto a los restos de aminoácidos de armazón de la SEQ ID NO: 1. Dichas modificaciones en el armazón se puede producir, a condición de que la SABA sea capaz de unirse a la seroalbúmina, por ejemplo, HSA, con una K_D deseada.

- 50 En ciertas realizaciones, una SABA (por ejemplo, una secuencia central de SABA o una secuencia basada en la misa como se ha descrito anteriormente) se puede modificar para que comprenda una secuencia de extensión del extremo N y/o una secuencia de extensión del extremo C. Las secuencias de extensión a modo de ejemplo se muestran en la Tabla 6. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 420 denominada SABA1.1 comprende la secuencia central de SABA 1 (SEQ ID NO: 330) con una secuencia en el extremo N MGVSDVPRDLE (SEQ ID NO: 371, denominada AdNTI). La SABA 1.1 comprende adicionalmente un marcador His6 en el extremo C, sin embargo se tiene que entender que el marcador His6 es completamente opcional y se puede colocar en cualquier sitio de las secuencias de extensión del extremo N o C, o puede estar ausente en todas las secuencias. Adicionalmente, cualquiera de las secuencias de extensión en el extremo N o C que se proporcionan en la Tabla 6 (SEQ ID NO: 371-395), y cualquiera de las variantes de las mismas, se pueden utilizar para modificar cualquier secuencia SABA central determinada que se proporciona en la Tabla 6.

- 60 En ciertas realizaciones, las secuencias de extensión del extremo C (también llamadas "colas"), comprenden restos de E y D, y puede tener entre 8 y 50, 10 y 30, 10 y 20, 5 y 10, y 2 y 4 aminoácidos del longitud. En algunas realizaciones, las secuencias de cola incluyen enlazadores basados en ED en los que la secuencia comprende repeticiones de ED en tándem. En realizaciones a modo de ejemplo, la secuencia de cola comprende 2-10, 2-7, 2-5, 3-10, 3-7, 3-5, 3, 4 o 5 repeticiones de ED. En ciertas realizaciones, las secuencias de cola basadas en ED también pueden incluir restos de aminoácidos adicionales, tales como, por ejemplo: EI, EID, ES, EC, EGS, y EGC. Dichas secuencias se basan, en parte, en secuencias de cola de Adnectina conocidas, tales como EIDKPSQ (SEQ ID NO:

380), en la que los restos D y K se han eliminado. En realizaciones a modo de ejemplo, la cola basada en ED comprende restos E, I o EI antes de las repeticiones ED.

En otras realizaciones, las secuencias de cola pueden combinarse con otras secuencias enlazadoras conocidas (por ejemplo, SEQ ID NO: 396-419 de la Tabla 6) según sea necesario, cuando se diseña la molécula de fusión SABA.

Las fusiones SABA pueden estar unidas covalente o no covalentemente. En algunas realizaciones. En algunas realizaciones, un ¹⁰Fn3 de unión a seroalbúmina puede unirse directa o indirectamente a una Adnectina anti-PCSK9 mediante un enlazador polipeptídico. Los enlazadores adecuados para unir dominios Fn3 son los que permiten separar dominios que se plieguen independientemente entre ella formando una estructura tridimensional que permite la unión de alta afinidad a una molécula diana.

La divulgación proporciona varios enlazadores adecuados que cumplen estos requisitos, incluyendo enlazadores basados en glicina-serina, enlazadores basados en glicina-prolina, así como el enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos PSTSTST (SEQ ID NO: 416). Los Ejemplos descritos en el presentes documento demuestran que los dominios Fn3 unidos mediante enlazadores polipeptídicos mantienen su función de unión a la diana. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador basado en glicina-serina. Estos enlazadores comprenden restos de clina y serina y pueden tener entre 8 y 50, 10 y 30, y 10 y 20 aminoácidos de longitud. Los ejemplos incluyen enlazadores que tienen una secuencia de aminoácidos (GS)₇ (SEQ ID NO: 403), G(GS)₆ (SEQ ID NO: 398), y G(GS)₇G (SEQ ID NO: 400). Otros enlazadores contienen ácido glutámico, e incluyen, por ejemplo, (GSE)₅ (SEQ ID NO: 405) y GGSE (SEQ ID NO: 409). Otros enlazadores de glicina-serina a modo de ejemplo incluyen (GS)₄ (SEQ ID NO: 402), (GGGS)₇(SEQ ID NO: 411), (GGGS)₅ (SEQ ID NO: 412), y (GGGS)₃G (SEQ ID NO: 413). En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador basado en glicina-prolina. Estos enlazadores comprenden restos de glicina y prolina y pueden tener entre 3 y 30, 10 y 30, y 3 y 20 aminoácidos de longitud. Los ejemplos incluyen enlazadores que tienen una secuencia de aminoácidos (GP)₃G (SEQ ID NO: 414), (GP)₅G (SEQ ID NO: 415), y GPG. En otras realizaciones, el enlazador puede ser un enlazador basado en prolina-alanina que tiene entre 3 y 30, 10 y 30, y 3 y 20 aminoácidos de longitud. Ejemplos de enlazadores basados en prolina-alanina incluyen, por ejemplo, (PA)₃ (SEQ ID NO: 417), (PA)₆ (SEQ ID NO: 418) y (PA)₉ (SEQ ID NO: 419). Se contempla, que la longitud óptima del enlazador y la composición de aminoácidos se puede determinar por experimentación de rutina en vista de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. En algunas realizaciones, se une la Adnectina anti-PCSK9 a una SABA mediante un enlazador polipeptídico que tiene un sitio de proteasa que se puede escindir por una proteasa de la sangre o el tejido diana. Dichas realizaciones se pueden utilizar para liberar una Adnectina anti-PCSK9 para un mejor suministro o propiedades terapéuticas o una producción más eficaz.

Se pueden introducir enlazadores o separadores adicionales en el extremo C de un dominio Fn3 entre el dominio Fn3 y el enlazador polipeptídico. Se pueden introducir enlazadores o espaciadores adicionales en el extremo N de un dominio Fn3 entre el dominio Fn3 y el enlazador polipeptídico.

En algunas realizaciones, se puede unir una Adnectina anti-PCSK9 directa o indirectamente a una SABA mediante un enlazador polimérico. Los enlazadores poliméricos se pueden utilizar para variar óptimamente la distancia entre cada componente de la fusión para crear una proteína de fusión con una o más de las siguientes características: 1) reducir o aumentar los impedimentos estéricos de la unión de uno o más dominios proteicos cuando se unen a una proteína de interés, 2) aumentar la estabilidad o solubilidad proteica, 3) disminuir la agregación proteica, y 4) aumentar la avidez o afinidad total de la proteína.

En algunas realizaciones, una Adnectina anti-PCSK9 se une a una SABA mediante un polímero biocompatible tael como un azúcar polimérico. El azúcar polimérico puede incluir un sitio de escisión enzimática que se puede escindir por una enzima de la sangre o el tejido diana. Dichas realizaciones se pueden utilizar para liberar una Adnectina anti-PCSK9 para su mejor suministro o propiedades terapéuticas o una producción más eficaz.

Sumario de secuencias

Muchas de las secuencias a las que se hacen referencia en las secciones "Fusiones de Adnectina de unión a seroalbúmina (SABA)" y "Conjugación/Enlazadores" anteriores se resumen en la Tabla 6 posteriormente. A menos de que se especifique otra cosa, todas las extensiones del extremo N se indican con un subrayado simple, todas las colas/extensiones del extremo C se indican con un subrayado doble, y las secuencias de enlazador están encuadradas. Las regiones de bucles BC, DE y FG están sombreadas para cada secuencia central de SABA. como se ha descrito adicionalmente anteriormente, las secuencias de modificación (por ejemplo, las extensiones del extremo N o C y enlazadores) también se pueden utilizar para modificar las moléculas de Adnectina anti-PCSK9.

Tabla 6 Sumario de secuencias a modo de ejemplo

SEQ ID	Nombre de secuencia	Descripción	Secuencia
Adnectinas de unión a seroalbúmina (SABA) a modo de ejemplo			

327	¹⁰ Fn3 central de TS	Dominio ¹⁰ Fn3 central humano de TS	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGET GGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT
328	¹⁰ Fn3v6	¹⁰ Fn3 genérico que tiene 6 bucles variables	EVVAAT (X) _a SLLI (X) _x YYRITYGE (X) _b QE FTV (X) _y ATI (X) _c DYTITVYAV (X) _z ISINY RT
329	¹⁰ Fn3v3	¹⁰ Fn3 genérico que tiene 3 bucles variables	EVVAATPTSLLI (X) _x YYRITYGETGGNSPV QEFTV (X) _y ATISGLKPGVDYTITVYAV (X) _z ISINYRT
330	SABA1	Centro 1 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWHSYYTEQNSYYRITYGET GGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVDYTI TVYAVYGSKYYPISINYRT
331	SABA1BC	Centro 1 de bucle BC	HSYYEQNS
332	SABA1DE	Centro 1 de bucle DE	YSQT
333	SABA1FG	Centro 1 de bucle FG	YGSKYYY
334	SABA2	Centro 2 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWPKYDKTGHHYRITYGET GGNSPVQEFTVPTRQTTATISGLKPGVDYTI TVYAVSK _b DYIPHEHRPISINYRT
335	SABA2BC	Centro 2 de bucle BC	PKYDKTGH
336	SABA2DE	Centro 2 de bucle DE	TRQT
337	SABA2FG	Centro 2 de bucle FG	SK _b DYYPHEHR
338	SAB A3	Centro 3 de Adnectina	EVVAATPTSLLI SWSNDGPGLSYRITYGET GGNSPVQEFTVPSSQTTATISGLKPGVDYTI TVYAVSYTKKAYSAGPISINYRT
339	SABA3BC	Centro 3 de bucle BC	SNDGPGLS
340	SABA3DE	Centro 3 de bucle DE	SSQT
341	SABA3FG	Centro 3 de bucle FG	SYTCKKAYSAG
342	SABA4	Centro 4 de Adnectina; contiene una mutación del armazón (en negrita); la versión con el armazón perfecto es SABA5	EM VAAATPTSLLSWEDDSYYSRYYRITYGET GGNSPVQEFTVPSDLYTATISGLKPGVDYTI TVYAVTYDVTDLIMHEPISINYRT
343	SABA4BC	Centro 1 de bucle BC	EDDSYYSR
344	SABA4DE	Centro 4 de bucle DE	SDLY
345	SABA4FG	Centro 4 de bucle FG	YDVTDLIMHE
346	SABA5	Centro 5 de Adnectina; véase la descripción para SABA4; el resto corregido está en negrita	EV VATPTSLLISWEDDSYYSRYYRITYGET GGNSPVQEFTVPSDLYTATISGLKPGVDYTI TVYAVTYDVTDLIMHEPISINYRT
347	SABA5BC	Centro 5 de bucle BC	EDDSYYSR
348	SABA5DE	Centro 5 de bucle DE	SDLY
349	SABA5FG	Centro 5 de bucle FG	YDVTDLIMHE

350	SABA6	Centro 6 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWYMDEYDVRYRITYGET GGNSPVQEFTVPNYYNTATISGLKPGVDYTI TVYAVTRIKANNMYGSPIS INYRT
351	SABA7	Centro 7 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWNHLEHVARYRITYGET GGNSPVQEFTVPEYPTTATISGLKPGVDYTI TVYAVT ITMLKYPTQSPISINYRT
352	SABA8	Centro 8 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWGHYRPSGHYYRITYGET GGNSPVQEFTVDPSSYTATISGLKPGVDYTI TVYAVSK _D DYYPHEHRPISINYRT
353	SABA9	Centro 9 de Adnectina	EWAATPTSLLISWDASHYERRYYRITYGET GGNSPVQEFTVPRYHHTATISGLKPGVDYTI TVYAVTQAQEHYQPPISINYRT
354	SABA10	Centro 10 de Adnectina	EWAATPTSLLISWNSYYHSADYYRITYGET GGNSPVQEFTVPYPPTTATISGLKPGVDYTI TVYAVYSKSYYPISINYRT
355	SABA11	Centro 11 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWSKYSKHGHYYRITYGET GGNSPVQEFTVPSGNATATISGLKPGVDYTI TVYAVEDTNDYPSTERPISINYRT
356	SABA12	Centro 12 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWHGEPDQTRYRITYGET GGNSPVQEFTVPPYRRTATISGLKPGVDYTI TVYAVTSGYTGHYQPI SINYRT
357	SABA13	Centro 13 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWSKYSKHGHYYRITYGET GGNSPVQEFTVDPSSYTATISGLKPGVDYTI TVYAVSK _D DYYPHEHRPISINYRT
358	SABA14	Centro 14 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWYEPYTPHYYRITYGET GGNSPVQEFTVPGYYGTATISGLKPGVDYTI TVYAVYGYGYQYT PISINYRT
359	SABA15	Centro 15 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWSKYSKHGHYYRITYGET GGNSPVQEFTVPSGNATATISGLKPGVDYTI TVYAVSDDNKYYHQHRPIS INYRT
360	SABA16	Centro 16 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWGHYRRSGHYYRITYGET GGNSPVQEFTVDPSSYTATISGLKPGVDYTI TVYAVSK _D DYYPHEHRPISINYRT
361	SABA17	Centro 17 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWSKYSKHGHYYRITYGET GGNSPVQEFTVPSGNATATISGLKPGVDYTI TVYAVEDTNDYPHTRPISINYRT
362	SABA18	Centro 18 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWYEPGASVYYYRITYGET GGNSPVQEFTVPSYYHTATISGLKPGVDYTI TVYAVYGYEYEPISINYRT
363	SABA19	Centro 19 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWQSYAHSDYYRITYGET GGNSPVQEFTVPYPPQTATISGLKPGVDYTI TVYAVYAGSSYYPIISINYRT
364	SABA20	Centro 20 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWGHYRRSGHYYRITYGET GGNSPVQEFTVDPSSYTATISGLKPGVDYTI TVYAVSK _D DYYPHEHRPISINYRT
365	SABA21	Centro 21 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWPEPGTVYYYRITYGET GGNSPVQEFTVPAYYGTATISGLKPGVDYTI TVYAVYGYDYSPISINYRT
366	SABA22	Centro 22 de Adnectina	EWAATPTSLLISWYRYEKTQHYYRITYGET GGNSPVQEFTVPPESGTATISGLKPGVDYTI TVYAVYAGYEYPHTRPISINYRT
367	SABA23	Centro 23 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWVKSEYYRYYRITYGET GGNSPVQEFTVPYYVHATISGLKPGVDYTI TVYAVTEYYYAGAVVSV ISIN YRT
368	SABA24	Centro 24 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWYDPYTYGSYYRITYGET GGNSPVQEFTVGPYTTTATISGLKPGVDYTI TVYAVSYYYSTQPISINYRT
369	SABA25	Centro 25 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWSNDGPGLSYYRITYGET GGNSPVQEFTVPSSQTTATISGLKPGVDYTI TVYAVSYTKKAYSAGPISINYRT
370	SABA26	Centro 26 de Adnectina	EVVAATPTSLLISWPDYYPKPDYYRITYGET GGNSPVQEFTVPRDYTTATISGLKPGVDYTI TVYAVSYGYYPISINYRT
Secuencias a modo de ejemplo de extensión en el extremo N de Adnectina			

371	AdNT1	Líder a modo de ejemplo	MGVSDVPRDL
372	AdNT2	Líder a modo de ejemplo	GVSDVPRDL
373	AdNT3	Líder a modo de ejemplo	VSDVPRDL
374	AdNT4	Líder a modo de ejemplo	SDVPRDL
375	AdNT5	Líder a modo de ejemplo	DVPRDL
376	AdNT6	Líder a modo de ejemplo	VPRDL
377	AdNT7	Líder a modo de ejemplo	PRDL
378	AdNT8	Líder a modo de ejemplo	RDL
379	AdNT9	Líder a modo de ejemplo	DL
Secuencias a modo de ejemplo de extensión en el extremo C de Adnectina			
380	AdCT1	Cola a modo de ejemplo	EIDKPSQ
381	AdCT2	Cola a modo de ejemplo	EIDKPS
382	AdCT3	Cola a modo de ejemplo	EIDKPC
383	AdCT4	Cola a modo de ejemplo	EIDKP
384	AdCT5	Cola a modo de ejemplo	EIDK
385	AdCT6	Cola a modo de ejemplo	EI
386	AdCT7	Cola a modo de ejemplo	EIEKPSQ
387	AdCT8	Cola a modo de ejemplo	EIDKPSQLE
388	AdCT9	Cola a modo de ejemplo	EIEDEDEDEDED
389	Add 10	Cola a modo de ejemplo	EIEKPSQEDEDEDEDED
390	Add 11	Cola a modo de ejemplo	EGSGS
391	Add 12	Cola a modo de ejemplo	EIDKPCQ
392	Add 13	Cola a modo de ejemplo	EIEKPCQ
393	Add 14	Cola a modo de ejemplo	GSGC
394	Add 15	Cola a modo de ejemplo	EGSGC
395	Add 16	Cola a modo de ejemplo	EIDKPCQLE
396	L1	G(GS) ₂	GGSGS
397	L2	G(GS) ₄	GGSGSGSGS
398	L3	G(GS) ₆	GGSGSGSGSGSGS
399	L4	G(GS) ₇	GGSGSGSGSGSGSGS
400	L5	G(GS) ₇ G	GGSGSGSGSGSGSGSG
401	L6	GSGS	GSGS
402	L7	(GS) ₄	GSGSGSGS
403	L7	(GS) ₇	GSGSGSGSGSGSGS
404	L9	GS(A) ₉ GS	GSAAAAAAAAAGS
405	L10	(GSE) ₅	GSEGSEGSEGSEGSE
406	L11	(PAS) ₅	PASPASPASPASPAS
407	L12	(GSP) ₅	GSPGSPGSPGSPGSP

408	L13	GS(TVAAPS) ₂	GSTVAAPSTVAAPS
409	L14	(GGSE) ₂	GGSEGGSE
410	L15	(ST) ₃ G	STSTSTG
411	L16	(GGGS) ₇	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS
412	L17	(GGGS) ₅	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS
413	L18	(GGGS) ₃ G	GGGSGGGSGGGSGG
414	L19	(GP) ₃ G	GPGPGPG
415	L20	(GP) ₅ G	GPGPGPGPGPG
416	L21	P(ST) ₃	PSTSTST
417	L22	(PA) ₃	PAPAPA
418	L23	(PA) ₆	PAPAPAPAPAPA
419	L24	(PA) ₉	PAPAPAPAPAPAPAPA

Extensiones a modo de ejemplo de secuencias centrales de Adnectina			
SEQ ID	Nombre de secuencia	Descripción	Secuencia
420	SABA1.1	Secuencia central de Adnectina 1 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYYEQN SYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATIS GLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTE IDKPSQHSHHHHH
421	SABA1.2	Secuencia central de Adnectina 1 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCT8	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYYEQN SYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATIS GLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTE IEDEDEDEDED
422	SABA1.3	Secuencia central de Adnectina 1 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCT9 con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYYEQN SYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATIS GLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTE IEDEDEDEDEDHSHHHHH
423	SABA2.1	Secuencia central de Adnectina 2 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCT9 con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWPKYDKTG HYYRITYGETGGNSPVQEFTVPTRQTTATIS GLKPGVDYTITVYAVSK ₆ DYYPHEHRPISIN YRTEIDKPSQHSHHHHH
424	SABA3.1	Secuencia central de Adnectina 3 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSNDGPGL SYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSQTTATIS GLKPGVDYTITVYAVSYTKKAYSAGPISIN YRTEIDKPSQHSHHHHH
425	SABA4.1	Secuencia central de Adnectina 4 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI terminal sequences with marcador His6	MGVSDVPRDLEMVAATPTSLISWEDDSYYS RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSDLYTATIS GLKPGVDYTITVYAVTYDVTDLIMHEPISIN YRTEIDKPSQHSHHHHH
426	SABA5.1	Secuencia central de Adnectina 5 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEDDSYYS RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSDLYTATIS GLKPGVDYTITVYAVTYDVTDLIMHEPISIN YRTEIDKPSQHSHHHHH
427	SABA6.1	Secuencia central de Adnectina 6 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYMDYDV RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPNYNTATIS GLKPGVDYTITVYAVTRIKANNMYGPISIN YRTEIDKPSQHSHHHHH

428	SABA7.1	Secuencia central de Adnectina 7 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWNHLEHVA RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPEYPTTATIS GLKPGVDYTITVYAVTITMLKYPTQSPISIN YRTEIDKPSQHSHHHHH
429	SABA8.1	Secuencia central de Adnectina 8 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWGHYRRSG HYYRITYGETGGNSPVQEFTVDPSSYTATIS GLKPGVDYTITVYAVSK ₆ DYYPHEHRPISIN YRTEIDKPSQHSHHHHH
430	SABA9.1	Secuencia central de Adnectina 9 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDASHYER RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRYHHTATIS GLKPGVDYTITVYAVTQAQEHYQPPISINYR TEIDKPSQHSHHHHH
431	SABA10.1	Secuencia central de Adnectina 10 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWNSYYHSA DYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYPPTTATIS GLKPGVDYTITVYAVYSAKSYYPISINYRTE IDKPSQHSHHHHH
432	SABA11.1	Secuencia central de Adnectina 11 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSKYSKHG HYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSGNATATIS GLKPGVDYTITVYAVEDTNDYPHTRHPISIN YRTEIDKPSQHSHHHHH
433	SABA12.1	Secuencia central de Adnectina 12 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHGEPDQT RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPPYRRRTATIS GLKPGVDYTITVYAVTSGYTGHYQPISINYR TEIDKPSQHSHHHHH
434	SABA13.1	Secuencia central de Adnectina 13 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSKYSKHG HYYRITYGETGGNSPVQEFTVDPSSYTATIS GLKPGVDYTITVYAVSK ₆ DYYPHEHRPISIN YRTEIDKPSQHSHHHHH
435	SABA14.1	Secuencia central de Adnectina 14 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYEPYTP HYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGYYGTATIS GLKPGVDYTITVYAVYGYGYQYTPISINYRTE IDKPSQHSHHHHH
436	SABA15.1	Secuencia central de Adnectina 15 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSKYSKHG HYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSGNATATIS GLKPGVDYTITVYAVSDDNKYYHQHRPISIN YRTEIDKPSQHSHHHHH
437	SABA16.1	Secuencia central de Adnectina 16 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWGHYRRSG HYYRITYGETGGNSPVQEFTVDPSSYTATIS GLKPGVDYTITVYAVSK ₆ DYYPHEHRPISIN YRTEIDKPSQHSHHHHH
438	SABA17.1	Secuencia central de Adnectina 17 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSKYSKHG HYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSGNATATIS GLKPGVDYTITVYAVEDTNDYPHTRHPISIN YRTEIDKPSQHSHHHHH
439	SABA18.1	Secuencia central de Adnectina 18 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYEPGASV YYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSYYHTATIS GLKPGVDYTITVYAVYGYGYEYEPISINYRTE IDKPSQHSHHHHH

440	SABA19.1	Secuencia central de Adnectina 19 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQSYAHS DYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYPPQTATIS GLKPGVDYTITVYAVYAGSSYYPIISINYRTE IDKPSQHSHHHHH
441	SABA20.1	Secuencia central de Adnectina 20 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWGHYRRSG HYYRITYGETGGNSPVQEFTVDPSSYTATIS GLKPGVDYTITVYAVSK ₆ DYYPHEHRPISIN YRTEIDKPSQHSHHHHH
442	SAB A21.1	Secuencia central de Adnectina 21 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWPEPGTPV YYYRITYGETGGNSPVQEFTVPAYYGTATIS GLKPGVDYTITVYAVYGYDYSPISINYRTE IDKPSQHSHHHHH
443	SABA22.1	Secuencia central de Adnectina 22 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYRYEKTQ HYYRITYGETGGNSPVQEFTVPPESGTATIS GLKPGVDYTITVYAVYAGYEYPHTRPISIN YRTEIDKPSQHSHHHHH
444	SABA23.1	Secuencia central de Adnectina 23 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVKSEYY RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYVHTATIS GLKPGVDYTITVYAVTEYYYAGAVSVPIPI NYRTEIDKPSQHSHHHHH
445	SABA24.1	Secuencia central de Adnectina 24 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYDPYTYG SYYRITYGETGGNSPVQEFTVGPYTTTATIS GLKPGVDYTITVYAVSYYYSTQPISINYRTE IDKPSQHSHHHHH
446	SABA25.1	Secuencia central de Adnectina 25 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSNDGPGL SYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSQTTATIS GLKPGVDYTITVYAVSYYYTKKAYSAGPISIN YRTEIDKPSQHSHHHHH
447	SABA26.1	Secuencia central de Adnectina 26 que tiene secuencias terminales AdNTI y AdCTI con marcador His6	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWPDYPYKP DYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDYTTATIS GLKPGVDYTITVYAVYSYYGYPIISINYRTE IDKPSQHSHHHHH

Ejemplos

Ejemplo 1 Materiales y métodos utilizados en la producción proteica de alto rendimiento (HTPP)

5 Se inocularon los enlazadores seleccionados clonados en un vector pET9d y transformados en *E. coli* HMS174 en 5 ml de medio LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina en un formato de 24 pocillos y se cultivaron a 37 °C durante una noche. Los cultivos de medio LB reciente de 5 ml (con 50 µg/ml de kanamicina) se prepararon para la expresión inducible por aspiración de 200 µl del cultivo de una noche y se dispersaron en el pocillo apropiado. Los cultivos se
10 cultivaron a 37 °C hasta una A₆₀₀ de 0,6-0,9. Después de la inducción con 1 mM de isopropil-β-tiogalactósido (IPTG) se expresó el cultivo durante 6 horas a 30 °C y se recolectaron por centrifugación durante 10 minutos a 2750 g a 4 °C.

15 Los aglomerados celulares (en un formato de 24 pocillos) se lisaron por resuspensión en 450 µl de tampón de lisis (50 mM de NaH₂PO₄, 0,5 M de NaCl, 1x de coctel inhibidor de proteasa completa libre de EDTA (Roche), 1 mM de PMSF, 10 mM de CHAPS, 40 mM de Imidazol, 1 mg/ml de lisozima, 30 µg/ml de ADNasa, 2 µg/ml de aprotinina, pH 8,0) y se agitaron a temperatura ambiente durante 1-3 horas. Los lisados se clarificaron y se redistribuyeron en un formato de 96 pocillos por transferencia en un 96-well Whatman GF/D UNIFILTER® provisto con una placa de captura de 1,2 ml de 96 pocillos y filtrada por presión positiva. Los lisados clarificados se transfirieron a una placa
20 quelante de Ni de 96 pocillos que se había equilibrado con tampón de equilibrio (50 mM de NaH₂PO₄, 0,5 M de NaCl, 40 mM de Imidazol, pH 8,0) y se incubó durante 5 min. Se retiró el material no unido por vacío. Se lavó la resina 2x 0,3 ml/pocillo con el tampón de lavado n° 1 (50 mM de NaH₂PO₄, 0,5 M de NaCl, 5 mM de CHAPS, 40 mM de Imidazol, pH 8,0) retirando cada lavado al vacío. Antes de la elución se lavó cada pocillo con 50 µl de tampón de elución (PBS + 20 mM de EDTA), se incubó durante 5 min y este lavado se retiró al vacío. La proteína se eluyó
25 aplicando 100 µl adicionales de tampón de elución a cada pocillo. Después de una incubación de 30 minutos a

temperatura ambiente las placas se centrifugaron durante 5 minutos a 200 g y la proteína eluída se recolectó en placas de captura de 96 pocillos que contenían 5 µl de 0,5 M de MgCl₂ añadidos en el fondo de la placa de captura de elución antes de la elución. La proteína eluída se cuantificó utilizando un ensayo BCA con SGE como la proteína de referencia.

5

Expresión y purificación a escala media de enlazadores proteicos de armazón basados en fibronectina

Para la expresión de clones insolubles, los clones, seguidos por el marcador His6, se clonaron en un vector pET9d (EMD Bioscience, San Diego, CA) y se expresaron en células de *E. coli* HMS174. Se utilizaron veinte ml de un cultivo de inóculo (generado a partir de una única colona de la placa) para inocular un litro de medio LB que contenía 50 µg/ml de carbenicilina, y 34 µg/ml de cloranfenicol. El cultivo se cultivó a 37 °C hasta una A₆₀₀ de 0,6-1,0. Tras la inducción con 1 mM de isopropil-β-galactósido (IPTG) se cultivó el cultivo durante 4 horas a 30 °C y se recolectó por centrifugación durante 30 minutos a > 10.000 g a 4 °C. Los aglomerados celulares se congelaron a -80 °C. El aglomerado celular se resuspendió en 25 ml de tampón de lisis (20 mM de NaH₂PO₄, 0,5 M de NaCl, 1 x coctel inhibidor de proteasa completo libre de EDTA (Roche), 1 mM de PMSF, pH 7,4) utilizando un homogeneizador ULTRA-TURRAX® (IKA Works) en hielo. La lisis celular se consiguió por homogeneización a alta presión (>18.000 psi) utilizando un Modelo M-110S MICROFLUIDIZER® (Microfluidics). La fracción insoluble se separó por centrifugación durante 30 minutos a 23.300 g a 4 °C. El aglomerado insoluble recuperado de la centrifugación del lisado se lavó con 20 mM de fosfato sódico/500 mM de NaCl, pH 7,4. El aglomerado se re-solubilizó en 6,0 M de hidrócloruro de guanidina en 20 mM de fosfato sódico/500 mM de NaCl, pH 7,4 con sonicación seguido por incubación a 37 grados durante 1-2 horas. El aglomerado re-solubilizado se filtró hasta 0,45 µm y se cargó en la columna Histrap equilibrada con un tampón de 20 mM de fosfato sódico/500 mM de NaCl/6,0 M de guanidina pH 7,4. Después de la carga, la columna se lavó con 25 VC adicionales con el mismo tampón. La proteína unida se eluyó con 50 mM de Imidazol en 20 mM de fosfato sódico/500 mM de NaCl/6,0 M de guanidina HCl a pH 7,4. La proteína purificada se replegó mediante diálisis contra 50 mM de acetato sódico/150 mM de NaCl a pH 4,5.

Expresión y purificación a media escala de enlazadores proteicos solubles con armazón basado en fibronectina

Para la expresión de clones insolubles, los clones, seguidos por el marcador His6, se clonaron en un vector pET9d (EMD Bioscience, San Diego, CA) y se expresaron en células de *E. coli* HMS174. Se utilizaron veinte ml de un cultivo de inóculo (generado a partir de una única colona de la placa) para inocular un litro de medio LB que contenía 50 µg/ml de carbenicilina, y 34 µg/ml de cloranfenicol. El cultivo se cultivó a 37 °C hasta una A₆₀₀ de 0,6-1,0. Tras la inducción con 1 mM de isopropil-β-galactósido (IPTG) se cultivó el cultivo durante 4 horas a 30 °C y se recolectó por centrifugación durante 30 minutos a > 10.000 g a 4 °C. Los aglomerados celulares se congelaron a -80 °C. El aglomerado celular se resuspendió en 25 ml de tampón de lisis (20 mM de NaH₂PO₄, 0,5 M de NaCl, 1 x coctel inhibidor de proteasa completo libre de EDTA (Roche), 1 mM de PMSF, pH 7,4) utilizando un homogeneizador ULTRA-TURRAX® (IKA Works) en hielo. La lisis celular se consiguió por homogeneización a alta presión (>18.000 psi) utilizando un Modelo M-110S MICROFLUIDIZER® (Microfluidics). La fracción soluble se separó por centrifugación durante 30 minutos a 23.300 g a 4 °C. El sobrenadante se clarificó mediante un filtro de 0,45 µm. El lisado clarificado se cargó en una columna Histrap (GE) pre-equilibrada con 20 mM de fosfato sódico/500 mM de NaCl, pH 7,4. La columna se lavó entonces con 25 volúmenes de columna del mismo tampón, seguido por 20 volúmenes de columna de 20 mM de fosfato sódico/500 mM de NaCl/25 mM de Imidazol, pH 7,4 y después 35 volúmenes de columna de 20 mM de fosfato sódico/500 mM de NaCl/40 mM de Imidazol, pH 7,4. La proteína se eluyó con 15 volúmenes de columna de 20 mM de fosfato sódico/500 mM de NaCl/500 mM de Imidazol, pH 7,4, las fracciones se agruparon basándose en la absorbancia a A₂₈₀ y se dializaron contra 1 x PBS, 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, pH 8,5 o 50 mM de NaOAc, 150 mM de NaCl, pH 4,5. Cualquier precipitado se retiró filtrando a 0,22 µm.

Ejemplo 2. K_D en farmacología no clínica *in vitro* por SPR

Las características de unión se caracterizaron por Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR). La PCSK9 humana y la PCSK9 de *Cynomolgus* se inmovilizaron en canales separados en una dimensión de las superficies de un chip ProteOn XPR (BioRad) y se expusieron a 6 concentraciones diferentes de 2013E01 en la otra dimensión de la misma superficie del chip SPR. Esto permitió la determinación cinética en ausencia de regeneración. Los chips por duplicado se utilizaron para las determinaciones cinéticas de PCSK9 humana y de *Cynomolgus* a 25 °C. La evaluación de los parámetros cinéticos se llevó a cabo utilizando el modelo de interacción de Langmuir y el parámetro constante se ajustó con el software ProteOn Manager.

En estas condiciones, las Adnectinas anti-PCSK9 unidas a la PCSK9 humana con constantes de disociación (K_D) que variaban desde 80 pM a 1,6 nM y a la cyno PCSK9 con constantes de disociación (K_D) que varían desde 8 nM a 24 nM (Tabla 7). Las velocidades de asociación eran aproximadamente de 10⁵ M⁻¹ s⁻¹, junto con disociaciones que eran normalmente 10⁻³-10⁻⁵ s⁻¹. Para algunas Adnectinas, las velocidades de disociación de la PCSK9 humana eran lentas (del orden de 10⁻⁵ s⁻¹), que está cerca del límite de detección de las tecnologías SPR de manera que es posible que estas mediciones de constantes de la PCSK9 humana estén infraestimadas.

65

Tabla 7

Parámetros determinados por SPR para las Adnectinas anti-PCSK9 contra PCSK9 humana y Cyno inmovilizadas directamente				
ID del clon	Especie de PCSK9	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	K_D (nM)
1459D05	human	1,13E+05	1,80E-04	1,58 ±0,176
2013E01	human	7,03 ± 0,1 E+05	2,42 ± 0,3 E-05	0,292 ± 0,008
2013E01	cyno	2,19 E+05	1,77 E-03	8,1
1922G04	human	5,41E+05	5,08E-05	0,094 ± 0,009
1922G04	cyno	4,65E+05	7,00E-03	15,03
2011H05	human	1,18E+05	9,76E-06	0,079 ±0,038
2011H05	cyno	1,90E+05	4,40E-03	23,1
2012A04	human	2,59E+05	6,47E-05	0,251 ±0,011
2012A04	cyno	1,95E+05	4,75E-03	24,32

K_D por BLI

Las características de unión de las Adnectinas y PCSK9 humana también se determinó por Interferometría Bio-cap (BLI). La PCSK9 humana biotinilada se inmovilizó en puntas de un sensor de superestrepavidina que se sumergieron posteriormente en pocillos que contenían Adnectina diluida la duración de la fase de asociación. Las puntas se sumergieron entonces en un pocillo con solo tampón para la observación de la disociación de Adnectina. Se llevaron a cabo los experimentos en un ambiente de temperatura controlada a 25 o 37 °C y la velocidad de oscilación se fijó en 1500 rpm.

El análisis de interacción de unión se llevó a cabo utilizando un software propiedad de Fortebio (Fortebio Data Analysis Software versión 6.3.0.36). Se llevaron ajustes globales en todas las muestras, utilizando un modelo de unión 1:1. La naturaleza de estos ajustes globales restringían todos los valores de concentración a un único par de velocidades de asociación y disociación que por sí mismas se restringían entre ellas. Se promediaron las afinidades (K_D), velocidades de asociación y disociación sobre los distintos niveles de carga utilizados en el análisis. En estas condiciones, las Adnectinas se unían a la PCSK9 humana con afinidades que variaban de sede 200 pM a 7,5 nM, como se muestra en la Tabla 8 posterior. Las velocidades de asociación variaban desde $10^4 - 10^5 M^{-1}s^{-1}$, y junto con las disociaciones que eran normalmente de $10^{-3} - 10^{-5} s^{-1}$.

Tabla 8

Parámetros cinéticos determinados por BLI para Adnectinas PCSK9 contra PCSK9 humana			
ID del clon o nº de ATI	$k_{on}(M^{-1} S^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	K_D (nM)
2381D04	2,66E+05 ± 6,4 E+04	6,90E-05 ± 6,9 E-05	0,237 ±0,08
2382D09	5,33E+05	1,64E-04	0,304
2382D05	5,05E+05 ± 2,0E+05	1,57E-04±4,2E-05	0,314 ±0,06
2381B04	3,09E+05±2,1E+04	1,60E-04±1,6E-04	0,527 ±0,11
2382E05	4,36E+05± 1,6E+05	2,50E-04±1,1E-05	0,604 ±0,21
2382B09	4,51E+05±4,7E+04	2,91E-04±4,0E-05	0,656 ±0,02
2382H03	4,71E+05± 1,4E+05	5,57E-04±2,3E-04	0,677 ± 0,02
2382C09	3,49E+05	2,33E-04	0,757
2971A03	5,74E+05	4,20E-04	0,806
2382G04	4,19E+05	4,64E-04	1,11
2381G09	2,71E+05	2,91E-04	1,12
2451C06	3,47E+05 ± 5,4E+04	4,35E-04 ± 5,4E+04	1,27 ±0,14
2382H10	2,88E+05	3,82E-04	1,40
2013E01	5,46E+05	8,37E-04	1,51
2382D03	3,54E+05	6,63E-04	1,53
2381F11	3,23E+05	5,22E-04	1,59
2971E02	3,55E+05	5,55E-04	1,78
2382H09	2,51E+05	4,83E-04	1,86
2451H07	4,48E+05	9,40E-04	2,08
2382B10	3,94E+05	9,77E-04	2,35
2382C05	3,68E+05	8,79E-04	2,49
2971A09	3,99E+05	1,05E-03	2,79
2382E03	2,20E+05	5,96E-04	2,94
2381H09	1,36E+05	4,60E-04	3,23
2381B02	2,65E+05	8,31E-04	3,29
2381B08	2,13E+05	9,40E-04	4,11
2382F05	2,44E+05	1,09E-03	4,54
1459D05	1,49E+05±2,5E+04	2,02E-03 ± 2,0E-03	14,4 ±0,2

ATI 1091	2,863E+05	8,201E-05	0,293
ATI001117	1,451E+05	5,074E-05	0,554
ATI001057	5,325E+05	1,403E-04	0,255
ATI001119	8,190E+04	4,450E-04	5,296
ATI0011681	5,829E+05	3,335E-04	0,586
ATI0011752	6,558E+05	3,522E-04	0,543
ATI 1081	8,29E+05±8,1E+05	3,49E-04±3E-04	0,479 ±0,11
ATI891	1,08E+05	4,03E-04	3,56
ATI1114	8,072E+04	3,952E-04	4,876
ATI 1174	1,265E+05	9,012E-04	7,397
¹ ATI001168 es una versión desinmunizada de 1922G04 que tiene una sustitución R23E.			
² ATI001175 es una versión desinmunizada de 1922G04 que tiene una sustitución R23D.			

KinExA de afinidad en fase de solución

- 5 Las afinidades en solución de ATI001081 y ATI001174 para la PCSK9 humana se midió utilizando un ensayo de exclusión cinética (KinExA). Las concentraciones de Adnectina no unida relativas se midieron por captura en una matriz sólida de hPCSK9 seguido por la detección con un anticuerpo marcado de manera fluorescente que reconoce el armazón de Adnectina. Debido a limitaciones técnicas, la concentración más baja de Adnectinas que se pueden ensayar era 1 nM. Los análisis de K_D global estiman una $K_D = 70$ pM (28-127 pM en un intervalo de confianza del 95 %) para ATI001081 y una $K_D = 223$ pM para ATI001174 (intervalo de 54-585 pM en un intervalo de confianza del 95 %).

Tabla 9

Mediciones de la afinidad en fase de solución para Adnectinas PCSK9		
	ATI001081	ATI001174
K_D	69,5 pM	223 pM
95 % de intervalo de confianza:		
Kd alta	127 pM	585 pM
Kd baja	28 pM	54 pM

15 ITC

- La termodinámica y estequiometría de la unión de las Adnectinas ATI001174 y ATI001081 a la PCSK9 humana se caracterizaron por calorimetría de titulación isotérmica (ITC). La unión en fase de solución se midió en 25 mM de HEPES, pH 7,41, 150 mM de NaCl a 37 °C. Se observó una media de constante de unión unimolecular de $1,3 \pm 0,2$ nM para ATI001174 y $1,4 \pm 0,4$ nM para ATI001081. Los análisis termodinámicos detallados se muestran en la Tabla 10 y la Figura 13. La diferencia en las entalpías observadas (-3,3 kcal/mol) para las dos Adnectinas sugiere que ATI001174 sufre una reducción en su orden de magnitud de su afinidad por PCSK9 debido a la PEGilación que está al menos parcialmente compensado por la diferencia correspondiente en la entropía (-10,4 cal/mol·K).

25 Tabla 10

Adnectina	Estequiometría (N)	K_A (M^{-1})	K_D (nM)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol °C)
ATI001081	0,926	$7,1E8 \pm 2,1E8$	$1,4 \pm 0,4$ (± 30 %)	$-26,6 \pm 0,2$	-45,4
ATI001174*	0,857	$7,5E8 \pm 1,5E8$	$1,3 \pm 0,2$	$-29,9 \pm 0,1$	-55,8
* Media de 3 experimentos					

Ensayo de transferencia de energía en resonancia de fluorescencia (FRET)

- 30 Se desarrollaron tres ensayos basados en FRET para determinar la afinidad y potencia de unión de Adnectinas de unión a PCSK9, adaptado del método general descrito previamente por Maio et al. (Véase, Miao, B. et al., Meth. Enzymol, 357:180-188 (2002)). El ensayo FRET PCSK9:EGFA (Figuras 2 y 3) medía la inhibición de la unión de PCSK9 al receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) del dominio de homología del factor de crecimiento epidérmico (dominio EGFA), utilizando una PCSK9 recombinante humana expresada en baculovirus y un péptido EGFA 40 mérito sintético (biotinilado). Se ha demostrado que el EGFA representa el dominio clave de interacción del LDLR con la PCSK9 (Kwon, H.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105(6): 1820-1825 (2008)). Este ensayo utilizaba un mAb de unión al dominio del extremo C de PCSK9 (mAb 4H5) marcado con Eu quelado para proporcionar la interacción FRET con EGFA biotinilado mediante el complejo del fluoróforo alofocianina/estreptavidina.

Se construyeron también dos ensayos relacionados FRET dependientes de PCSK9. En uno de estos ensayos, se cuantificó el desplazamiento competitivo de las Adnectinas biotiniladas -ATI000972 o ATI001125 por las Adnectinas (los resultados de ATI000972 se muestran en la Figura 4). El ATI000972 es una versión biotinilada de 1459D05 y ATI001125 es una versión biotinilada de ATI001081. En otro ensayo, se ensaya la unión directa de una Adnectina (marcada con his) a PCSK9 utilizando un anticuerpo anti-His6 (Figura 5). En cada uno de los ensayos FRET, la concentración de PCSK9 humana era 1 o 5 nM. En algunos casos la PCSK9 de mono Cynomolgus remplazaba la hPCSK9. La Tabla 11 resume los datos totales de estos tres ensayos FRET.

Tabla 11

Sumario de los datos del ensayo de Adnectina para 3 ensayos FRET utilizando PCSK9 humana y 1 ensayo para Cyno PCSK9					
ID del clon	hPCSK9: EGFA C150 (nM)	hPCSK9: ATI00097 2 C150 (nM)	hPCSK9: ATI00112 5 C150 (nM)	Unión directa hPCSK9 CE50 (nM)	cPCSK9:EGFA C150 (nM)
1459D05	4,0	14	nd	3,9	2300
1784F03	2	1,9	nd	1,6	106
1813E02	1,3	2,4	nd	2,3	118
1923B02	2,3	3,2	nd	3,2	53,5
1922G04	1,2	2,0	nd	2,5	26,6
2012A04	2,1	1,2	nd	1,4	70,3
2011H05	2,7	1,4	nd	2,0	17,2
2013E01	1,6	1,8	nd	0,90	12,5
1922G04(R25D)	2,5	nd	nd	nd	48,1
1922G04 (R25E)	3,5	nd	nd	nd	58,5
2382E03	2,4	nd	0,5	3,7	10,8
2382E05	2,8	nd	0,4	3,8	12,6
2381B08	2,6	nd	1	4,1	27,1
2381B02	2,5	nd	0,5	8,4	9,8
2381B04	2,4	nd	0,5	4,2	17,3
2451H07	0,2	nd	0,2	13,2	27,1
2381D04	2,9	nd	0,5	3,7	12
2381F11	4	nd	0,8	<1	26,5
2381G09	3,1	nd	1,1	4,5	25,2
2381H09	3,4	nd	0,5	4,1	20,2
2382B09	3,8	nd	0,6	4,0	37,2
2382B10	3	nd	0,5	3,1	18,1
2382C05	4	nd	0,9	3,4	27,2
2382C09	3,5	nd	0,6	2,9	23,9
2382D03	3,3	nd	0,6	3,3	11,8
2382D09	2,6	nd	0,4	3,7	13,9
2382F05	2,4	nd	0,9	3,8	14,6
2382G04	2,9	nd	0,5	3,6	20,1
2382H03	3,4	nd	0,3	3,8	19,8
2382H09	0,9	nd	0,3	3,6	17,9
2382H10	2,6	nd	0,4	4,6	18,2
2382D02	4,5	nd	0,5	5,3	57,8
2451C06	1,2	nd	0,4	5,5	24,7

Inhibición basada en células de la actividad de PCSK9 por el ensayo de captación de Dil-LDL por Adnectinas PCSK9

Se desarrollaron métodos de cultivo celular para ensayar la capacidad de las Adnectinas para inhibir la actividad de PCSK9 sobre el LDLR. un medio eficaz de medición de la actividad celular del LDLR es mediante un ensayo de captación de LDL marcado, como demostraron Lagace, T.A. et al. (J. Clin. Invest, 116(11):2995-3005 (2006)). El trabajo adaptaba adicionalmente un método para la actividad funcional del LDLR utilizando la captación de una LDL marcada de manera fluorescente (Dil-LDL) adaptado de un método demostrado originalmente por Teupser et al. (Biochim. Biophys. Acta, 1303(3): 193-198 (1996)). Primero se preincubaron las células con la proteína PCSK9 humana recombinante (10 ug/ml, 135 nM) en presencia y ausencia de Adnectinas como se muestra. Después de 2 horas, se ensayó la actividad remanente de LDLR mediante la incubación con Dil_LDL (5 ug) durante 2 horas seguido por una evaluación de la Dil-LDL en las células utilizando microscopía de fluorescencia de alto contenido y

análisis de imágenes (Cellomics). La Figura 6 muestra el efecto de varias Adnectinas en la inhibición de la actividad de la PCSK9 y la restauración de la actividad funcional de LDLR en las células HepG2. En este ensayo, las Adnectinas inhibían la PCSK9 y restauraban la captación de Dil-LDL con los siguientes valores de la EC50: 1459D05, EC50 = 190 nM; 1784F03, 210 nM; 2012A04, 130 nM; 2013E01, 160 nM.

5

Ensayo de agotamiento de LDLR

- Se cultivaron células HepG2 en medio completo, medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, ATCC®) con un 10 % de FBS (Hyclone), y se dividieron dos veces a la semana con Tripsina al 0,25 % (Invitrogen). Para inducir la regulación positiva del receptor de LDL, se incubaron las células durante una noche en medio LPDS [RPMI (ATCC) con un 5 % de suero deficiente en lipoproteína (Intracel), 100 nM de superstate (BMS) y 50 uM de Mevalonato sódico (Sigma)]. Al día siguiente, las células se tripsinizaron brevemente con Tripsina al 0,05 % (Invitrogen) y se resuspendieron a 2×10^6 células por ml disponiéndose entonces en alícuotas de 100 ul por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo en V. Entretanto, se pre-incubaron las Adnectinas con PCSK9 en medio LPDS durante una hora a 37 °C. Tras una hora, las células se centrifugaron y se resuspendieron en 100 ul de la mezcla Adnectina/ PCSK9 y se incubaron durante una noche a 37 °C. Al día siguiente las células se marcaron con un anticuerpo para el receptor de LDL (BAF 2148 de R&D), seguido por anticuerpo secundario (BD554061 de BD Pharmingen) conjugado con ficoeritrina (PE)-estreptavidina y se analizaron mediante FACS en el FACS Canto II (BD).
- Se preincubaron 10 nM de PCSK9 durante una hora con una concentración creciente de candidatos de Adnectina antes de añadirse a las células HepG2. Después de la incubación durante una noche se midieron los niveles de LDLR por FACS y se trazó un gráfico el porcentaje de inhibición del agotamiento de LDLR inducido por PCSK9 y se determinó la CE50 utilizando PRISM. El 145D05 parecía ser el candidato menos potente entre los ensayados y no alcanzaba la inhibición máxima mientras que los otros clones alcanzaban una inhibición máxima del 150-200 % de PCSK9 (Figura 7). Un resumen de los datos farmacológicos *in vitro* de la Adnectina PCSK9 se muestran a continuación en la Tabla 12.

Tabla 12

ID del clon	% monómero (SEC-HPLC)	T _m (°C, DSC)	K _D hPCSK9 (37°C, Octet Rojo) (nM)	K _D hPCSK9 (25 °C, ProteOn) (nM)	Reactividad cruzada con Cyno		PCSK9: GFA FRET (CE ₅₀ , nM)	Agotamiento de LDLR	
					K _D cPCSK9 (25 °C, ProteOn) (nM)	Cyno PCSK9: EGFA FRET (EC ₅₀ , nM)		% inhibición a 75 nM	CE ₅₀ (nM)
1459D05	>95	63	14,4	1,58	>1000	>1000	5,8	66,8	>200
1813E02	>95	70	nd	nd	nd	118,5	2,7	nd	16
1784F03	>95	65	nd	nd	nd	106,5	2,01	150,2	26±13
1923B02	>95	73	nd	0,17	nd	53,5	2,3	178	23±7
1922G04	100	83	nd	0,09	15,0	26,6	1,2	105,1	10±2
2013E01	100	81	nd	0,29	8,1	12,5	1,6	165,5	10±4
2012A04	100	84	nd	0,25	24,3	70,3	2,1	144,5	12±6
2011H05	100	76	nd	0,08	23,1	17,2	2,7	197,6	12±5
2382D05	97	86	0,314	nd	nd	57,8	2,6	140,5	nd
2382E03	96	83	2,94	nd	nd	10,8	2,4	89,5	nd
2382E05	95	84	0,604	nd	nd	12,6	2,8	103,5	nd
2381B02	96	68	3,29	nd	nd	9,8	2,5	125,4	nd
2381B04	98	77	0,527	nd	nd	17,3	2,4	121,6	nd
2381B08	97	78	4,11	nd	nd	27,1	2,6	124,8	nd

2381D04	98	70	0,237	nd	nd	12	2,9	119,2	nd
2381F11	95	79	1,59	nd	nd	26,5	4	110,2	nd
2381G09	96	78	1,12	nd	nd	25,2	3,1	133,0	nd
2381H09	77	63	3,23	nd	nd	20,2	3,4	94,4	nd
2382B09	99	88	0,656	nd	nd	37,2	3,8	105,0	nd
2382B10	99	82	2,35	nd	nd	18,1	3	100,2	nd
2382C05	97	85	2,49	nd	nd	27,2	4	105,3	nd
2382C09	96	85	0,757	nd	nd	23,9	3,5	121,7	nd
2382D03	97	84	1,53	nd	nd	11,8	3,3	80,4	nd
2382D09	93	84	0,304	nd	nd	13,9	2,6	109,1	nd
2382F05	99	83	4,54	nd	nd	14,6	2,4	72,2	nd
2382G04	95	81	1,11	nd	nd	20,1	2,9	146,1	nd
2382H03	96	85	0,677	nd	nd	19,8	3,4	102,1	nd
2382H09	95	81	1,86	nd	nd	17,9	0,9	101,2	nd
2382H10	97	87	1,40	nd	nd	18,2	2,6	118,6	nd

2451B06	nd	nd	nd	nd	nd	57,8	4,5	92,2	nd
2451C06	96	87	1,27	nd	nd	24,7	1,2	89,4	nd
2451H07	97	87	2,08	nd	nd	27,1	0,2	88,8	nd

Ejemplo 3 Efectos farmacodinámicos *in vivo* de las Adnectinas PCSK9 humanas sobre la PCSK9 de modelos de ratón transgénico

Las Adnectinas PCSK9 presentaban efectos farmacodinámicos *in vivo* en dos modelos de ratón transgénico humano diferentes. Un modelo de ratón sobre-expresaba niveles de PCSK9 humana marcadamente y presentaba hipercolesterolemia como resultado (Lagace, T.A. et al, J. Clin. Invest., 116(11):2995-3005 (2006)). El otro modelo de ratón es un transgénico genómico PCSK9 (transgenia BAC) que está regulado en el hígado de manera similar a la PCSK9 de ratón y que expresa niveles casi normales para un ser humano de hPCSK9 en el plasma. Para estos estudios se desarrollaron ensayos ELISA utilizando anticuerpos marcados específicos de especie, específicos del sitio y Adnectinas para medir los niveles de PCSK9 humana no unida en el plasma (es decir h PCSK9 que no forma complejos con la Adnectina administrada) como un índice de la interacción con la diana.

Se inyectaron dosis únicas de Adnectinas PCSK9 en forma PEGilada por vía intraperitoneal en el modelo de ratón transgénico que sobre-expresa h PCSK9 a las dosis que se muestran en las Figuras 8-9. también se inyectaron muestras de PBS o dializado como controles. El tratamiento con la Adnectina 1459D05-PEG (100 mg/kg intraperitoneal) disminuía rápidamente el colesterol plasmático total (Figura 8A) y el LDL-C (no mostrado) hasta > 35 % por debajo de la línea basal en 4 h. Los niveles de colesterol en los ratones tratados con Adnectina se mantenían por debajo de los niveles de los controles durante el periodo de ensayo de 48 h. Esto se acompañaba por un brusco descenso de los niveles circulantes de hPCSK9 no unida en los ratones transgénicos tratados con Adnectina (Figura 8B). Las transferencias de Western de hígado tomadas a las 6 horas en estudios paralelos demostraban que los niveles de LDLR proteico aumentaban ~ 2 veces en los ratones tratados con Adnectina (no mostrado). En estudios adicionales en este modelo de ratón transgénico, se administró ATI0011114 a 10 o 60 mg/kg. Se vio un rápido descenso del colesterol plasmático dependiente de la dosis, concomitante con una reducción relacionada con la dosis en los niveles de hPCSK9 no unida (Figura 8). Estos estudios representan una prueba de concepto *in vivo* de que las Adnectinas PCSK9 son agentes eficaces en la disminución del colesterol en un modelo de ratón transgénico de PCSK9 humana hipercolesterolémico.

Se llevaron a cabo estudios *in vivo* en el modelo de ratón transgénico que expresaba normalmente la hPCSK9. La inyección de dosis únicas de 1459D05-PEG o ATI0011114 (5 mg/kg) daba como resultado un fuerte y rápido descenso de los niveles de hPCSK9 no unida en el plasma (Figura 10). Este efecto farmacodinámico de hPCSK9 no unida era más pronunciado a continuación del ATI0011114 en comparación con 459D05-PEG, observándose una mayor magnitud y duración del efecto para la Adnectina con mayor potencia/afinidad. Un estudio adicional de la dependencia de la dosis revelaba que la dosis inhibidora 50 % (DE50) era menor de 0,1 mg/kg para ATI0011114 en los puntos de tiempo de 3 a 48 horas tras la dosis, como se ve en la Figura 11. Estos hallazgos en un modelo de ratón transgénico que expresa normalmente demuestran que las Adnectinas inhibidoras de PCSK9 presentan efectos marcados dependientes de la dosis y dependientes de la afinidad sobre los objetivos farmacodinámicos o que se correlacionan con la regulación del LDLR y la disminución del colesterol LDL.

Monos Cynomolgus

Se llevó a cabo un estudio farmacodinámico en monos Cynomolgus delgados normales. Se administró la Adnectina ATI0011114 a los cynos por vía intravenosa a 5 mg/kg, y se recolectaron las muestras en intervalo de tiempo para el ensayo de LDL-C y la evaluación farmacodinámica. Una única dosis de ATI0011114 disminuía rápidamente los niveles plasmáticos de LDL-C hasta > 50 % respecto a la línea basal (o respecto al grupo de control de PBS) en 48 horas (Figura 12). La duración del efecto sobre el LDL-C continuaba durante más de una semana con un eventual regreso a la línea basal a las 3 semanas. Este efecto se observó con ambas formas PEGiladas de dos ramificaciones y cuatro ramificaciones de 40 kDa de la Adnectina anti-PCSK9 (ATI0011114 y ATI001211, respectivamente). El ATI001211 es un ATI001081 con un resto NOF PEG de 40 kDa con cuatro ramificaciones. El colesterol total presentaba un patrón similar pero no se observó ningún efecto sobre la HD u otro parámetro metabólico (no mostrado). Los análisis farmacocinéticos revelaron que la semivida plasmática era de aproximadamente 80-120 h, consistente con la farmacodinamia de disminución de la LDL en los cynos. Estos hallazgos indican que una Adnectina PCSK9 es eficaz y de acción rápida con efectos rápidos, robustos y específicos sobre la disminución de la LDL-C en el modelo de mono Cynomolgus.

Ejemplo 4 Evaluación farmacológica *in vitro* e *in vivo* de la proteína de fusión Adnectina PCSK9-Fc, PRD460

Producción de PRD460

Se transfectó un vector que codificaba PRD460 en células HEK-293 6E utilizando polietilenimina (PEI). Las células se cultivaron a 37 °C durante 5 días con una humedad del 80 % y un 5 % de CO₂. Las células se aglomeraron entonces, el sobrenadante se pasó a través de un filtro de 0,22 µm y luego se cargó en una columna de proteína. La columna se lavó con PBS y se eluyó la proteína con 20 mM de glicina, 150 mM de NaCl pH 2,8. La proteína eluída se concentró y se pasó sobre una columna Superdex 200 en 50 mM de MES, 100 mM de NaCl pH 5,8.

K_D de PRD460 por SPR

Se caracterizaron las características de unión mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR). Se inmovilizó un anticuerpo anti-humano en un chip BIACORE®, y se capturó la PRD460 (secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 322) en la superficie del chip. Se colocaron concentraciones variables de h PCSK9 en la solución de flujo utilizando MgCl₂ (3 M) para la regeneración del chip entre los ciclos. Para la comparación, se capturó el ATI-1081 en un anticuerpo anti-His inmovilizado en un chip BIACORE®. Se llevaron a cabo experimentos por duplicado en diferentes días. Las determinaciones cinéticas se llevaron a cabo a 25 °C. La evaluación de los parámetros cinéticos se llevó a cabo utilizando el algoritmo de unión 1:1 en el software de evaluación BIACORE®.

En estas condiciones, el ATI-1081 se unía a la PCSK9 humana con una constante de disociación (K_D) de 6,7 nM a 25 °C y la PRD460 se unía a la PCSK9 humana con una constante de disociación (K_D) de 3,29 +/- 0,55 nM a 25 °C (Tabla 13). Las determinaciones de la velocidad de disociación utilizando este formato de ensayo pueden limitarse artificialmente por la velocidad de disociación del ligando capturado por el anticuerpo de captura inmovilizado, por tanto, el formato de ensayo que utiliza la inmovilización directa de PCSK9 es un reflejo más preciso de la constante de disociación (K_D) para el ATI-1081.

Tabla 13

Parámetros cinéticos para PRD460 y ATI-1081 contra PCSK9 humana capturada			
	ka(1/Ms)	kd (1/s)	K _D (nM)
PRD460	3,75+/-0,7 E+04	1,21+/- 0,05 E-04	3,29 +/- 0,55
ATI-1081	3,65E+04	2,45E-04	6,7

Ensayos FRET de unión a PCSK9

Se utilizaron dos ensayos basados en transferencia de energía en resonancia de fluorescencia (FRET) para determinar la potencia de unión competitiva de la PRD460 y otras Adnectinas a la hPCSK9. El ensayo FRET PCSK9:EGFA mide la unión de la PCSK9 al LDLR, utilizando un dominio A peptídico soluble de homología del precursor del factor de crecimiento epidérmico y la PCSK9 humana recombinante. El ensayo FRET PCSK9:ATI972 mide el desplazamiento competitivo por las Adnectinas de la Adnectina biotinilada, ATI-972, de PCSK9.

En el ensayo FRET PCSK9:EGFA (a 5 nM de PCSK9), la PRD460 desplazaba completa y potentemente al EGFA del sitio de unión a PCSK9 con una CE50 = 0,7 nM (Fig. 1, panel izquierdo). La PRD460 era más potente en este ensayo que el ATI-1174 (CE50 = 1,9 nM) o ATI-1081 (CE50 = 3,7 nM) (Fig. 14). La potencia aparentemente mayor de PRD460 en este ensayo se puede explicar por la unión bivalente (2:1) de la Adnectina PRD460 a la PCSK9.

Utilizando el ensayo FRET PCSK9:ATI-972 (a t nM de PCSK9 humana), la PRD460 inhibía con una CE50 = 0,3 nM, en comparación de 0,8 nM para el ATI-1114 Y 2,8 nM para ATI-1081 (Fig. 15). Estos hallazgos indican que la PRD460 desplazaba potentemente la Adnectina biotinilada ATI-972 de su sitio de unión a la PCSK9. La mayor potencia de PRD460 respecto a ATI-1081 y ATI-1174 es consistente con la unión bivalente por PRD460.

Inhibición del agotamiento de LDLR inducido por PCSK9 en células HepG2

La PCSK9 humana promueve el agotamiento de LDLR de la superficie de las células HepG2. La preincubación de la PCSK9 con Adnectinas PCSK9 inhibe la unión de PCSK9 al LDLR y evita el agotamiento del LDLR de la superficie celular. Este ensayo se utilizó para medir la potencia del ATI-1081, ATI-1174 y PRD460 para inhibir el agotamiento de LDLR inducido por PCSK9 de la superficie celular.

Se pre-incubaron una serie de diluciones de Adnectinas PCSK9 con 10 nM de PCSK9 humana durante 1 hora a 37 grados, la mezcla pre-incubada se añadió a las células HepG2, y se incubaron las células durante 24 horas. A continuación de esta incubación, ese midió el nivel de LDLR en las células HepG2 utilizando el análisis FACS. Se calculó y representó en un gráfico el porcentaje de inhibición del agotamiento de LDLR inducido por PCSK9 (Fig. 15). En este ensayo, ATI-1081, ATI-1174 y PRD460 inhibían la PCSK9 con una CE50 comparable (9 nM, 8 nM y 6 nM respectivamente) aunque el cambio a la izquierda de la curva de respuesta se observaba consistentemente para PRD460. Estas CE50 representan el límite del ensayo.

Ensayo de entrada de PCSK9 en las células HepG2

La unión de PCSK9 al LDLR de la superficie de los hepatocitos da como resultado la co-internalización del complejo LDLR- PCSK9 durante la endocitosis del LDLR, dando lugar a un aumento de la degradación del LDLR. Se desarrolló un ensayo basado en células para medir la entrada celular dependiente de LDLR de la PCSK9 fluorescente. La PCSK9 humana se marcó covalentemente utilizando un fluoróforo ALEXA FLUOR®-647 (AF647). Se incubó la PCSK9-AF647 con células HepG2 con o sin Adnectinas PCSK9 y se cuantificó la fluorescencia intracelular por microscopía fluorescente de alto contenido y análisis de imágenes (Cellomics). Se estableció la

dependencia de la entrada celular de PCSK9-AF647 sobre la endocitosis de LDLR en experimentos preliminares. Las células HepG2 se incubaron con 10 nM de PCSK9-AF647 y niveles variables de Adnectinas durante 4 horas a 37 grados. En este ensayo se observó una potente inhibición de la fluorescencia intracelular de la PCSK9-AF647 para la PRD460 (CE50 = 6 nM) así como para el ATI-1174 (CE50 = 10 nM) (Fig. 16). Estos hallazgos indican que la Adnectina PRD460 y el ATI-1174 bloquean eficazmente la unión de la PCSK9 al LDLR de la superficie celular en una línea celular derivada de células hepáticas humanas en un cultivo, reduciendo de esta manera la internalización de la PCSK9-AF647 durante la endocitosis del LDLR.

Estudio *in vivo* en ratón transgénico

Se llevaron a cabo estudios *in vivo* en el modelo de ratón transgénico que expresa h PCSK9 normalmente. Se preveía que la unión de las Adnectinas a la PCSK9 en el plasma resultaría en una disminución de la cantidad de PCSK9 no unida (libre) circulante. La disminución de la PCSK9 no unida es el evento farmacodinámico inicial que da como resultado la inhibición de la interacción PCSK9-LDLR y la disminución del colesterol LDL. La administración de dosis únicas de PRD460 (dosis i-p. desde 0,6 a 18 mg/kg) a los ratones transgénicos daban como resultado una disminución rápida y fuerte de los niveles de h PCSK9 no unida en el plasma (Fig. 17). La disminución dependiente de la dosis de la PCSK9 no unida se observaba con una DE50 < 0,6 mg/kg en el punto temporal de 3 h. Estos hallazgos en el modelo de ratón transgénico que expresa PCSK9 humana normalmente demuestra que la PRD460 se une fuerte y potentemente a la h PCSK9 circulante *in vivo*.

Farmacodinámica *in vivo* en monos Cynomolgus

Se evaluaron los efectos farmacodinámicos de la Adnectina PCSK9, PRD460, en monos Cynomolgus delgados normales. Se administró PRD460 por v.i. a los monos a 15 mg/kg, y se recolectaron muestras de plasma en intervalos de tiempos de 4 semanas para el ensayo de los niveles de LDL-C y PCSK9 libre. Una única dosis de PRD460 disminuía rápidamente los niveles plasmáticos de LDL-C en los monos, alcanzando un promedio de efecto máximo del 42 % de la línea basal de LDL-C (un 58 % de reducción; n = 3 monos) sobre el día 3 después de la dosificación (Fig. 18). Los niveles de LDL-C se redujeron un 50 % o más durante una semana a esta dosis, manteniéndose significativamente por debajo de la línea basal durante 3 semanas y volviendo a la línea basal a las 4 semanas. El colesterol total presentaba un patrón similar pero no se observó ningún efecto sobre la HDL (no mostrado). El tratamiento con PRD460 producía una caída inmediata hasta casi cero (por debajo del límite menor de cuantificación) en la forma no unida, libre de la PCSK9 plasmática (Fig. 18). Los niveles de PCSK9 libre se mantuvieron cerca de los límites menores de detección durante varios días y entonces volvieron gradualmente a los niveles de la línea base al final de las 4 semanas, consistente con una relación causa/efecto con la LDL-C plasmática. Los datos indican que la disminución de la LDL plasmática reflejaba la caída de los niveles de PCSK9 libre, consistente con la inhibición de la PCSK9 que regula la función de LDLR después del tratamiento con PRD460 *in vivo*. Los análisis farmacocinéticos revelaban que la semivida sérica de la Adnectina PRD460 era aproximadamente de 70 horas en este estudio con monos Cynomolgus. Estos hallazgos indican que la proteína de fusión Adnectina PCSK9-Fc es altamente eficaz y de acción rápida con efectos robustos, específicos, y de larga duración sobre la disminución del LDL-C en el modelo de mono Cynomolgus.

Evaluación farmacológica *in vivo* de la Adnectina PCSK9 sin modificar, ATI-1081

Además de modificar las Adnectinas que contiene un resto PK (por ejemplo, Adnectinas PEGiladas y de fusión con Fc), también se puede administrar una Adnectina PCSK9 sin modificar ("desnuda"). Las estrategias para el tratamiento con una Adnectina PCSK9 sin modificar incluye dosificaciones más frecuentes para adecuarse a la semivida más corta del PK, o la utilización de una formulación subcutánea de liberación extendida para aumentar la longitud de la fase de absorción y extender el efecto farmacodinámico. Se puede prever que muchas de dichas formulaciones incluyan, simplemente a modo de ejemplo, soluciones de propilenglicol/PBS para retrasar la velocidad de absorción y aumentar el tiempo de exposición de la Adnectina en la circulación.

Se administró la Adnectina sin modificar ATI-1081 a monos Cynomolgus a 10 mg/kg en vehículo PBS. También se administró la ATI-1114 (versión PEGilada de la misma Adnectina) a 1 mg/kg en PBS como comparador. La ATI-1081 daba lugar a una inhibición rápida y transitoria de los niveles de PCSK9 circulante sin unir. A los 30 minutos la extensión de la inhibición inicial se aproximaba al 100 % (por debajo de los límites de cuantificación) antes de volver a la línea basal varias horas después (Figura 19). Al mismo tiempo se observaba una tendencia a disminuir los niveles de LDL-C durante las primeras 24 h en los monos tratados con ATI-1081 (Fig. 20).

La Adnectina no modificada ATI-1081 se administró también a ratones transgénicos que expresaban h PCSK9 normalmente en una formulación subcutánea simple de liberación extendida utilizando un vehículo de 50:50 de propilenglicol/PBS (vehículo PG) en comparación con el vehículo PBS. Se espera que esta formulación retrase modestamente la velocidad de absorción de la Adnectina y aumente el tiempo de exposición a la ATI-1081 en la circulación, mejorando de esta manera la respuesta farmacodinámica. La administración (intraperitoneal) de ATI-1081 a 1 mg/kg en vehículo PBS daba como resultado ~50 % de disminución de PCSK9 no unida en el plasma a las 3 horas, en comparación con >85 % de disminución para la ATI-1114 a 0,3 mg/kg (Fig. 21). En un segundo experimento en los ratones transgénicos, La ATI-1081 administrada por inyección subcutánea en vehículo PG daba

como resultado descensos casi equivalentes en el LDL no unido en comparación la ATI-1174, con una duración de efecto mejorada durante las primeras 6 h del estudio (Fig. 22). Estos hallazgos indican que la Adnectina PCSK9 sin modificar ATI-1081 cuando se administraba por vía subcutánea en un vehículo de liberación extendida simple unido a la PCSK9 humana diana *in vivo* y daba lugar a la respuesta farmacodinámica inicial. La dependencia temporal de la respuesta era consistente con la liberación extendida que prolonga la duración del efecto para la Adnectina PCSK9 sin modificar.

Ejemplo 5 Adnectinas de unión a seroalbúmina (SABA)

10 Ejemplo 5A Exploración y selección de Adnectinas de unión a seroalbúmina sérica

Resumen

Se aplicó una técnica de selección conocida como PROfusión (véase, por ejemplo, Roberts et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(23): 12297-12302 (1997) y el documento WO 2008/066752) a una biblioteca de ADN con regiones variables diseñadas en los bucles BC, DE, y FG de ¹⁰F_n3. Se creó una biblioteca aleatoria de más de 10¹³ moléculas a partir de este diseño, y se aplicó presión de selección contra una forma biotinilada de HSA para aislar la Adnectina de unión a la seroalbúmina (SABA) candidata con las propiedades de unión deseadas.

20 Procedimiento de producción proteica de alto rendimiento (HTTP)

Se purificaron las distintas Adnectinas de unión a la HSA utilizando un procedimiento de producción proteica de alto rendimiento (HTTP). Se clonaron los enlazadores seleccionados en un vector pET9d que contenía un marcador His6 y se transformaron en células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Las células transformadas se inocularon en 5 ml de medio LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina en un formato de 25 pocillos y se cultivó a 37 °C durante una noche. Los cultivos de 5 ml de medio LB reciente (50 µg/ml de kanamicina) se prepararon mediante expresión inducible aspirando 200 µl del cultivo de una noche y dispensándolo en el pocillo apropiado. Los cultivos se cultivaron a 37 °C hasta una A₆₀₀ de 0,6-0,9. Después de la inducción con 1 mM de isopropil-β-galactósido (IPTG), el cultivo se cultivó durante otras 4 horas a 30 °C y se recolectó por centrifugación durante 10 minutos a 3220 x g a 4 °C. Los

aglomerados celulares se congelaron a -80 °C. Los aglomerados celulares (en el formato de 24 pocillos) se lisaron por resuspensión en 450 µl de tampón de lisis (50 mM de NaH₂PO₄, 0,5 M de NaCl, 1 x coctel inhibidor de proteasa completo-libre de EDTA (Roche), 1 mM de PMSF, 10 mM de CHAPS, 40 mM de Imidazol, 1 mg/ml de lisozima, 30 µg/ml de ADNasa, 2 µg/ml de aprotonina, pH 8,0) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Los lisados se clasificaron y redistribuyeron en un formato de 96 pocillos por transferencia en un 96-well Whatman GF/D UNIFILTER® provisto con una placa de captura de 650 µl y se centrifugó durante 5 minutos a 200 x g. Los lisados clarificados se transfirieron a una placa quelante de Ni de 96 pocillos que se había equilibrado con un tampón de equilibrado (50 mM de NaH₂PO₄, 0,5 M de NaCl, 10 mM de CHAPS, 40 mM de Imidazol, pH 8,0) y se incubaron durante 5 min. El material no unido se retiró. La resina se lavó 2 x 0,3 ml/pocillo con tampón de lavado n° 1 (50 mM de NaH₂PO₄, 0,5 M de NaCl, 5 mM de CHAPS, 40 mM de Imidazol, pH 8,0). A continuación la resina se lavó con 3 x 0,3 ml/pocillo con PBS. Antes de la elución cada pocillo se lavó con 50 µl de tampón de elución (PBS + 20 mM de EDTA), se incubaron durante 5 min y el lavado se desechó al vacío. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, las placas se centrifugaron durante 5 minutos a 200 x g y se recolectó la proteína eluída en placas de captura de 96 pocillos que contenían 5 µl de 0,5 M MgCl₂ fijado en el fondo de las placas Ni. La proteína eluída se cuantifica utilizando un ensayo de proteína BCA con SGE (Adnectina control) como la proteína de referencia. La Adnectina SGE es un dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) en la que el dominio de unión a la integrina (aminoácidos RGD en las posiciones 78-80) se han remplazado con SGE.

50 ELISA de unión directa a HSA, RhSA y MuSA

Para evaluar los enlazadores directos a la HSA, se revistieron placas MaxiSorp (Nunc. International, Rochester, NY) con 10 µg/ml de HSA (Sigma, St. Louis, MO) en PBS 4 °C durante una noche seguido por bloqueo en tampón de bloqueo de caseína (Thermo Scientific, Rockford, IL) durante 1-3 horas a temperatura ambiente. Para los ensayos de exploración de único punto, se diluyeron la Adnectina HTPP purificada 1:20 en tampón de bloqueo de caseína y se permitió que se unieran a HSA en cada pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente. Para los ensayos de respuesta a la dosis, se utilizaron concentraciones que variaban desde 0,1 nM hasta 1 µM. Después del lavado en PBST para retirar las Adnectinas no unidas, se añadió un mA b conjugado con HRP anti-His (R&D Systems, MN) diluido 1:2500 en tampón de bloqueo de caseína a la Adnectina marcada con His unida durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de conjugado se retiró mediante lavado con PBST y las Adnectinas unidas se detectaron utilizando los reactivos de detección TMB (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Medición de la agregación por cromatografía de exclusión por tamaño analítica

Se llevó a cabo una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en las SABA que resultaban de la HTPP. La SEC

del material derivado de HTPP se llevó a cabo utilizando una columna SUPERDEX® 200 5/150 o SUPERDEX® 75 5/150 (GE Healthcare) en un sistema de HPLC Agilent 1100 o 1200 con detección UV a A_{214} nm y A_{280} nm y con detección de fluorescencia (excitación = 280 nm, emisión = 350 nm). Se empleó un tampón de 100 mM de sulfato sódico, 100 mM de fosfato sódico, 150 mM de cloruro sódico, pH 6,8 a un flujo apropiado de la columna de SEC. Se utilizaron geles de filtración convencionales (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) para la calibración de peso molecular.

Los resultados de la SEC sobre las SABA HTPP purificadas demostraron que eran predominantemente monoméricas y se eluían en el intervalo aproximado de 10 kDa frente a referencias de Gel de filtración globular (BioRad).

Identificación de la Adnectina de unión a seroalbúmina (SABA) candidata

Como resultado de la exploración de la unión con HSA/RhSA/MuSA y los criterios biofísicos, se identificaron y se escogieron cuatro únicas Adnectinas de unión a la seroalbúmina que tenían evaluadas sus semividas en ratones. Con el fin de llevar a cabo la caracterización *in vitro* e *in vivo*, se llevaron a cabo escalados medios para las cuatro SABA. La Tabla 6 proporciona las secuencias de 26 secuencias centrales únicas de SABA identificadas por PROfusión, denominadas SABA 1-26. La SABA 4 tiene una mutación en el armazón que se fijó antes del escalado medio. La versión de armazón perfecto de SABA 4 es la SABA 4. SABA 4 y SABA 5 tienen secuencias idénticas de los bucles BC, DE y FG.

Ejemplo 5B. Producción y Formulación de SABAS candidatas

Producción proteica a escala media de SABA

Las SABA seleccionadas descritas en el Ejemplo 5A, seguido por el marcador His6 se clonaron en un vector pET9d y se expresaron en células de *E. coli* BL21(DE3) PlyS (véase la Tabla 6 para cada secuencia marcada con His denominadas SABA 1.1, SABA 2.1, SABA 3.1, y SABA 5.1). Se utilizaron 20 ml de un cultivo de inóculo (generado a partir de una única colonia de la placa) para inocular 1 litro de medio LB que contenía 50 µg de kanamicina. El cultivo se cultivó a 37 °C hasta una A_{600} de 0,6-1,0. Tras la inducción con 1 mM de isopropil-β-tiogalactósido (IPTG) se cultivó el cultivo durante otras 4 horas a 30 °C y se recolectó por centrifugación durante 30 minutos a $\geq 10.000 \times g$ a 4 °C. Los aglomerados celulares se congelaron a -80 °C. El aglomerado celular se resuspendió en 25 ml de tampón de lisis (20 mM de NaH_2PO_4 , 0,5 M de NaCl, 1x de coctel inhibidor de proteasa completo libre de EDTA (Roche), pH 7,4) utilizando un homogeneizador ULTRA-TURRAX® (IKA works) en hielo. La lisis celular se consiguió por homogeneización a alta presión (≥ 18.000 psi) utilizando un modelo M-110 MICROFLUIDIZER® (Microfluidics). La fracción soluble se separó por centrifugación durante 30 minutos a $23.300 \times g$ a 4 °C. El sobrenadante se clarificó mediante un filtro de 0,45 µm. El lisado clarificado se cargó en una columna HISTRAP® (GE) pre-equilibrada con 20 mM de NaH_2PO_4 , 0,5 M de NaCl, pH 7,4. La columna se lavó entonces con 25 volúmenes de columna de 20 mM de NaH_2PO_4 , 0,5 M de NaCl, 40 mM de imidazol pH 7,4. La proteína se eluyó con 15 volúmenes de columna de 20 mM de NaH_2PO_4 , 0,5 M de NaCl, 500 mM de imidazol pH 7,4, las fracciones se agruparon basándose en la absorbancia a A_{280} y se dializaron contra 1x PBS, 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl pH 8,5 o 50 mM de NaOAc; 150 mM de NaCl; pH 4,5. Se retiró cualquier precipitado filtrando a 0.22 µm.

La expresión y purificación a escala media daba lugar a Adnectinas altamente puras y activas que se expresaban en forma soluble y se purificaron de la fracción soluble del citosol bacteriano. El análisis de SEC en una fase móvil SUPERDEX® 200 o SUPERDEX® 75 10/30GL de 100 mM de NaPO_4 , 100 mM de NaSO_4 , 150 mM de NaCl, pH 6,8 (GE Healthcare) demostraban Adnectinas predominantemente monoméricas.

Formulación de SABA 1.2

Se escogió una SABA específica, SABA 1.2 (SEQ ID NO: 411) para una exploración de formulación preliminar. La SABA 1.2 comprende una extensión (ED) de la secuencia "central 1" de $^{10}\text{Fn3}$ (véase la SEQ ID NO: 421 de la Tabla 6). Para la SABA 1.2, se identificó una formulación estable de 10 mM de ácido succínico, un 8 % de sorbitol, un 5 % de glicina a pH 6,0 y con una concentración del producto de mg/ml. En esta formulación la temperatura de fusión de la proteína era 75 °C según se determinaba por calorimetría de exploración diferencial (DSC) utilizando una concentración de proteína de 1,25 mg/ml. La formulación proporcionada una estabilidad física y química satisfactoria a 4 °C y 25 °C, con un nivel agregado inicial a un 1,2 %. Después de un mes de estabilidad, el nivel de agregación era muy bajo (un 1,6 % a 4 °C y 3,8 % a 25 °C). La proteína era estable también en esta formulación después de cinco ciclos de congelación-descongelación según pasaba de -80 °C y -20 °C a temperatura ambiente. Además, en esta formulación la SABA 1.2 era soluble hasta al menos una concentración proteica de 20 mg/ml a 4 °C y temperatura ambiente sin precipitación o aumento en la agregación.

Ejemplo 5C. Caracterización biofísica de SABA candidatas

Cromatografía de exclusión por tamaño

Se llevó a cabo una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) convencional sobre las SABA candidatas resultantes del procedimiento a escala media. La SEC del material de escalado medio se llevó a cabo utilizando una columna SUPERDEX® 200 10/30 o en una SUPERDEX® 75 10/30 (GE Healthcare) en un sistema Agilent 1100 o 1200 HPLC con detección UV a 214 nm y 280 nm y con detección de fluorescencia (excitación = 280 nm, emisión = 350 nm). Se empleó un tampón de 100 mM de sulfato sódico, 100 mM de fosfato sódico, 150 mM de cloruro sódico, pH 6,8 a un caudal apropiado de la columna de SEC. Se utilizaron referencias de filtración en gel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) para la calibración del peso molecular.

Los resultados de la SEC en la SABA purificada en una escala media presentaban una Adnectina predominantemente monomérica y la elución en el intervalo aproximado de 10 kDa frente a las referencias de gel de filtración (BioRad) según se muestra.

Termoestabilidad

Se llevaron a cabo análisis de calorimetría de exploración diferencial (DSC) sobre las SABA de escalado medio para determinar sus respectivas T_m . Se exploró una solución de 1 mg/ml en un calorímetro N-DSC II (Calorimetry Sciences Corp) elevando la temperatura de 5 °C a 95 °C a una velocidad de 1 grado por minuto bajo una presión de 3 atmósferas. Los datos se analizaron frente a la ejecución de un control del tampón apropiado utilizando un mejor ajuste utilizando el Software Origin (OriginLab Corp). Los resultados de los análisis de la SEC y DSC se resumen en la Tabla 14.

Tabla 14

Sumario de los análisis SEC y DSC en SABA candidatas			
Clon	SEC		DSC (T_m)
	Monómero (%)	Dímero (%)	
SABA1.1	92,3	7,7	63,9 °C
SABA5.1	88	12	70,1 °C
SABA2.1	91	9	58,5 °C/78,2 °C
SABA3.1	99	BLD	65,2 °C

Ejemplo 5D. Caracterización de la unión de SABA 1 candidata a la seroalbúmina

La cinética de los clones de SABA seleccionados purificados con HTPP y/o el material escalado medio descrito en los Ejemplos 5A y 5B se determinaron capturando las respectivas seroalbúminas (HSA/RhSA/MuSA) en la superficie de un chip CM5 de Biosensor y haciendo fluir una serie de concentraciones de SABA sobre la celda de flujo de referencia y las albuminas capturadas. Además, se llevó a cabo la unión a la albúmina a varias condiciones de pH que variaban desde un pH de 5,5 a un pH de 7,4. Las Adnectinas de unión a HSA SABA 2.1, SABA3.1, SABA 4.1, y SABA 1.1 reaccionaban de manera cruzada con RhSA pero no reaccionaban de manera cruzada con MuSA. La unión de SABA2 y SABA4 es sensible al pH mientras que el clon SABA 3 demostraba una resistencia al pH en la unión a la HSA por debajo de un pH de 6.0. SABA1.1 cumplía los criterios bioquímicos de resistencia al pH y cinética/afinidad bajando hasta un pH de 5,5.

Se determinó el mapeo del dominio por BIACORE®. Los clones de SABA seleccionados purificados de la HTPP y/o el material del escalado medio se determinaron capturando la HSA o una construcción que consistía solo en el dominio I y II de HSA o el dominio III de HSA sobre la superficie de un chip CM5 de Biosensor y haciendo fluir una serie de concentraciones de SABA sobre la celda de flujo y las albúminas capturadas. Los clones de SABA 2 y SABA 1 se unían a la HSA y la construcción del dominio I y II de HSA pero no la construcción del dominio III de HSA. Los clones SABA 3 y SABA 4 se unían a la HSA pero no a las construcciones del dominio I-II de HSA o dominio III de HSA. Los resultados se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15

Afinidad de unión y cinética de las SABA candidatas (SABA 1.1, 2.1, 3.1 y 4.1)					
Adnectina	Diana	K_D (nM)	$K_{off}(s^{-1})$	Resistente al pH 7,4→5,5?	Epítipo en HSA
SABA2	HSA	33,8±20,5 (n=6)	1,71E-04		Dominio I-II
	RhSA	63,6	4,42E-04		
SABA3	HSA	863	6,82E-02	+++ (disminuye hasta un pH 6,0)	Ni el dominio I-II ni III (¿interfásico?)
	RhSA	431	3,37E-02		

SABA4	HSA	412 +/- 8 (n=4)	7,82E-04		Ni el dominio I-II ni III (¿interfásico?)
	RhSA	>1000	3,83E-03		
SABA1	HSA	47,2 +/- 18,2 (n=9)	4,57E-04	+++	Dominio I-II
	RhSA	778+/-313 (n=4)	5,45E-03		

Ejemplo 5E. Examen del $t_{1/2}$ in vivo de las SABA candidatas

Las semivida de HSA en ratones se determinó para permitir la evaluación de las Adnectinas de unión a la HSA en ratones y que las Adnectinas de unión a la HSA no tienen reacción cruzada con la MuSA. La HSA se inyectó en la vena de la cola de aproximadamente ratones hembras Ncr desnudas de 6 semanas de edad a una dosis de 20 mg/kg (Figura 23A) y 50 mg/kg (Figura 23B), y la se determinó concentración de HSA en las muestras de sangre tomadas a intervalos post-inyección por ELISA. Se determinó que el $t_{1/2}$ de HSA inyectada en ratones a dosis de 20 mg/kg y 50 mg/kg eran de ~ 24 h y ~20 h, respectivamente.

10 **Determinación de la semivida de SABA 1.4 en ratones**

Se preparó un litro de cultivo de *E. coli* de clones de unión a HSA SABA1.1 y SABA2.1, SABA3.1, y SABA4.1, se purificó y se retiraron las endotoxinas. Cada variante de SABA se inyectó en la vena caudal de los ratones, y se determinó por ELISA la concentración en muestras de sangre tomadas a intervalos post-inyección.

Se compararon los perfiles farmacocinéticos de cada SABA en presencia o ausencia de HSA en ratones hembras Ncr desnudas de aproximadamente 6 semanas de edad. Los ratones que se co-inyectaron con HSA tendían la HSA premezclada con cada SABA (HSA en un exceso 3-4 molar) debido a que el clon de unión era selectivo para HSA y RhSA y no se unía a la seroalbúmina de ratón. La semivida de SABA 1.1 (clon 1318H04) en el plasma de ratones era de 0,56 horas mientras que la semivida de SABA 1.1 co-inyectada con HSA era de 5,6 horas, la semivida aumentaba ~ 10 veces (Figura 24A). La semivida de la SABA 2.1 en el plasma de ratones era 0,24 horas mientras que la semivida de SABA 2.1 co-inyectada con HSA era de 2,8 horas, un aumento de la semivida de ~12 veces (Figura 24B). La semivida de la SABA3.1 (clon 1245H07) en el plasma de los ratones era de 0,28 horas mientras que la semivida de SABA 3.1 co-inyectada con HSA era de 0,53 horas, un aumento de la semivida de ~ 2 veces (Figura 24C). La semivida de SABA 4.1 en el plasma de los ratones era de 0,55 horas mientras que la semivida de SABA 4 co-inyectada con HSA era de 4,6 horas, un aumento de la semivida de ~7 veces (Figura 24D). Un resumen del presente ejemplo se muestra en la Figura 25. La Tabla 16 resume datos similares para SABA 1.1, SABA2.1, SABA3.1 y SABA 4.1; se hace una comparación con la semivida en cyno cuando esté disponible.

30 **Tabla 16**

CLON	PK($T_{1/2}$)		Comentarios
	Ratones	Cyno	
SABA1.1	5,6 h	96-137 h	$T_{1/2} = 96-137$ h
SABA5.1	4,6 h	12 h	Baja afinidad de unión por RhSA. Disminución de 2 veces en la K_D observada a pH<6,0
SABA2.1	2,8 h	NA	Pérdida de unión a pH <6,5
SABA3.1	32 min	NA	Bajo $T_{1/2}$ observado en ratones

Determinación de la semivida de SABA1.1 y SABA5.1 en monos Cynomolgus

Se llevó a cabo un estudio de prueba de concepto de una dosis única de tres semanas (Figura 25A) y SABA5.1 (Figura 26B) en monos Cynomolgus para evaluar la farmacocinética a una dosis de 1 mg por kg (mpk) IV en 2 monos Cynomolgus. La farmacocinética se evaluó utilizando un ensayo basado en ELISA en el intervalo de 96-137 horas (Figura 26A y Tabla 17A). La SABA5.1 tiene una semivida de aproximadamente 13 horas y solo era medible en el ELISA hasta las 120 horas (Figura 26B). La Tabla 17A resume los datos para SABA 1.1; La Tabla 17B resume los datos para SABA5.1.

Tabla 17A

SABA 1.1					
Mono	$T_{1/2}$ (h)	Cmax (μ g/ml)	AUCtotal ($h \cdot \mu$ g/ml)	Cl_obs (ml/h/kg)	Vz_obs (ml/kg)
Nº 1	95,8	9,03	673,7	1,45	200,8
Nº 2	136,6	7,24	625,1	1,60	315,2

Tabla 17B

SABA5.1					
	HL_Lambda_z (h)	Cmax (µg/ml)	AUCtotal (h* µg/ml)	Cl_obs (ml/h/kg)	Vz_obs (ml/kg)
N	2	2	2	2	2
Mean	12,186	17,358	246,882	4,089	72,507
SD	1,451	3,08	36,245	0,596	19,045
Min	11,16	15,18	221,25	3,67	59,04
Max	13,21	19,54	272,51	4,51	85,97
CV %	11,9	17,7	14,7	14,6	26,3

5 Ejemplo 5F. Caracterización de la unión de SABA1 a la seroalbúmina

SABA1.1 y 1.2 se unen a HSA y RhSA

- La SABA1.2, un “centro 1” de ¹⁰F_n3 que comprende una extensión (ED)5 (SEQ ID NO: 421 de la Tabla 6) se unía a la seroalbúmina humana (HSA) a pH neutro y 25 °C con una constante de velocidad de asociación media (k_a) de 8,21E+03 M⁻¹s⁻¹, y una constante de velocidad de disociación media (k_d) de 4,43E-04 s⁻¹, para una K_d media de 55,3 nM (Tabla 18). Para la seroalbúmina de rhesus (RhSA), la constante de velocidad de asociación medida era 6,6E+03 M⁻¹s⁻¹, y la constante de velocidad de disociación era 3,78E-03 s⁻¹, dando una K_d media calculada de 580 nM. No se pudo observar una interacción medible entre SABA1.2 y la seroalbúmina de ratón o rata hasta 1 µM (Tabla 18 y Figura 27). A 37 °C, la k_a y k_d aumentaban entre 2 a 5 veces, dando lugar a un aumento de ~2 veces en la afinidad por la HSA y 1/2 la afinidad por RhSA (Tabla 18).

Tabla 18

Parámetros cinéticos de la unión de SABA1.2 a las albúminas, en tampón HBS-P				
Albumina	Temp (°C)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (nM)
Ser humano	25	8,21 ± 1,19 E+03	4,43 ± 0,65 E-04	55,3 ±13,7
Rhesus		6,60 ± 1,18 E+03	3,78 ± 0,45 E-03	580 ±62,6
Ratón		Unión no observable		
Ser humano	37	3,38E+04	8,15E-04	24,1
Rhesus		1,89E+04	1,85E-02	977,4
Ratón		Unión no observable		

- Adicionalmente, se llevó a cabo una titulación calorimétrica para determinar la estequiometría entre SABA 1 y HSA. Para este estudio, se utilizó la SABA 1.1, un “centro 1” de ¹⁰F_n3 que comprendía una extensión His6 (SEQ ID NO: 420 de la Tabla 6). La HSA (10 µl por inyección de 115 µM de solución proteica) se inyectó en la celda calorimétrica que contenía SABA1.1 a una concentración de 8,1 µM. El experimento se llevó a cabo a 37 °C en tampón PBS a un pH de 7,4. La Figura 28 muestra que SABA1.1 se une a HSA con una estequiometría 1:1.

SABA1.2 se une con potencia a la HSA a pH bajo

- La larga semivida de las albúminas (por ejemplo, el t_{1/2} de HSA es de 19 días) es debida en gran parte al hecho de que se reciclan de la ruta endocítica uniéndose al receptor FC neonatal, FcRn, en las condiciones de bajo pH que existen en el interior del endosoma. Como se muestra en la Tabla 18 la SABA 1.2 se une con potencia a HSA al pH endosómico de 5,5, sugiere que el t_{1/2} de SABA1, una vez que se une a la HSA, también se beneficiaría del mecanismo de reciclaje de FcRn.

Tabla 19

Comparación de cinéticas de unión a la albúmina a pH 7,4 y 5,5, tampón MES				
Albumina	pH	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (nM)
Ser humano	7,4	9,26E+03	3,88E-04	41,9
	5,5	9,44E+03	2,70E-04	28,6
Rhesus	7,4	6,16E+03	2,95E-03	479
	5,5	7,57E+03	2,72E-03	359

Saba 1.2 se une a los dominios I y II de HSA pero no al dominio III

El sitio de unión para SABA1.2 sobre la albúmina se mapeó hasta los dominios I o II del extremo N utilizando fragmentos recombinantes de HSA y no se une detectablemente al dominio III (Figura 29). Debido a que el dominio III es el dominio de HSA que interactúa primariamente con el FcRn, es menos probable que SABA1.2 compita con la unión de HSA a FcRn, de nuevo aumentando la posibilidad de aprovechar completamente el mecanismo de reciclado para aumentar la semivida.

Ejemplo 5G. Farmacología *in vivo* de SABA1.2

Un estudio pre-toxicológico de una dosis única de cuatro semanas de SABA 1.2 se llevó a cabo en mismos Cynomolgus para evaluar la farmacocinética y la inmunogenicidad en dos niveles de dosis diferentes. La farmacocinética e inmunogenicidad también se evaluó en un estudio pre-toxicológico de dosis única de tres semanas que incluía las formas de administración intravenosa y subcutánea. Adicionalmente, se evaluó la farmacocinética de SABA1.2 en dos estudios pre-toxicológicos por separado en monos Cynomolgus utilizando un ensayo basado en ELISA que se desarrolló para detectar SABA1.2 en muestras de plasma.

Se administró SABA1.2 a monos a 1 mpk y 10 mpk IV. Se llevaron a cabo análisis no compartimentales utilizando el software WINNONLIN® para evaluar los parámetros farmacocinéticos. Como se muestra en la Figura 30 y los parámetros descritos posteriormente, SABA1.2 presentaba farmacocinética dependiente de la dosis en este estudio como se determinó por la evaluación del área bajo la curva (AUC) de concentración-tiempo. El aclaramiento (CL) para SABA1.2 a 10 mpk era de 0,15 ml/h/kg, la semivida de la fase beta ($t_{1/2}$) era de 143 horas, el volumen de distribución (Vz) era de 30 ml/kg, y la exposición del fármaco total (AUCtotal) era de 5.609.457 h*nmol/l (Tabla 20). El aclaramiento para SABA 1.2 a 1 mpk era de 0,4 ml/h/kg, la semivida ($t_{1/2}$) era de 124 horas, el volumen de distribución (Vz) era 72 ml/kg, y la exposición total del fármaco (AUCtotal) era 214.636 h*nmol/l (Tabla 20).

Después de la administración SC o IV de SABA 1.2, los perfiles farmacocinéticos de la fase beta eran similares (Figura 31). El aclaramiento (CL) para SABA 1.2 a 1 mpk IV era de 0.22 ml/h/kg, la semivida en fase beta ($t_{1/2}$) era de 125 horas, el volumen de distribución (Vz) era de 40 ml/kg, y la exposición al fármaco total (AUCtotal) era 357.993 h*nmol/l (Tabla 20). El aclaramiento (CL) para SABA 1.2 a 1 mpk SC era de 0,32 ml/h/kg, la semivida en fase beta ($t_{1/2}$) era 134 horas, el volumen de distribución (Vz) era de 62 ml/kg, y la exposición total al fármaco (AUCtotal) era 251.339 h*nmol/l (Tabla 20). La biodisponibilidad (F) SC relativa en comparación a la IV era de 0,7.

Tabla 20

Parámetros farmacocinéticos para SABA 1.2 en monos				
Estudio nº	1		2	
Dosis (mg/kg)	1	10	1	1
Vía de administración	i.v.	i.v.	i.v.	s.c.
N	3	3	1	2
Cl (ml/h/kg)	0,4	0,15	0,22	0,32
Vz (ml/kg)	72	30	40	62
AUCtotal (h*nmol/l)	214.636	5.609.457	357.993	251.339
beta $T_{1/2}$ (h)	124	143	125	134
Biodisponibilidad (F)	n/a	n/a	n/a	0.7

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende un décimo dominio tipo III de fibronectina (¹⁰Fn3) que tiene un bucle BC, uno DE y uno FG, en donde el bucle FG comprende una secuencia de acuerdo con la fórmula EX₄X₁X₅X₁X₆GYX₄HR (SEQ ID NO: 451), en donde X₁ es cualquier aminoácido; X₄ es Y o F; X₅ es Y, F o W; y X₆ es S o A, y en donde el polipéptido se une a la proproteína convertasa subtilisina kexina tipo 9 (PCSK9).
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido se une a PCSK9 con una K_D de menos de 500 nM.
3. El polipéptido de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el bucle FG comprende una secuencia de aminoácidos que tiene los aminoácidos 1-12 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 28-38 y 142-172.
4. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el bucle FG se selecciona de entre las SEQ ID NO: 28-38 y 142-172.
5. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el bucle BC comprende una secuencia de acuerdo con la fórmula (X₁)_zX₂G (SEQ ID NO: 449) donde X₁ es cualquier aminoácido, Z es un número del 6-9 y X₂ es Y o H.
6. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el bucle BC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene:
 - los aminoácidos 3-10 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 2-17, 110, 112, 114, 118-120, 122, 124-126, 133-135 y 301-303, o
 - los aminoácidos 3-11 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 107-109, 111, 113, 115, 116, 121, 127 y 132, o
 - los aminoácidos 3-12 de las SEQ ID NO: 123 o 131, o
 - los aminoácidos 3-13 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 117, 128 y 130, o
 - los aminoácidos 3-14 de la SEQ ID NO: 129.
7. El polipéptido de las reivindicaciones 5 o 6, en el que el bucle BC se selecciona de entre las SEQ ID NO: 2-17, 107-135 y 301-303.
8. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el bucle DE comprende una secuencia de acuerdo con la fórmula X₁X₁X₁X₃, (SEQ ID NO: 450) donde X₁ es cualquier aminoácido y X₃ es G o S.
9. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 u 8, en el que el bucle DE comprende una secuencia de aminoácidos que tiene los aminoácidos 2-5 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 18-27 y 136-141.
10. El polipéptido de las reivindicaciones 8 o 9, en el que el bucle DE se selecciona de entre las SEQ ID NO: 18-27 y 136-141.
11. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la secuencia de aminoácidos de los bucles BC, DE o FG es al menos un 80 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 2-38, 106-172 y 301-303.
12. El polipéptido de la reivindicación 11, en el que la secuencia de aminoácidos de los bucles BC, DE y FG es al menos un 80 % idéntica a las SEQ ID NO: 14, 25 y 37.
13. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el bucle BC comprende la SEQ ID NO: 14, el bucle DE comprende la SEQ ID NO: 25 y el bucle FG comprende la SEQ ID NO: 37.
14. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el bucle BC comprende la SEQ ID NO: 112, el bucle DE comprende la SEQ ID NO: 138 y el bucle FG comprende la SEQ ID NO: 156.
15. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica de una cualquiera de las SEQ ID NO: 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 304, 306 y 308.
16. El polipéptido de la reivindicación 15, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos del dominio Fn3 de la posición 3-96 de la SEQ ID NO: 69.
17. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 209.

18. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 82.
- 5 19. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, que comprende adicionalmente uno o más restos farmacocinéticos (PK) seleccionados de entre el grupo que consiste en polietilenglicol, ácido siálico, Fc, un fragmento de Fc, transferrina, seroalbúmina, una proteína de unión a la seroalbúmina y una proteína de unión a la inmunoglobulina sérica.
- 10 20. El polipéptido de la reivindicación 19, en el que la proteína de unión a la seroalbúmina comprende un dominio Fn3.
21. El polipéptido de la reivindicación 20, en el que el dominio ¹⁰Fn3 se une a la HSA.
- 15 22. El polipéptido de la reivindicación 19, en el que el resto PK es polietilenglicol.
23. Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde la composición está esencialmente libre de endotoxinas.

FIG. 1

1459D05	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWPPPSHGYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PPGKGTAT</u>
1784F03	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWRPPIHAYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PIVEGTAT</u>
1784F03-m1	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWDAPAHAYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PGSEGTAT</u>
1784F03-m2	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWDAPAHAYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PGSKGTAT</u>
1784F03-m3	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWDAPAVTYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PGSKSTAT</u>
1813E02	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWSPPANGYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PVGRGTAT</u>
1923B02	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWTPPPKGYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PVGEGTAT</u>
1923B02_N82I	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWTPPPKGYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PVGEGTAT</u>
1923B02_N82E	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWTPPPKGYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PVGEGTAT</u>
1923B02_T80A	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWTPPPKGYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PVGEGTAT</u>
1922G04	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWRPPSHAYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PIGKGTAT</u>
1922G04_R25D	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWDPPSHAYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PIGKGTAT</u>
1922G04_R25E	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWEPPSHAYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PIGKGTAT</u>
1922G04_R25S	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWSPPSHAYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PIGKGTAT</u>
2012A04	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWRPPSNHGYYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PVNEGTAT</u>
2013E01	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWVPPSDDYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PIGKGTAT</u>
2011H05	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWVPSHAYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PVGVGAT</u>
2011H05_V23D	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWDPPSHAYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PVGVGAT</u>
2011H05_V23E	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI <u>ISWEPPSHAYGYRITY</u> GETGGNSPVQEFTV <u>PVGVGAT</u>
1459D05	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>PKHSGYYHRP</u> ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH (SEQ ID NO:39)
1784F03	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>TFKHSGYYHRP</u> ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH (SEQ ID NO:41)
1784F03-m1	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>TFKHSGYYHRP</u> ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH (SEQ ID NO:43)
1784F03-m2	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>TFKHSGYYHRP</u> ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH (SEQ ID NO:45)
1784F03-m3	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>TFKHSGYYHRP</u> ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH (SEQ ID NO:47)
1813E02	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>TKGSGYYHRP</u> ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH (SEQ ID NO:49)
1923B02	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>TYNGAGYYHRP</u> ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH (SEQ ID NO:51)
1923B02_N82I	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>TYIGAGYYHRP</u> ISINYRTG---SGSHHHHHH (SEQ ID NO:53)
1923B02_N82E	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>TYEGAGYYHRP</u> ISINYRTG---SGSHHHHHH (SEQ ID NO:55)
1923B02_T80A	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>AYNGAGYYHRP</u> ISINYRTG---SGSHHHHHH (SEQ ID NO:57)
1922G04	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>PWKSGSGYYHRP</u> ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH (SEQ ID NO:59)
1922G04_R25D	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>PWKSGSGYYHRP</u> ISINYRTG---SGSHHHHHH (SEQ ID NO:61)
1922G04_R25E	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>PWKSGSGYYHRP</u> ISINYRTG---SGSHHHHHH (SEQ ID NO:63)
1922G04_R25S	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>PWKSGSGYYHRP</u> ISINYRTG---SGSHHHHHH (SEQ ID NO:65)
2012A04	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>FPFKWSGYYHRP</u> ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH (SEQ ID NO:67)
2013E01	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>FPWPHAGYYHRP</u> ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH (SEQ ID NO:69)
2011H05	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>AFEGAGYYHRP</u> ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH (SEQ ID NO:71)
2011H05_V23D	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>AFEGAGYYHRP</u> ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH (SEQ ID NO:73)
2011H05_V23E	ISGLKPGVDYTITVYAVEY <u>AFEGAGYYHRP</u> ISINYRTEIDKPSQHSHHHHH (SEQ ID NO:75)

FIG. 2

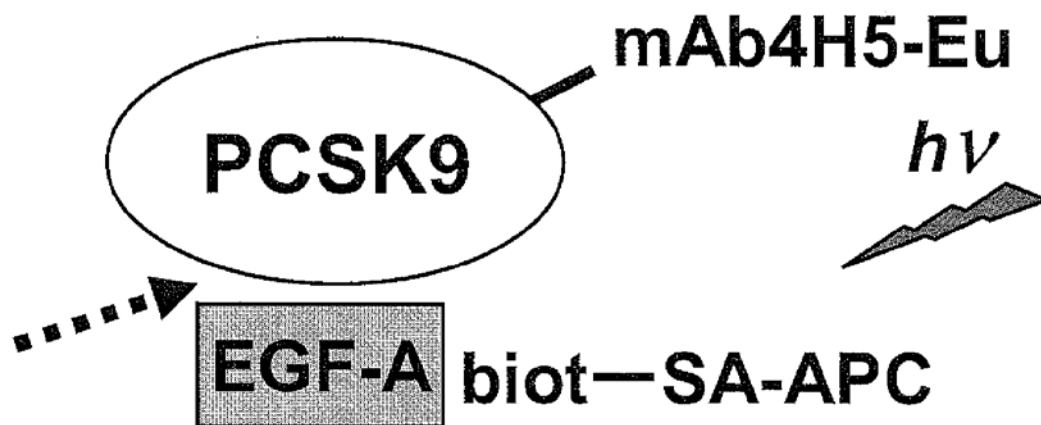


FIG. 3

A.

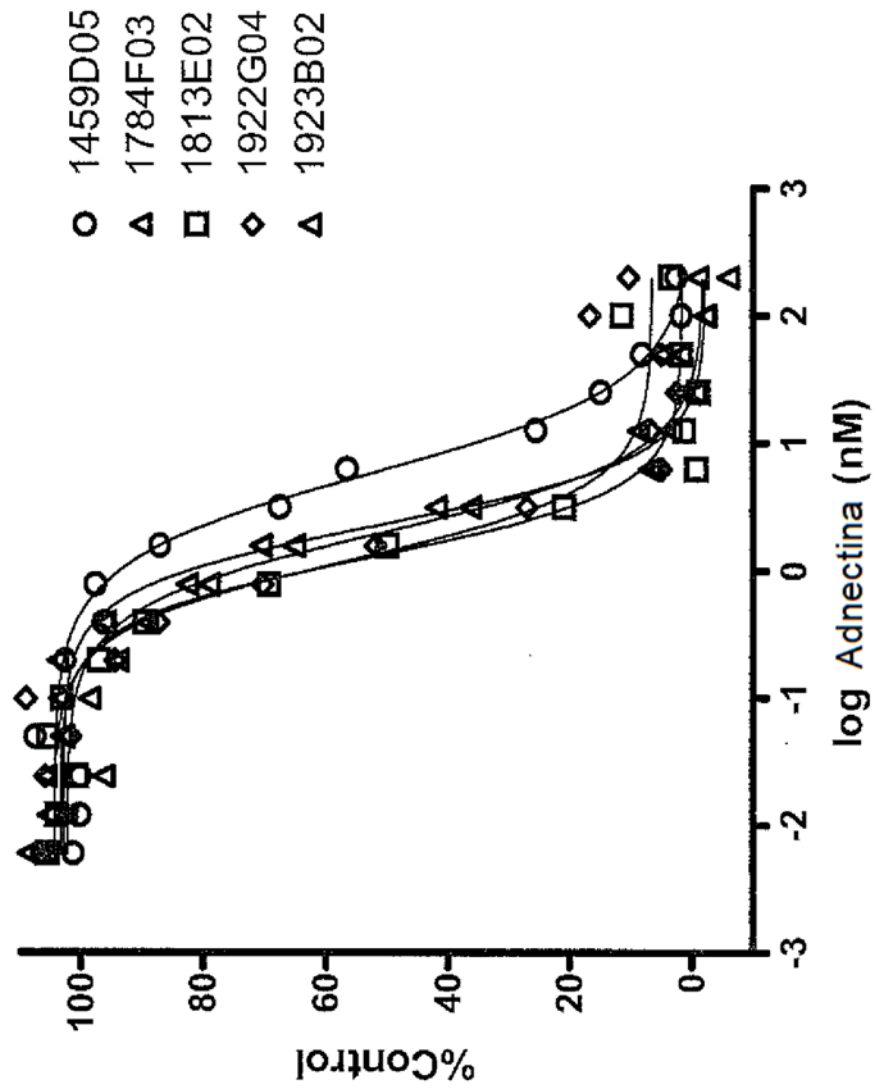


FIG. 3 (continuación)

B.

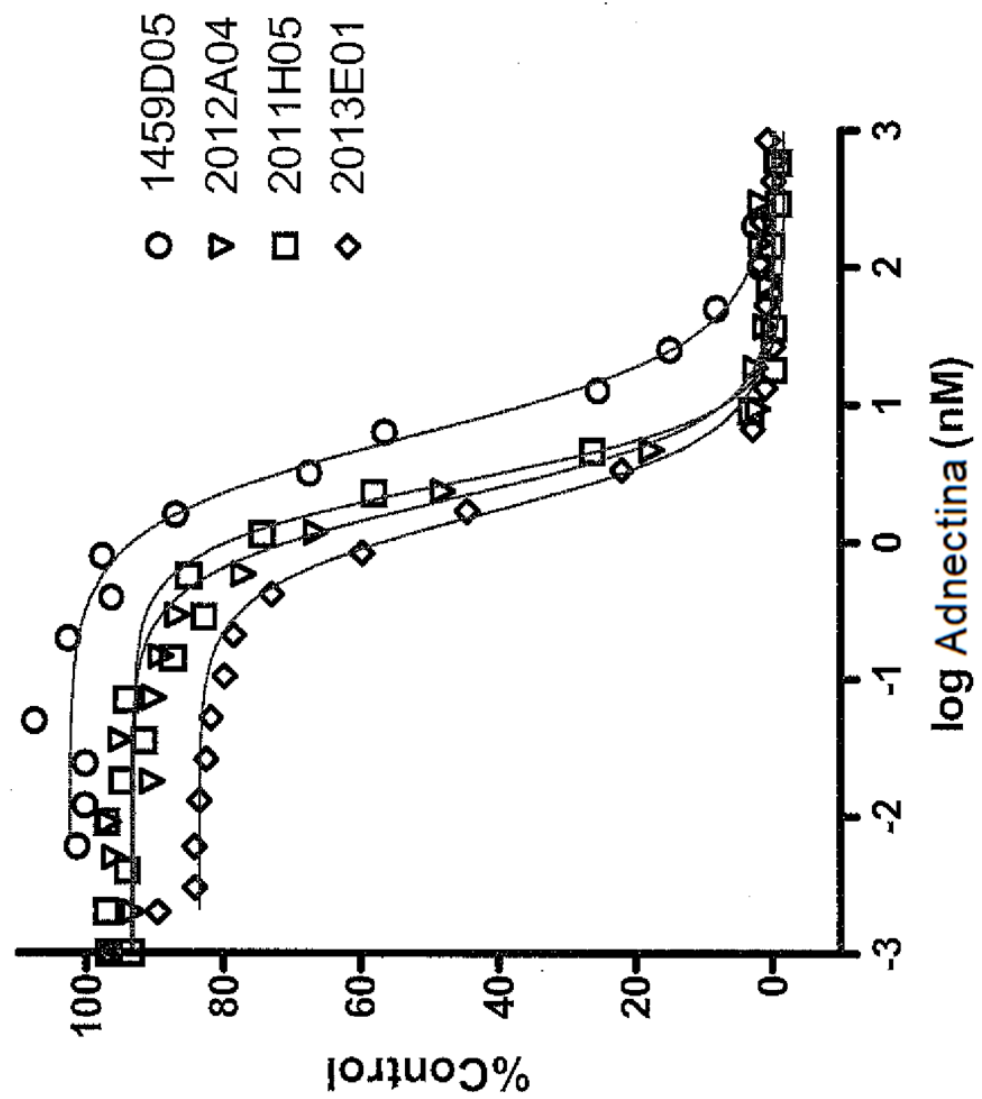


FIG. 4

A.

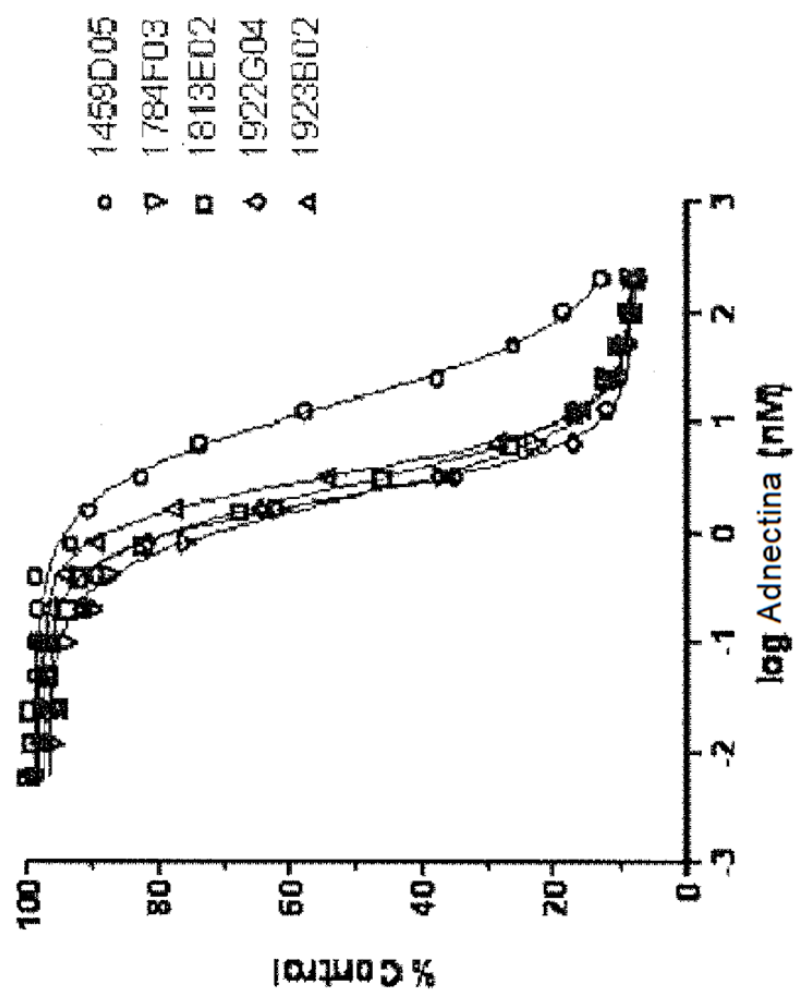


FIG. 4 (continuación)

B.

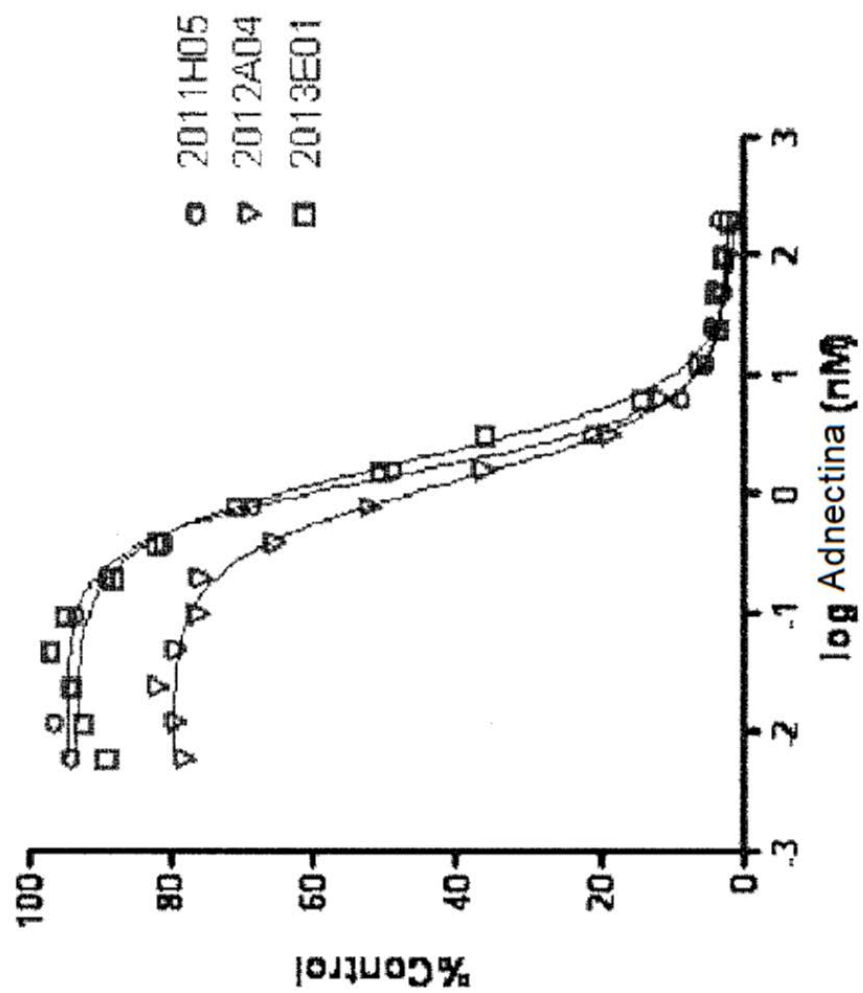


FIG. 5

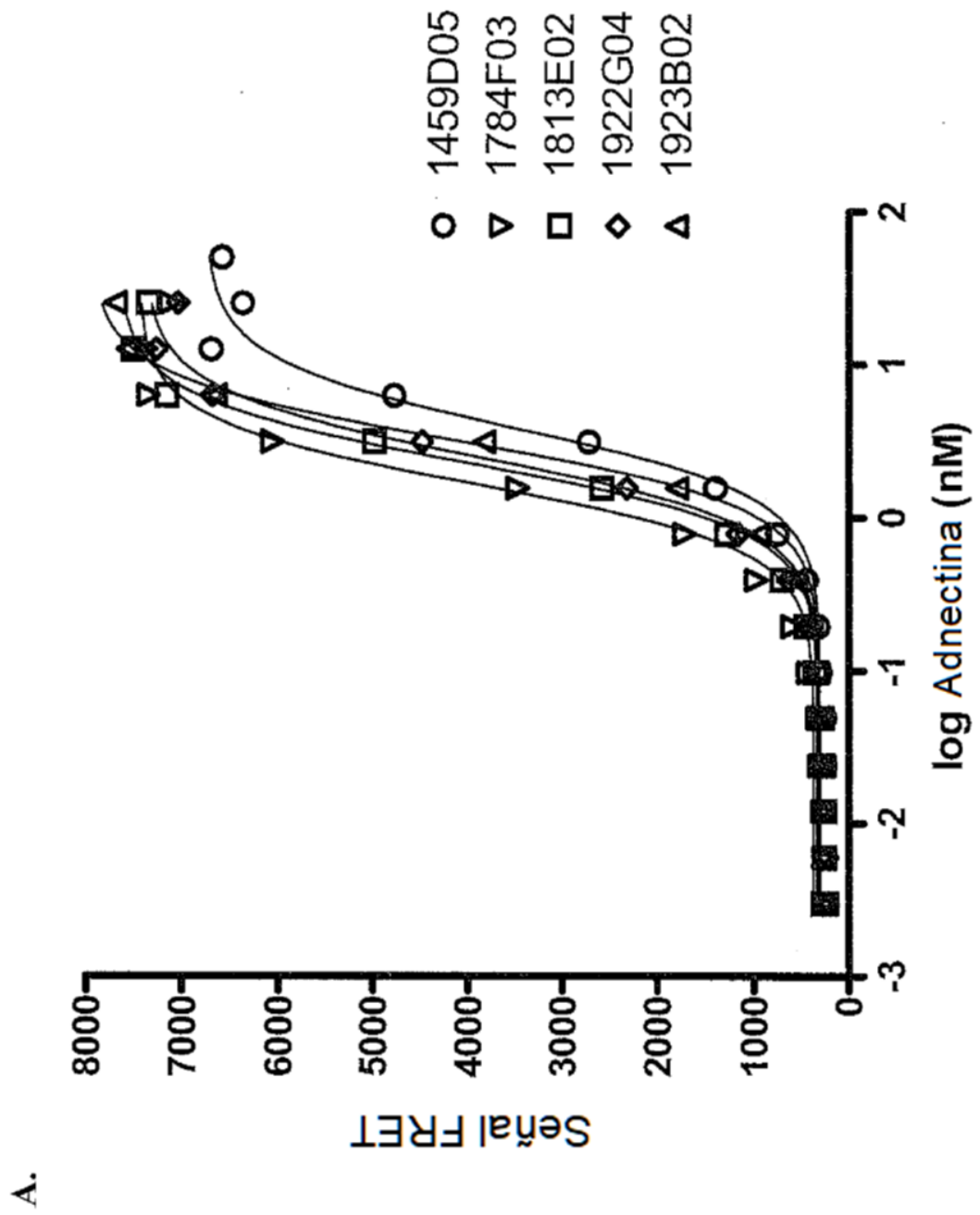


FIG. 5 (continuación)

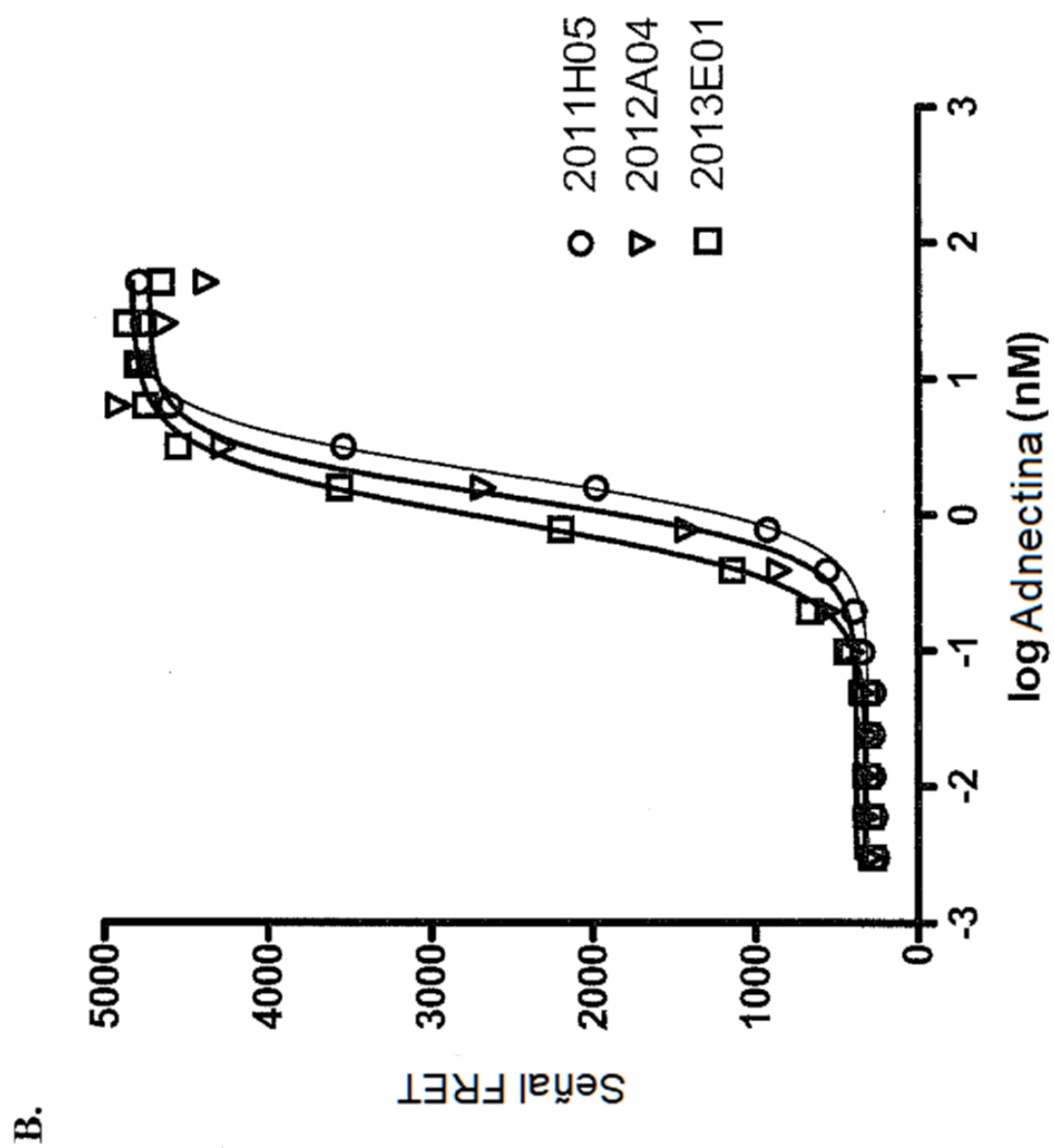


FIG. 6

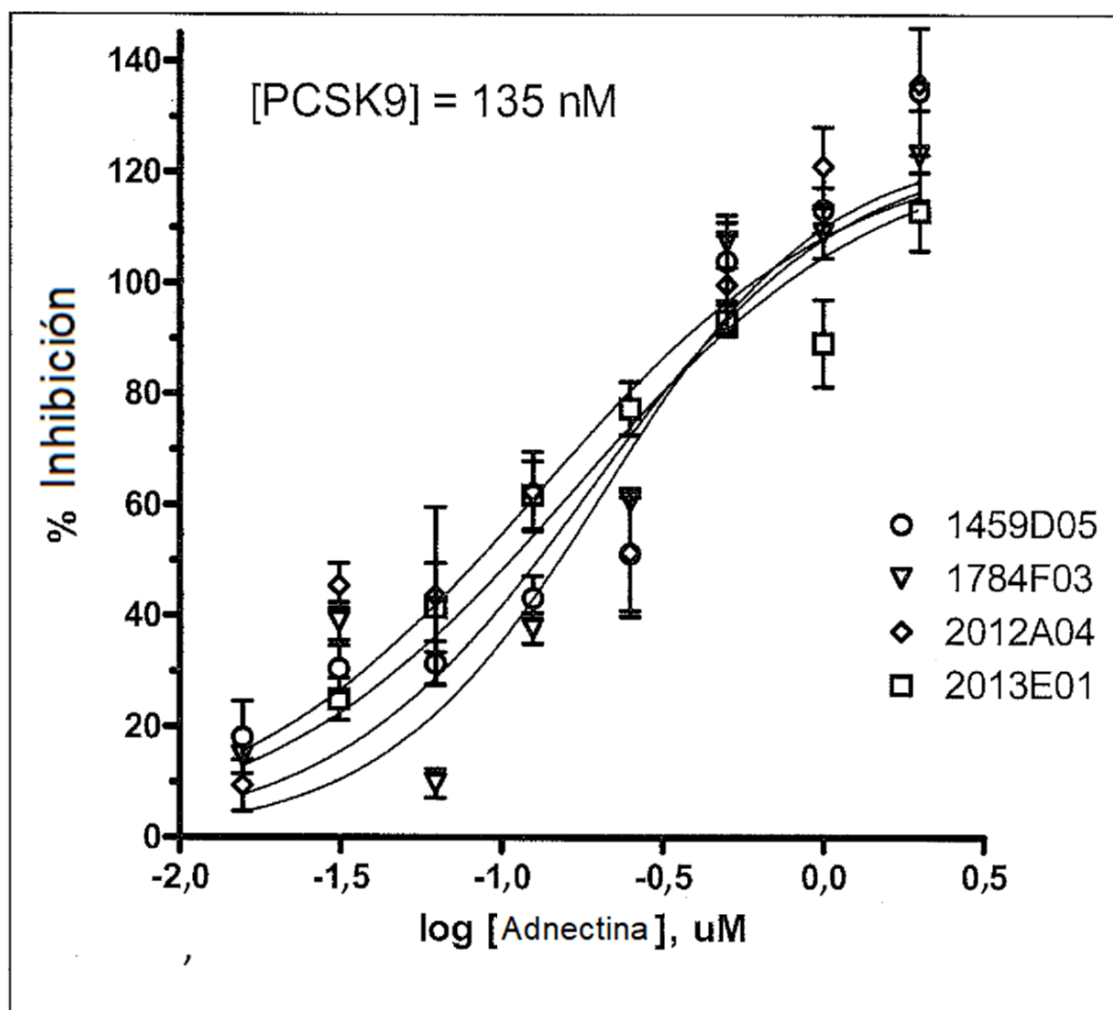
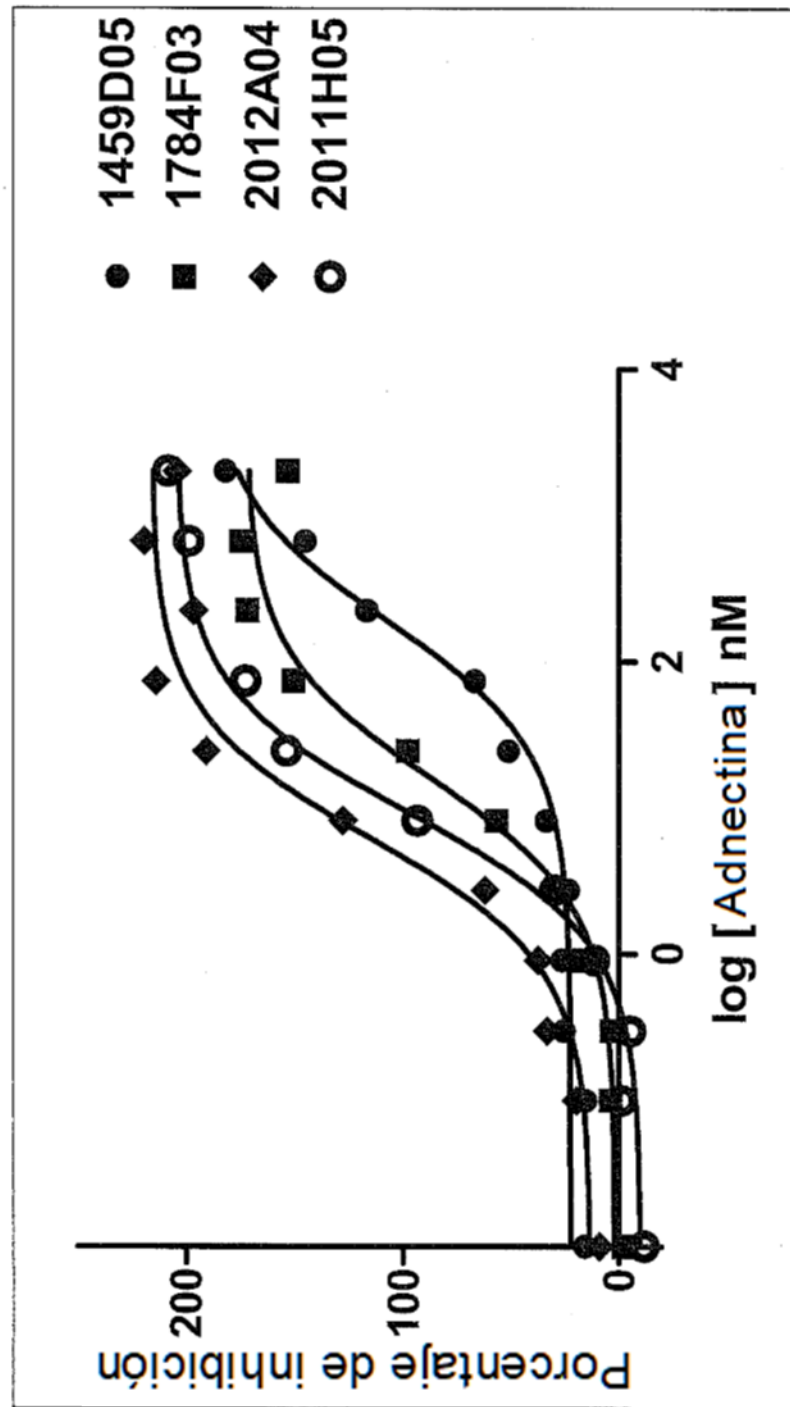
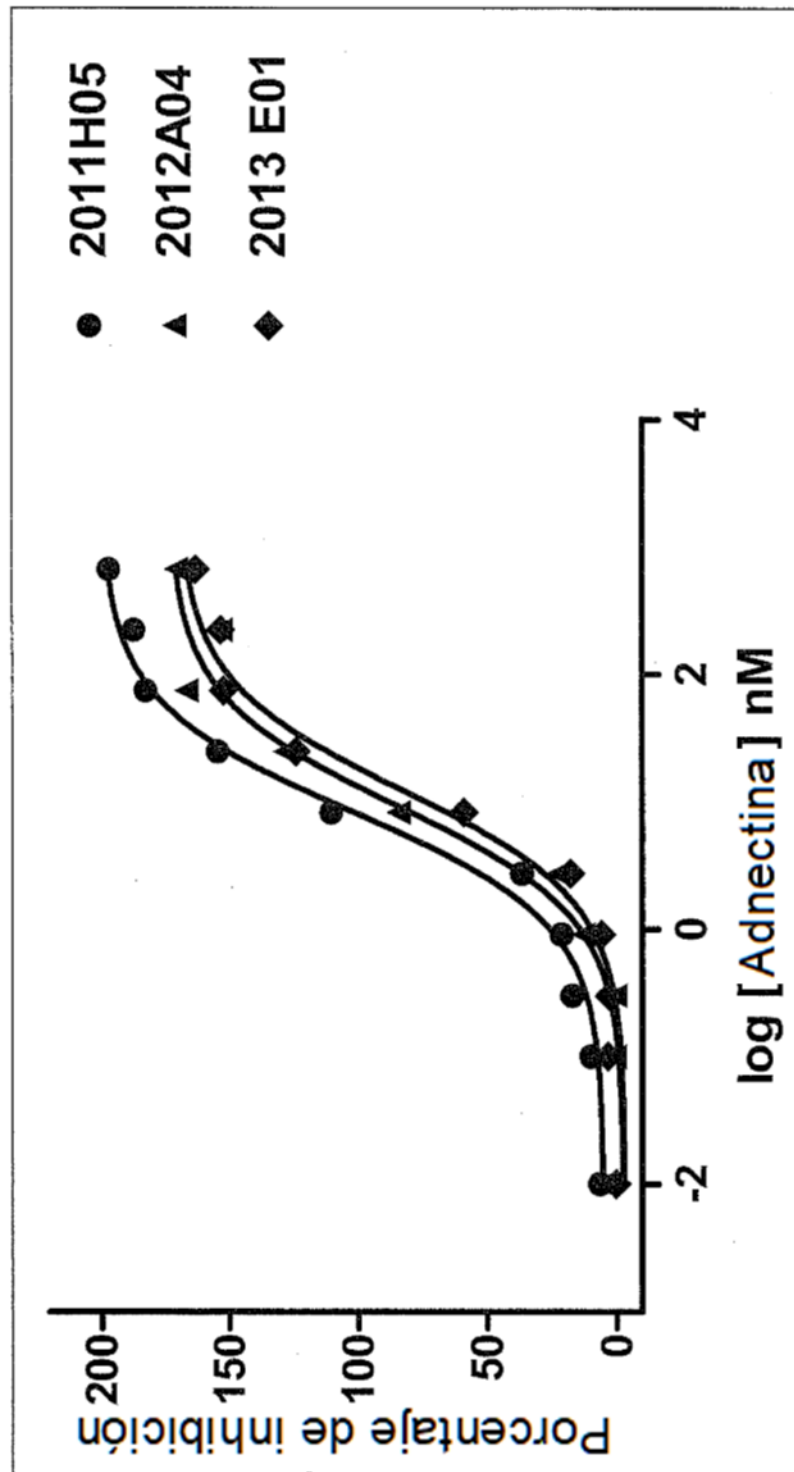


FIG. 7



A.

FIG. 7 (continuación)



B.

A.

FIG. 8

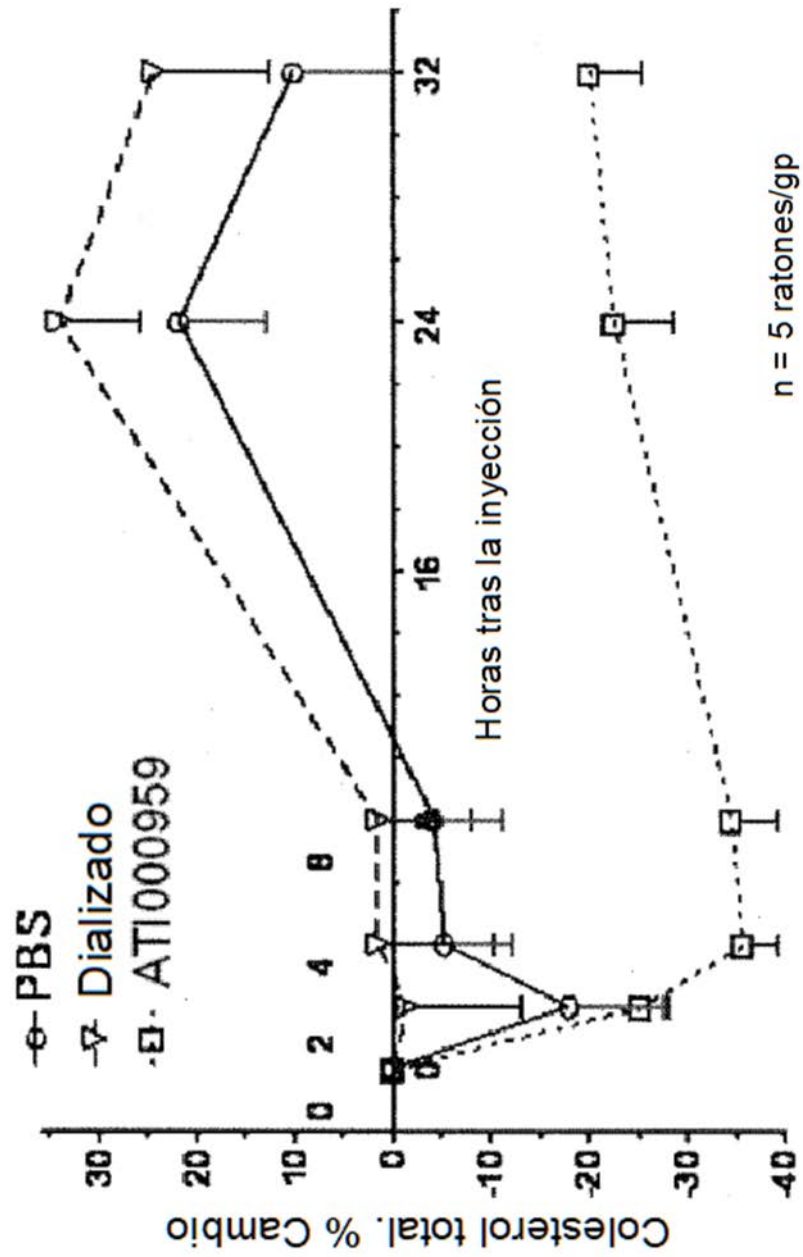


FIG. 8 (continuación)

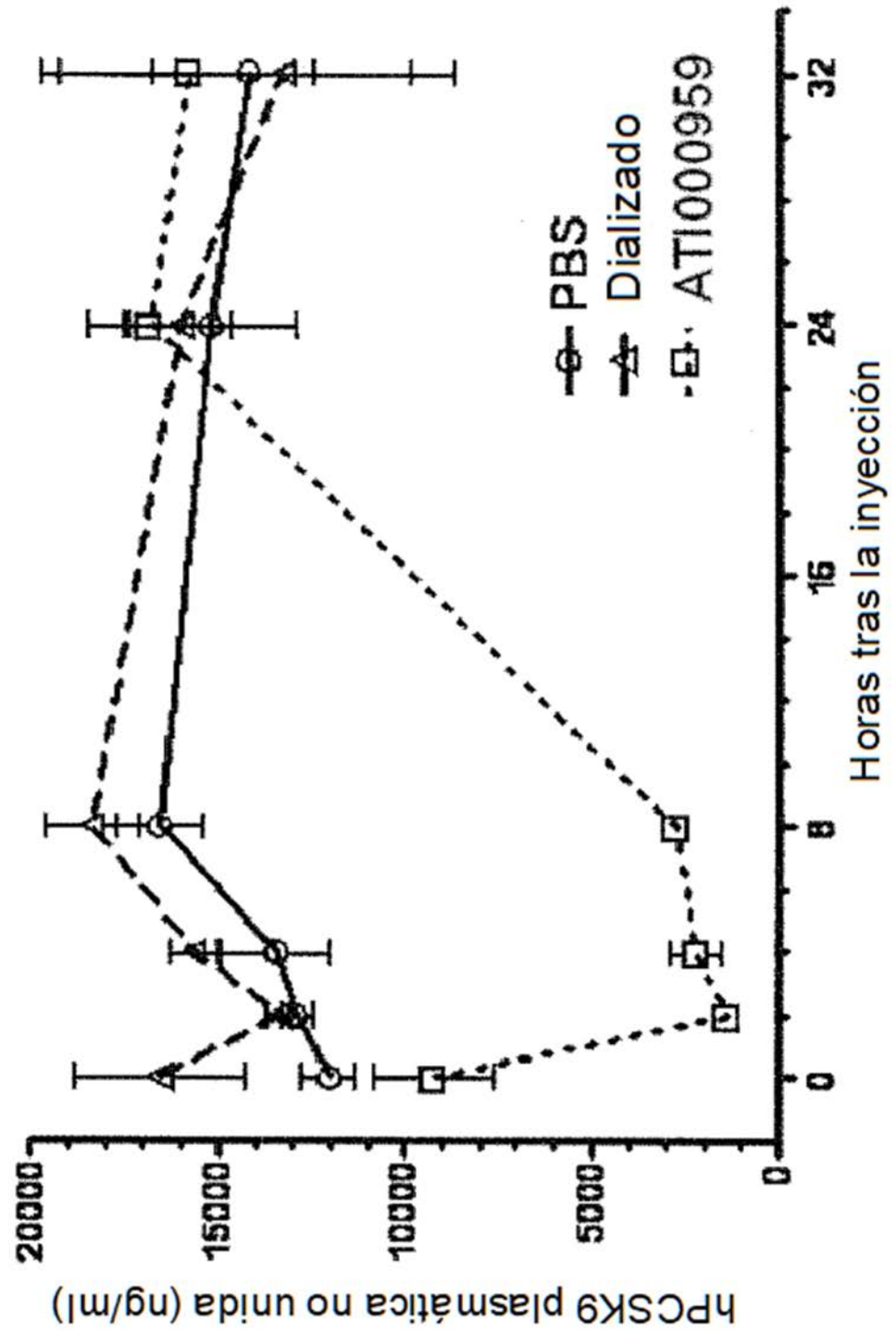
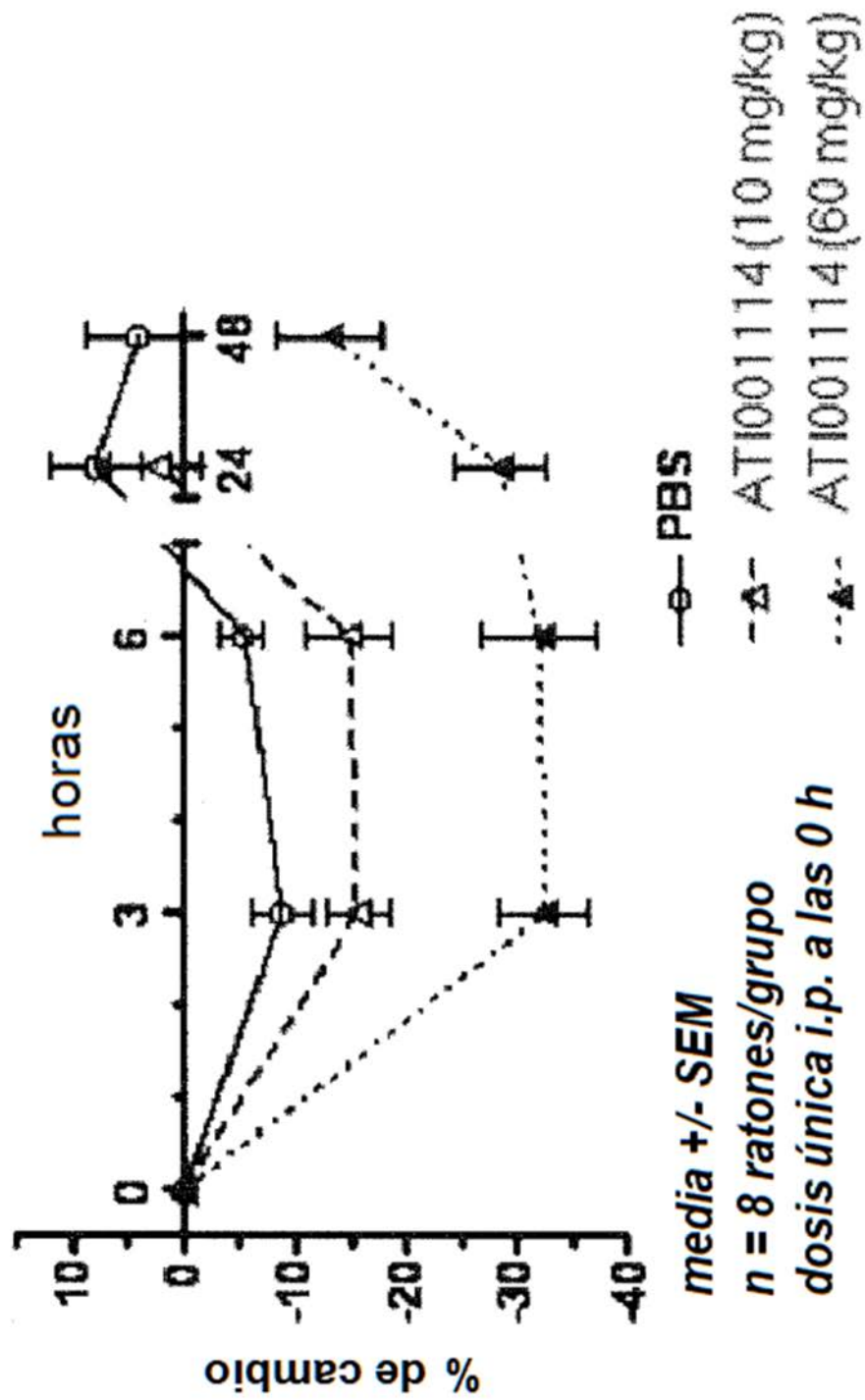


FIG. 9



B.

FIG. 9 (continuación)

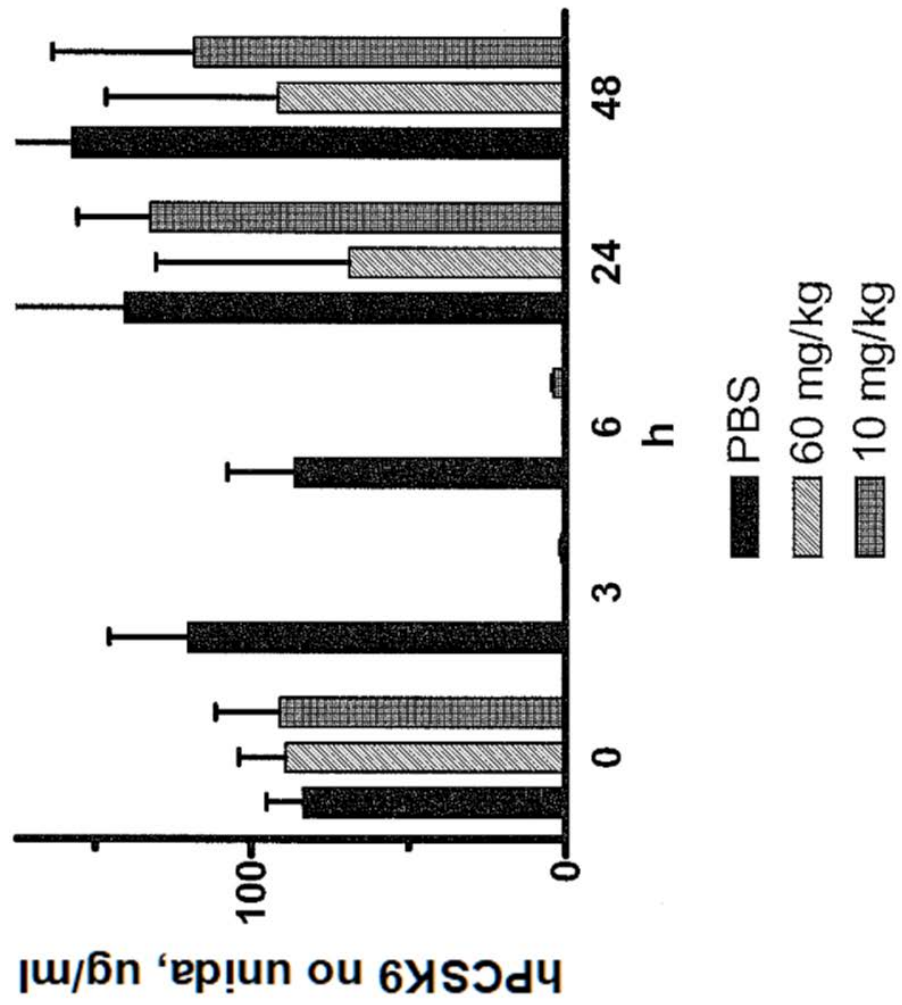


FIG. 10

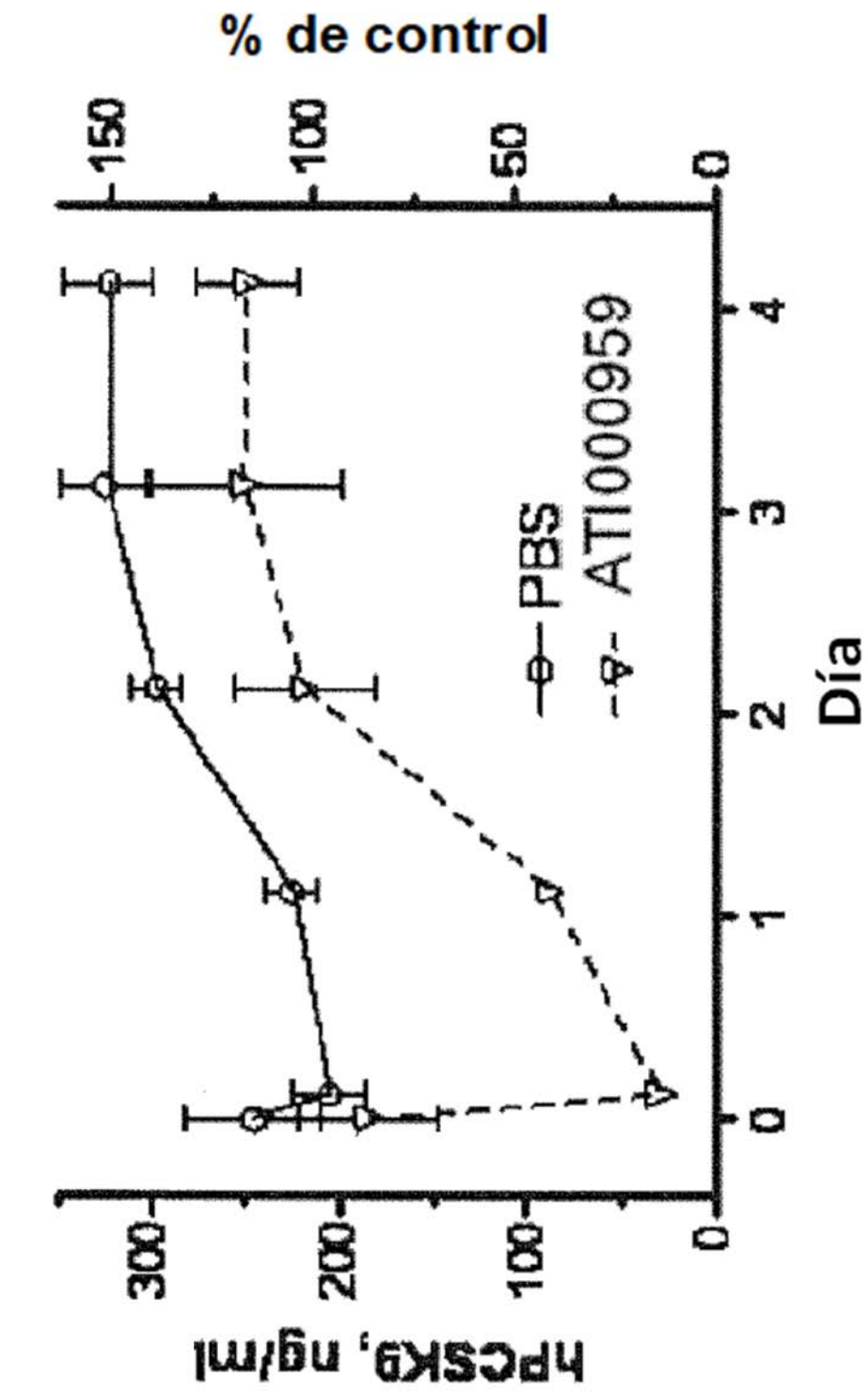
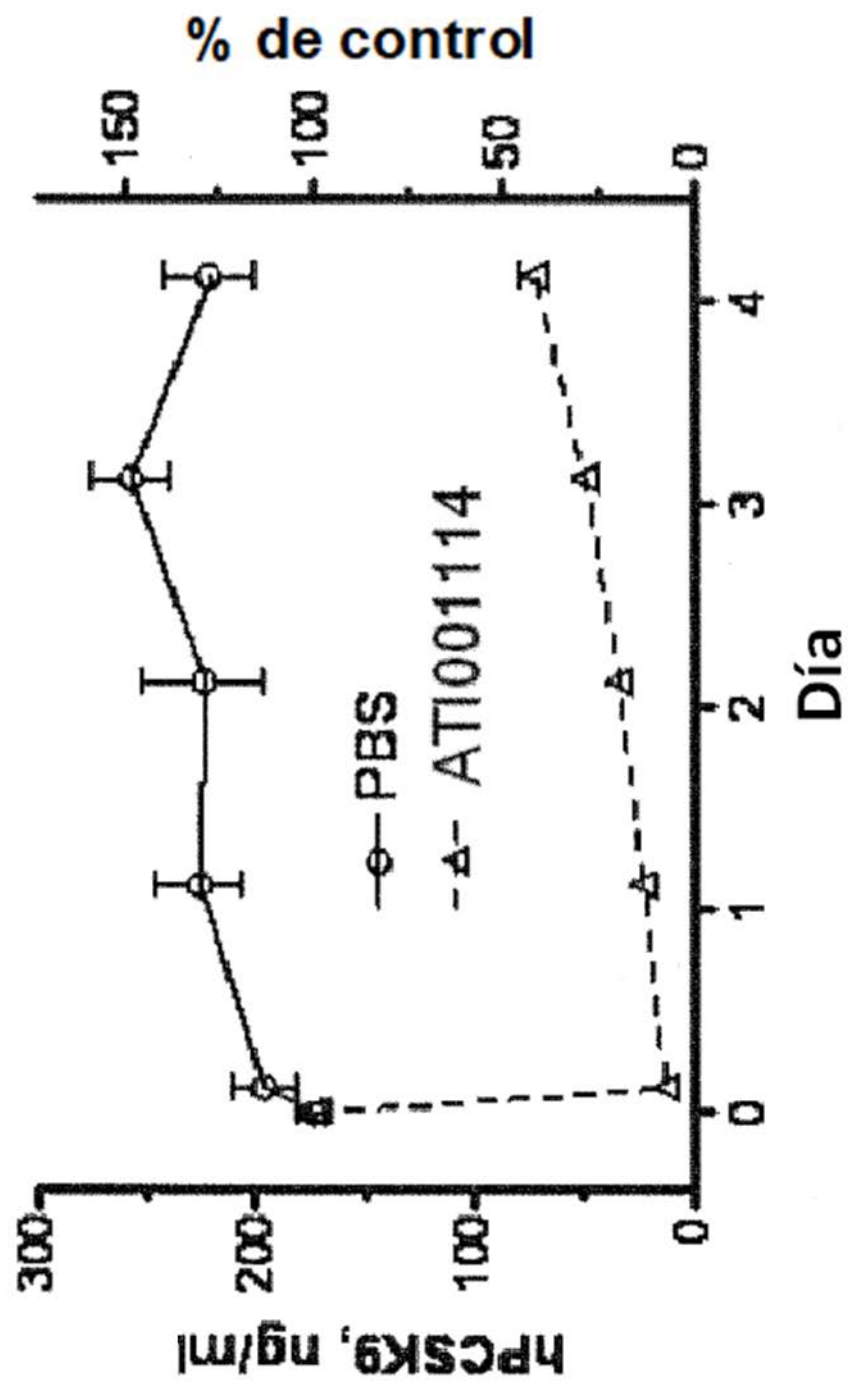


FIG. 10 (continuación)



B.

FIG. 11

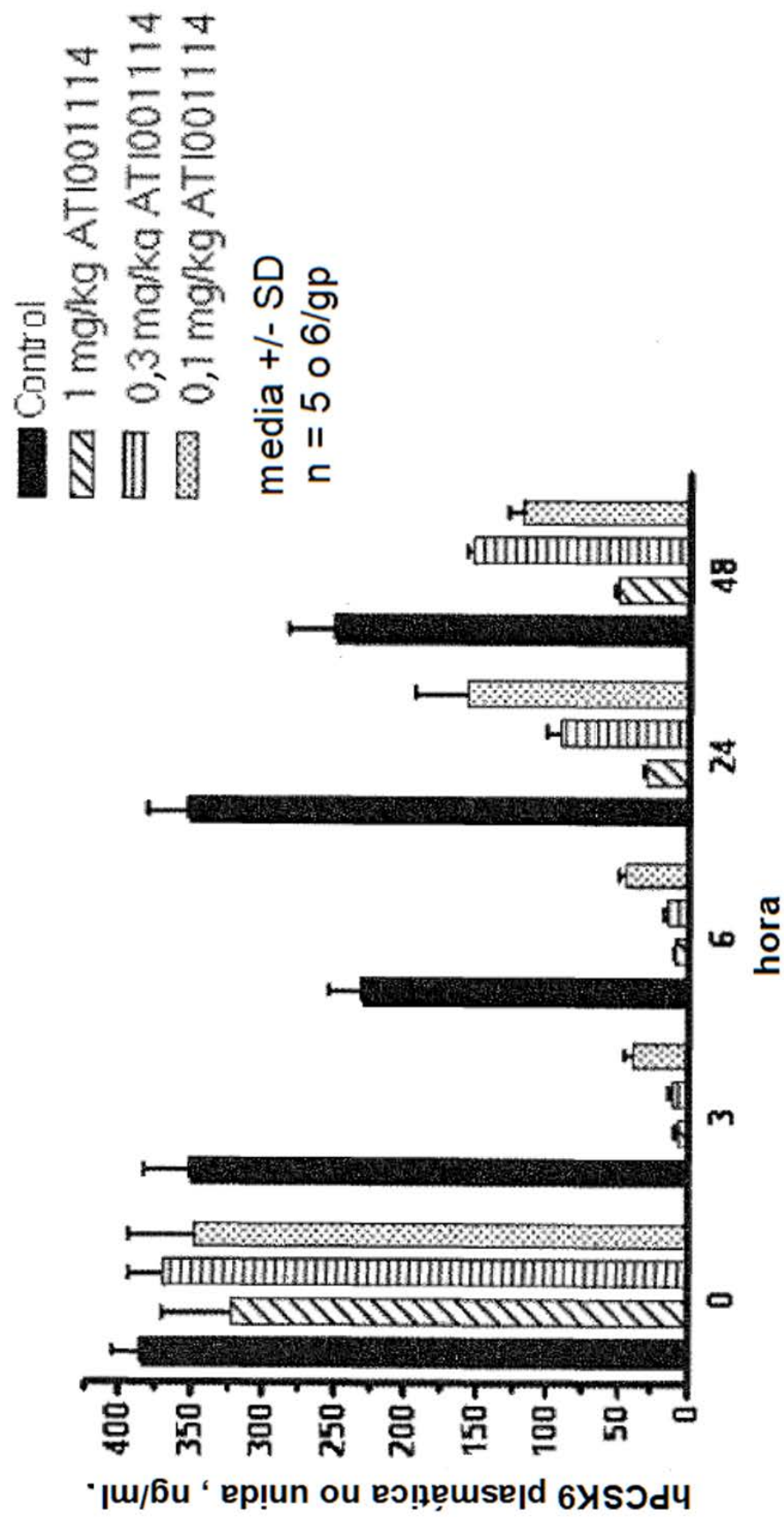


FIG. 12

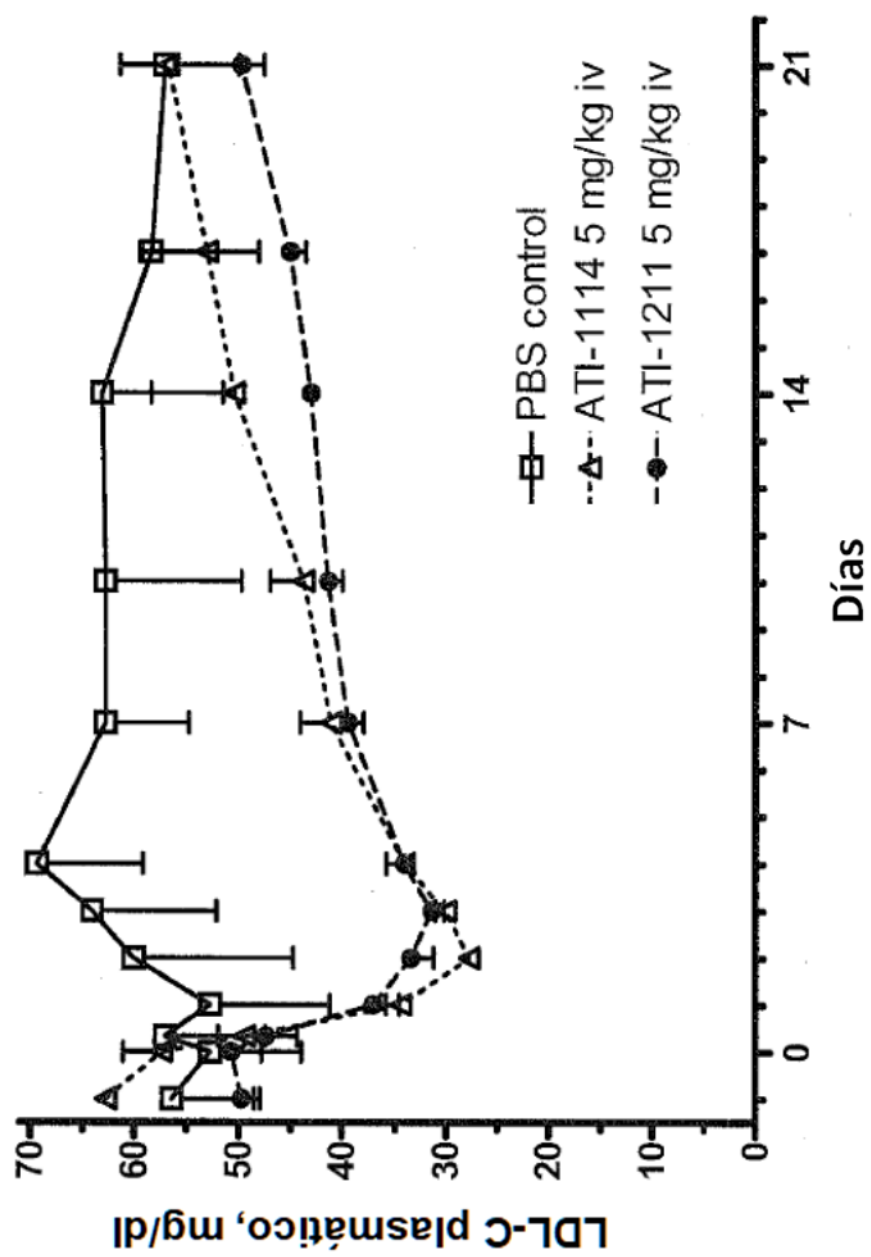


FIG. 13

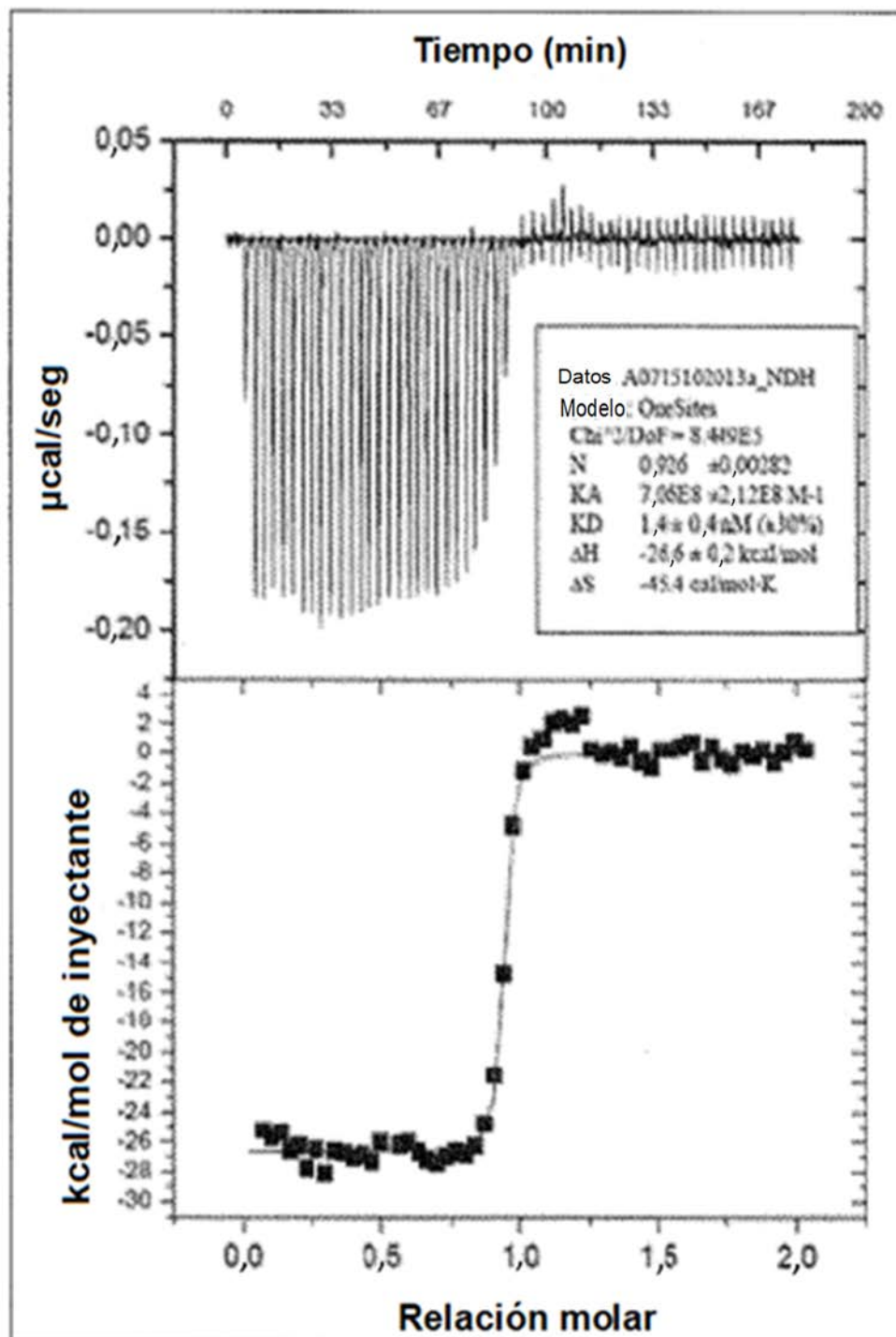
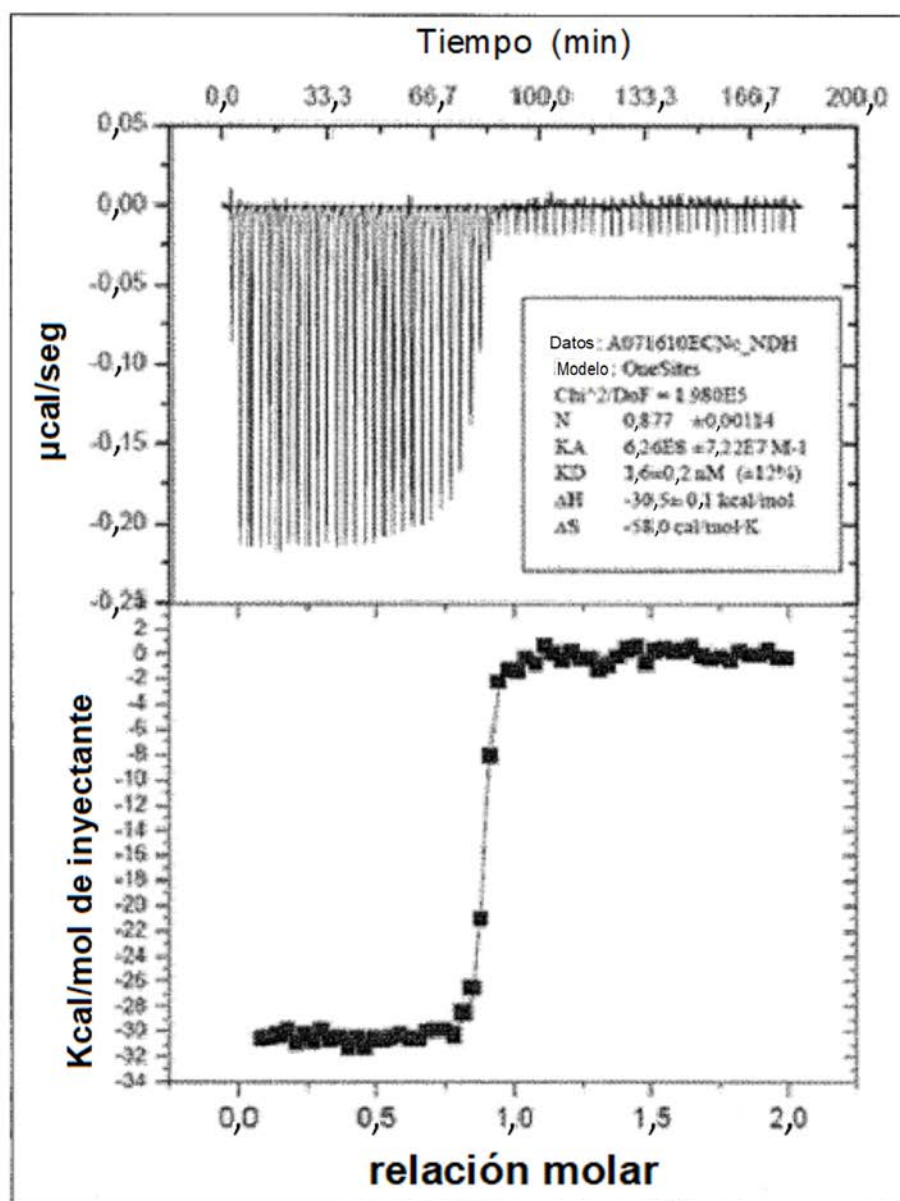


FIG. 13 (continuación)



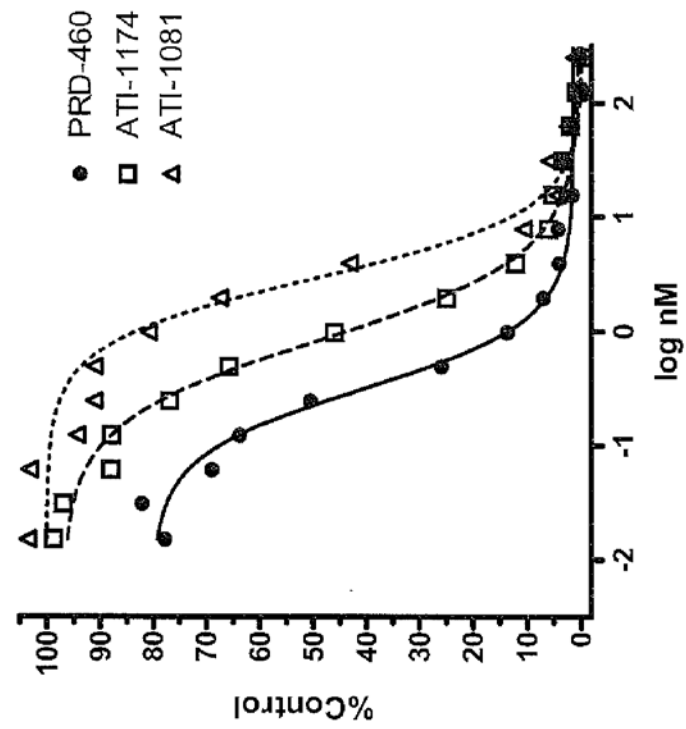


FIG. 14

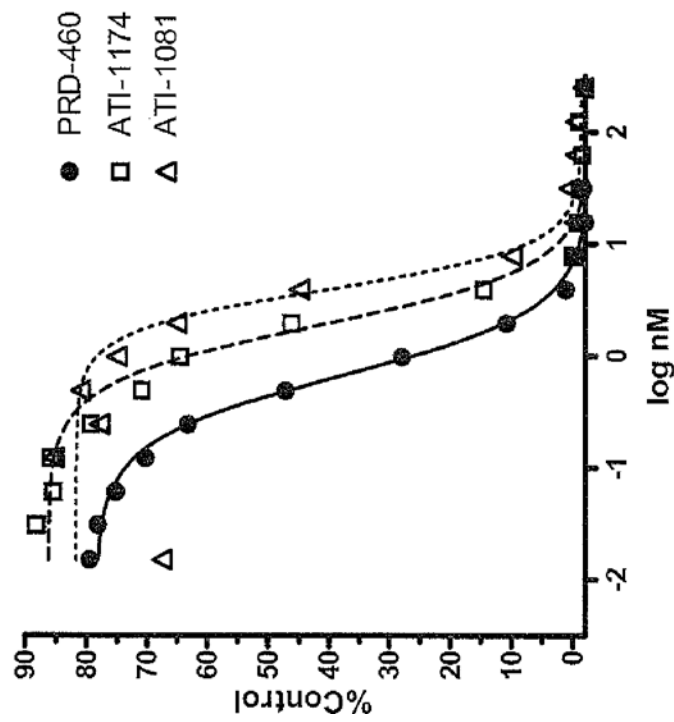


FIG. 15

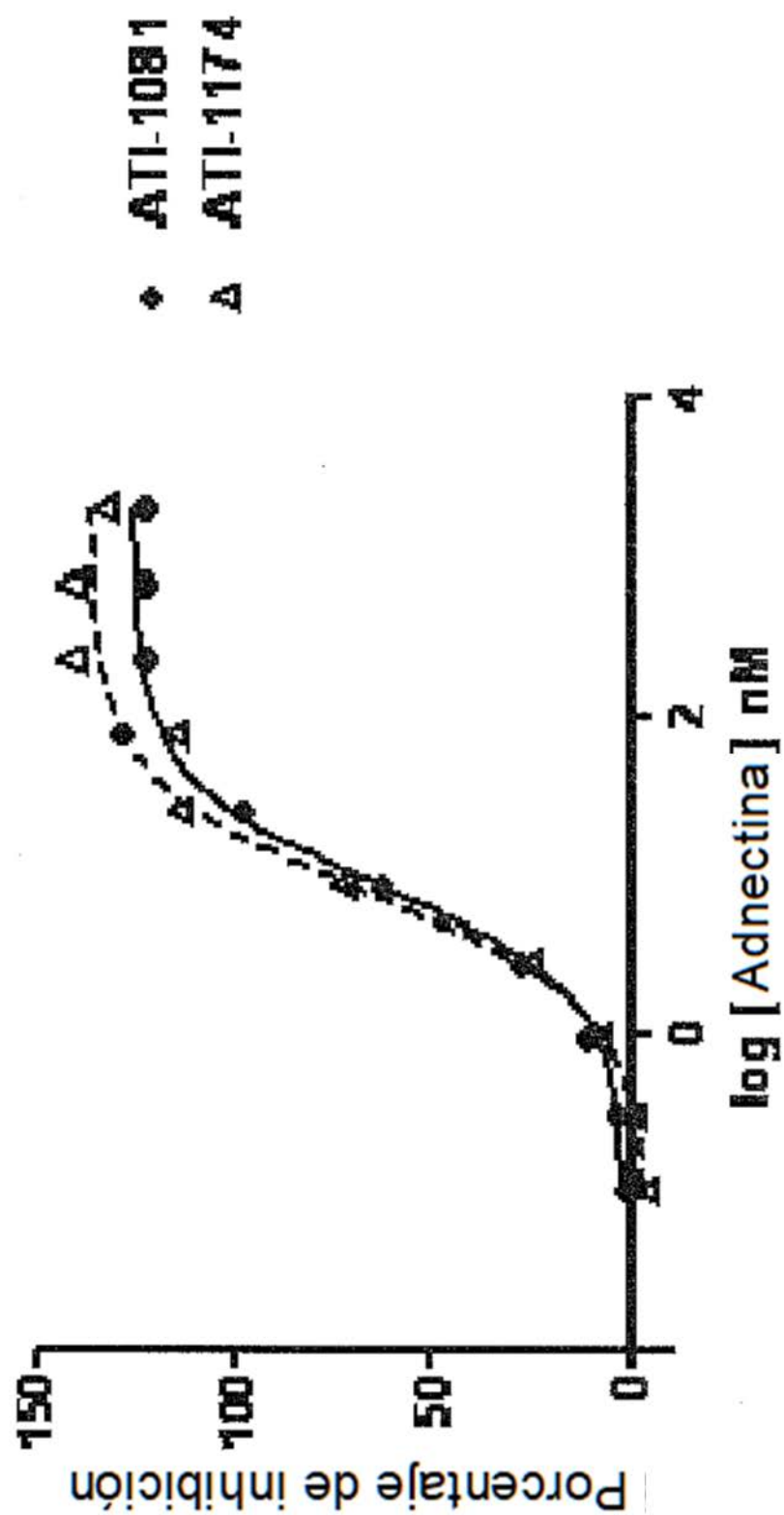


FIG. 15 (continuación)

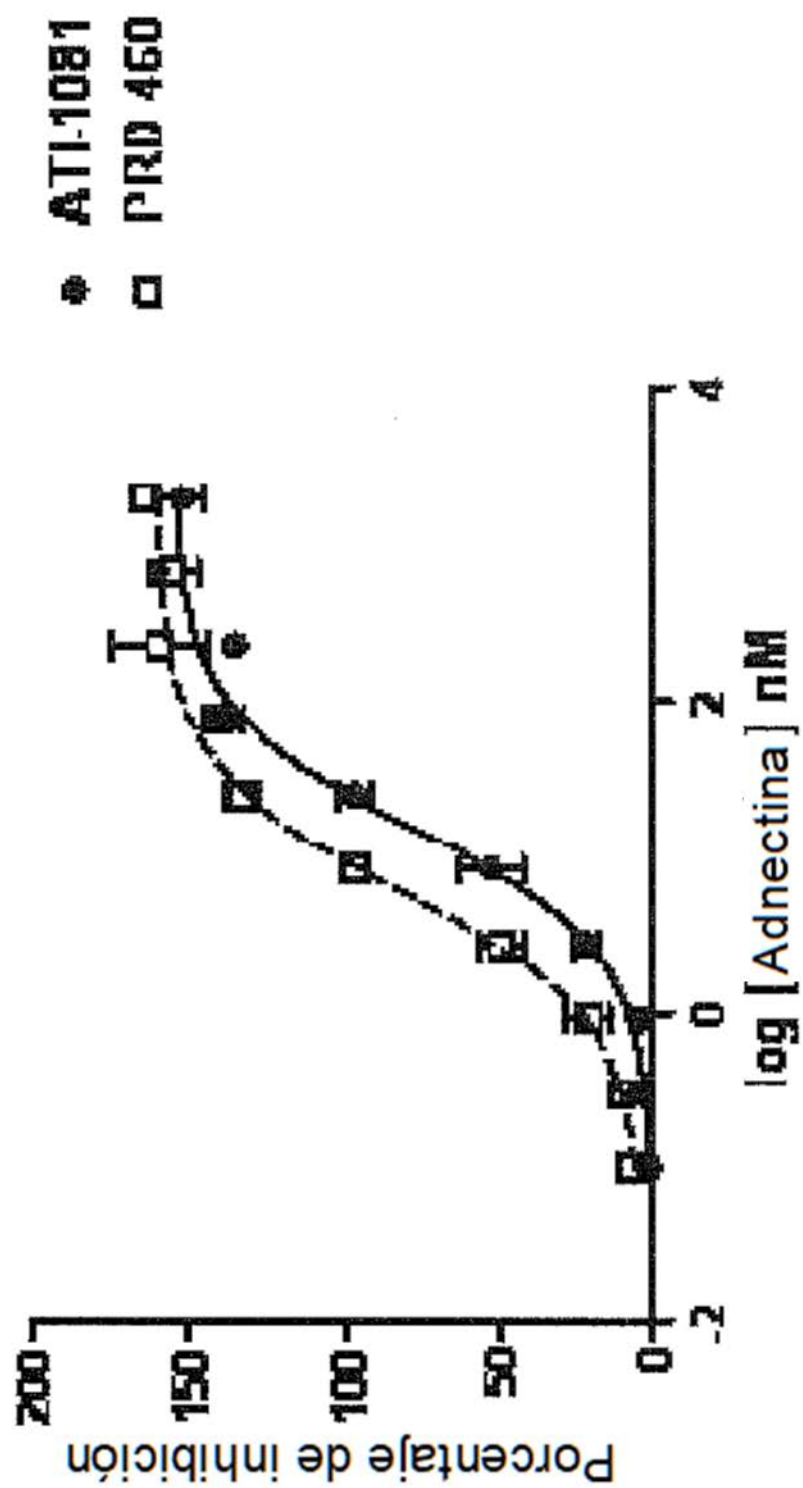


FIG. 16

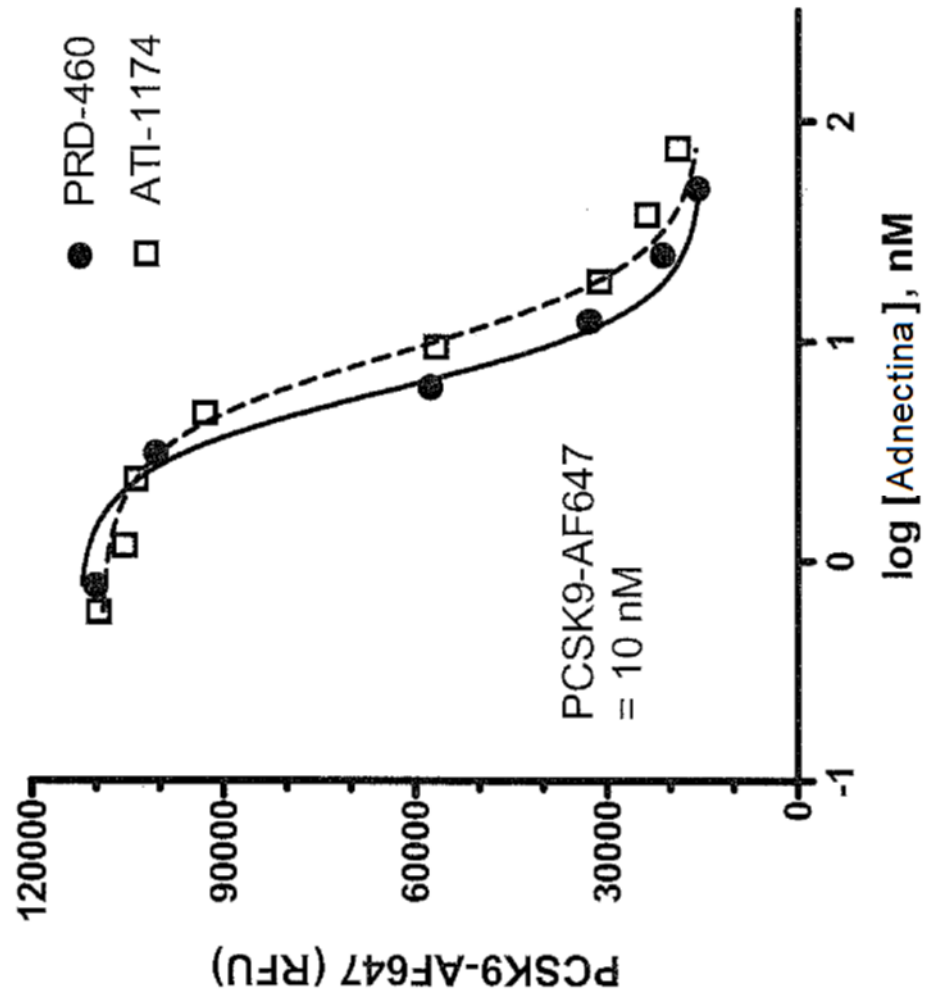


FIG. 17

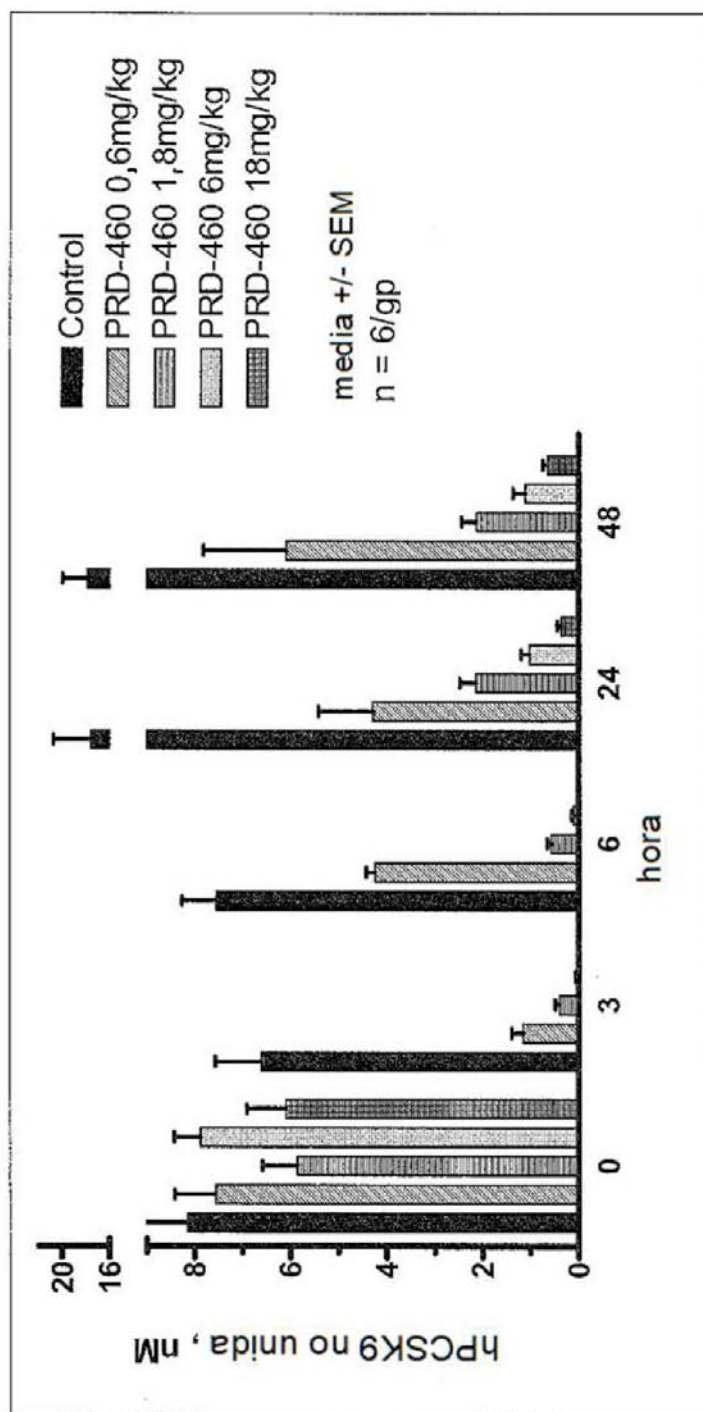


FIG. 18

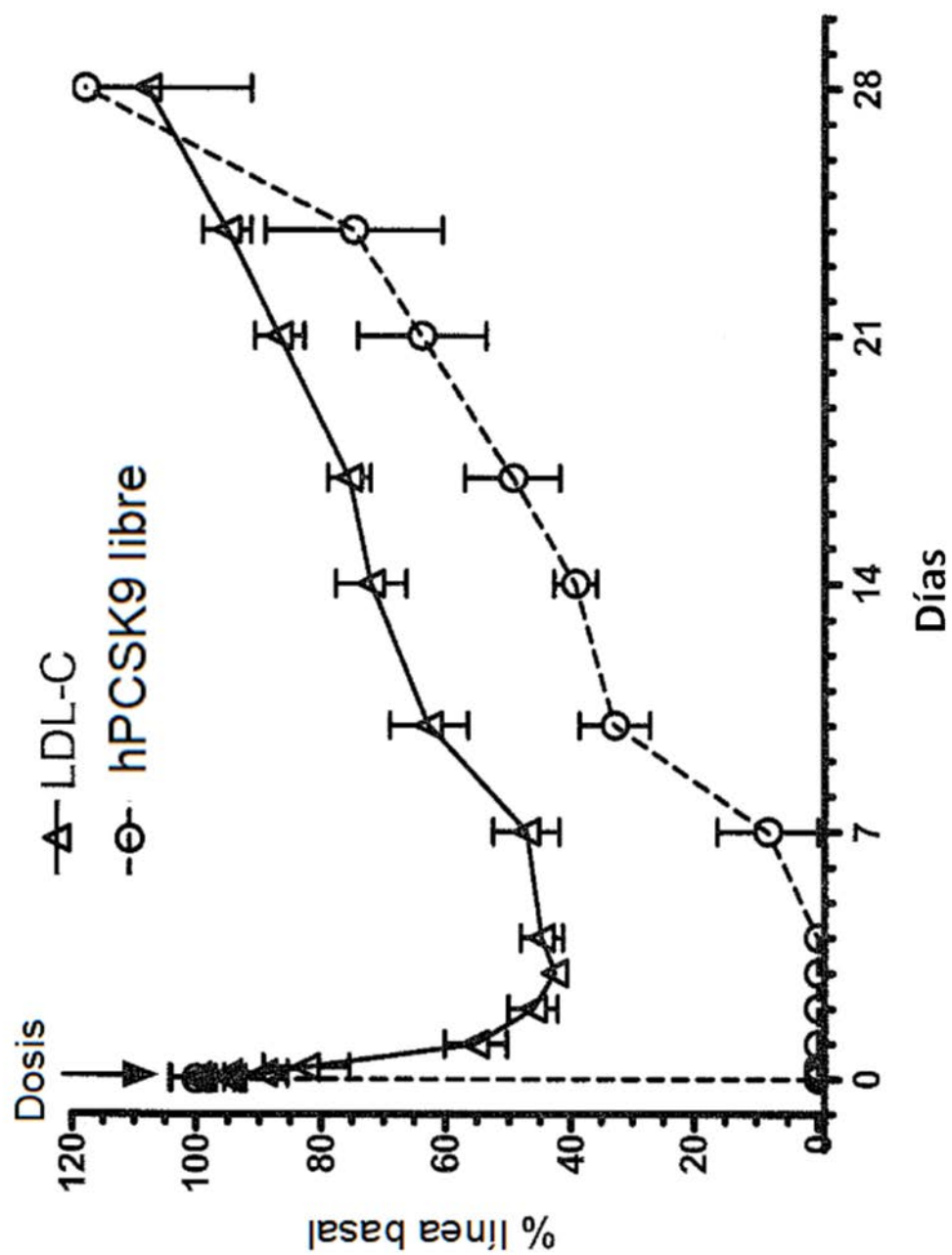


FIG. 19

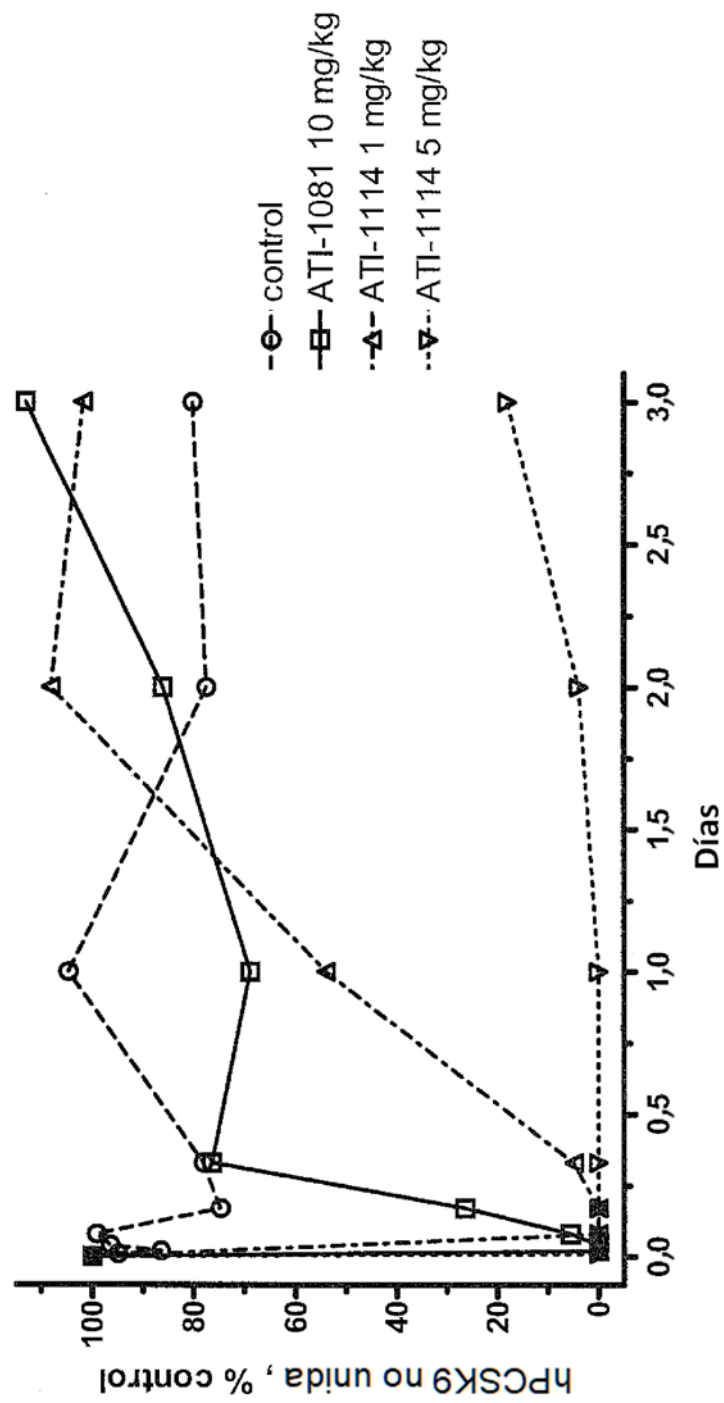
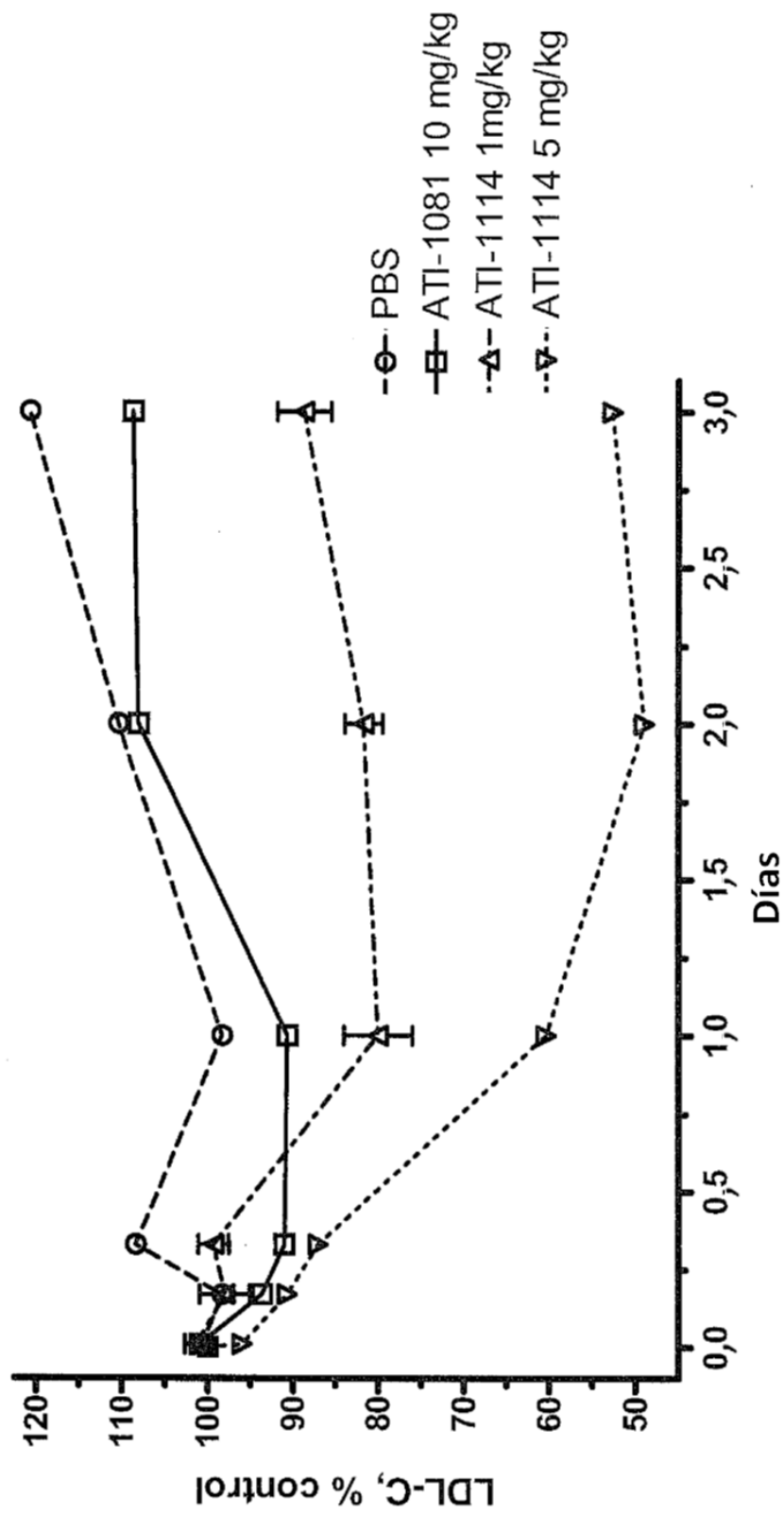


FIG. 20



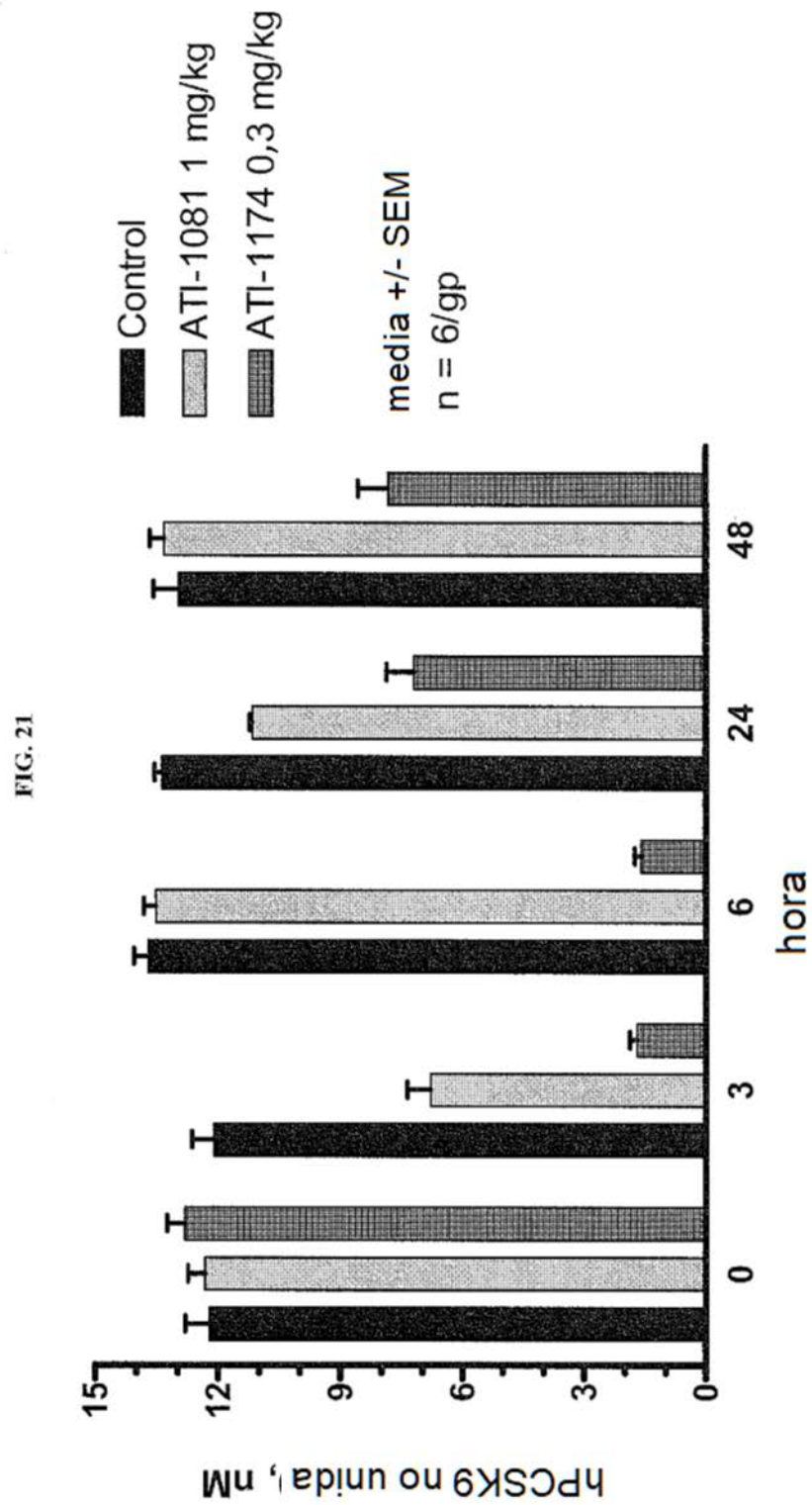


FIG. 22

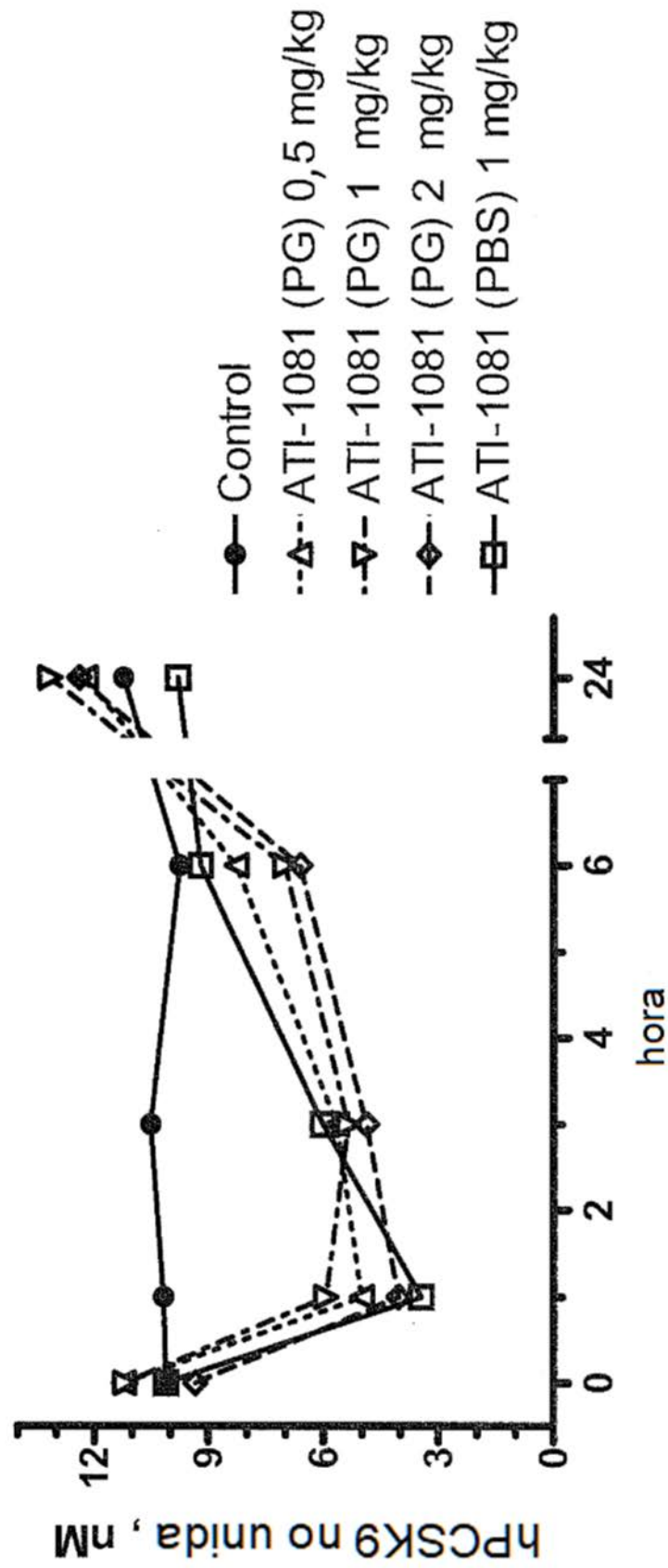


FIG. 23

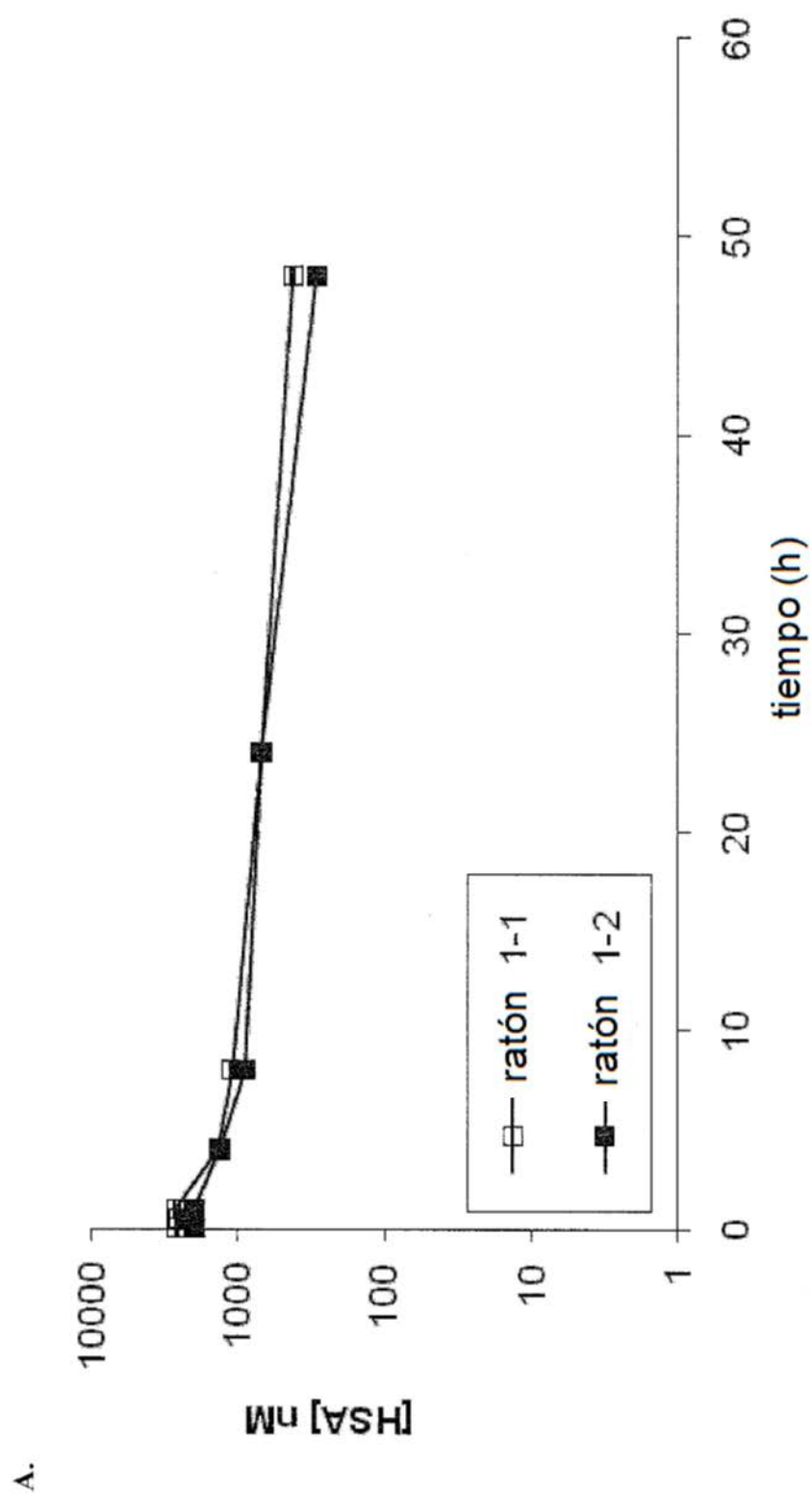


FIG. 23 (continuación)

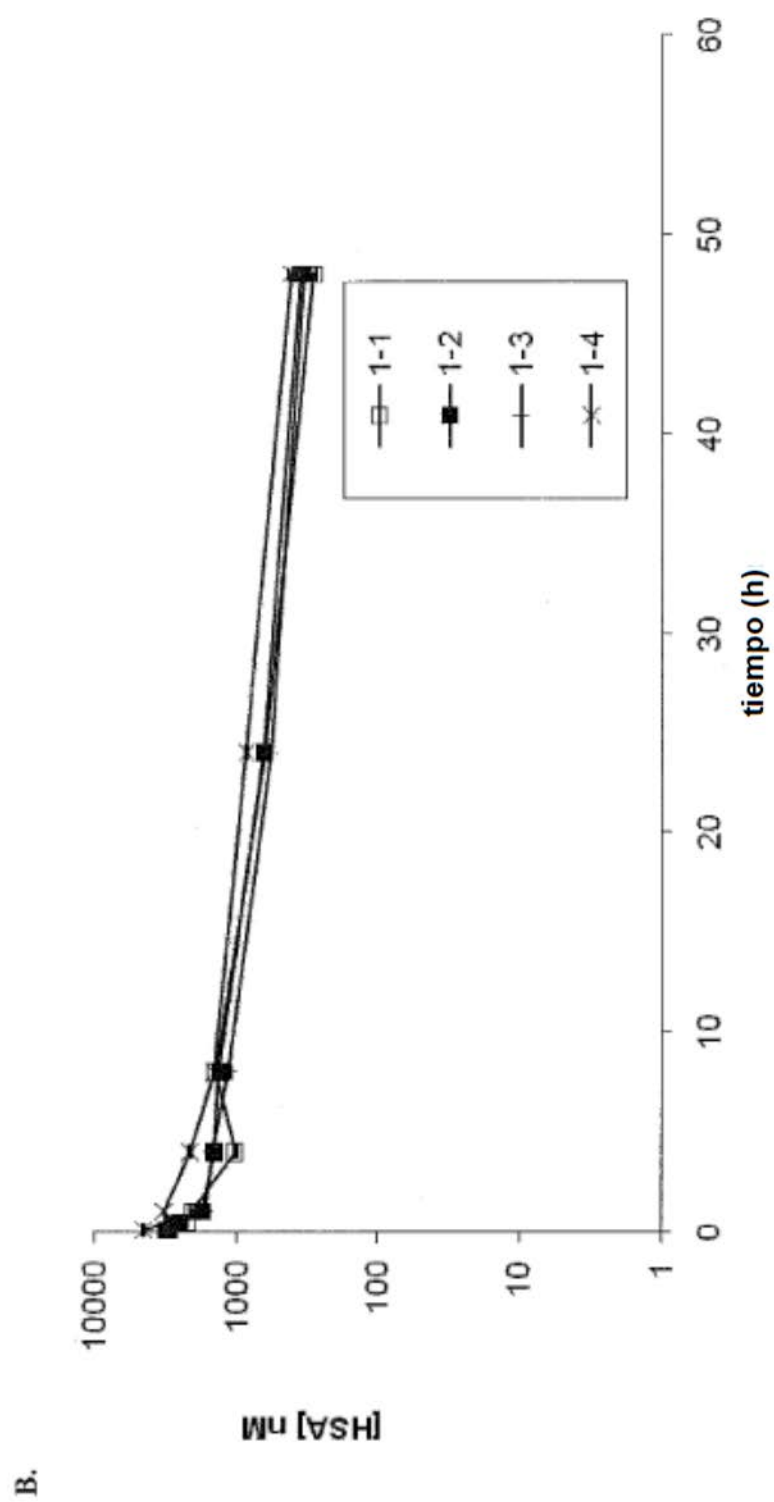


FIG. 24

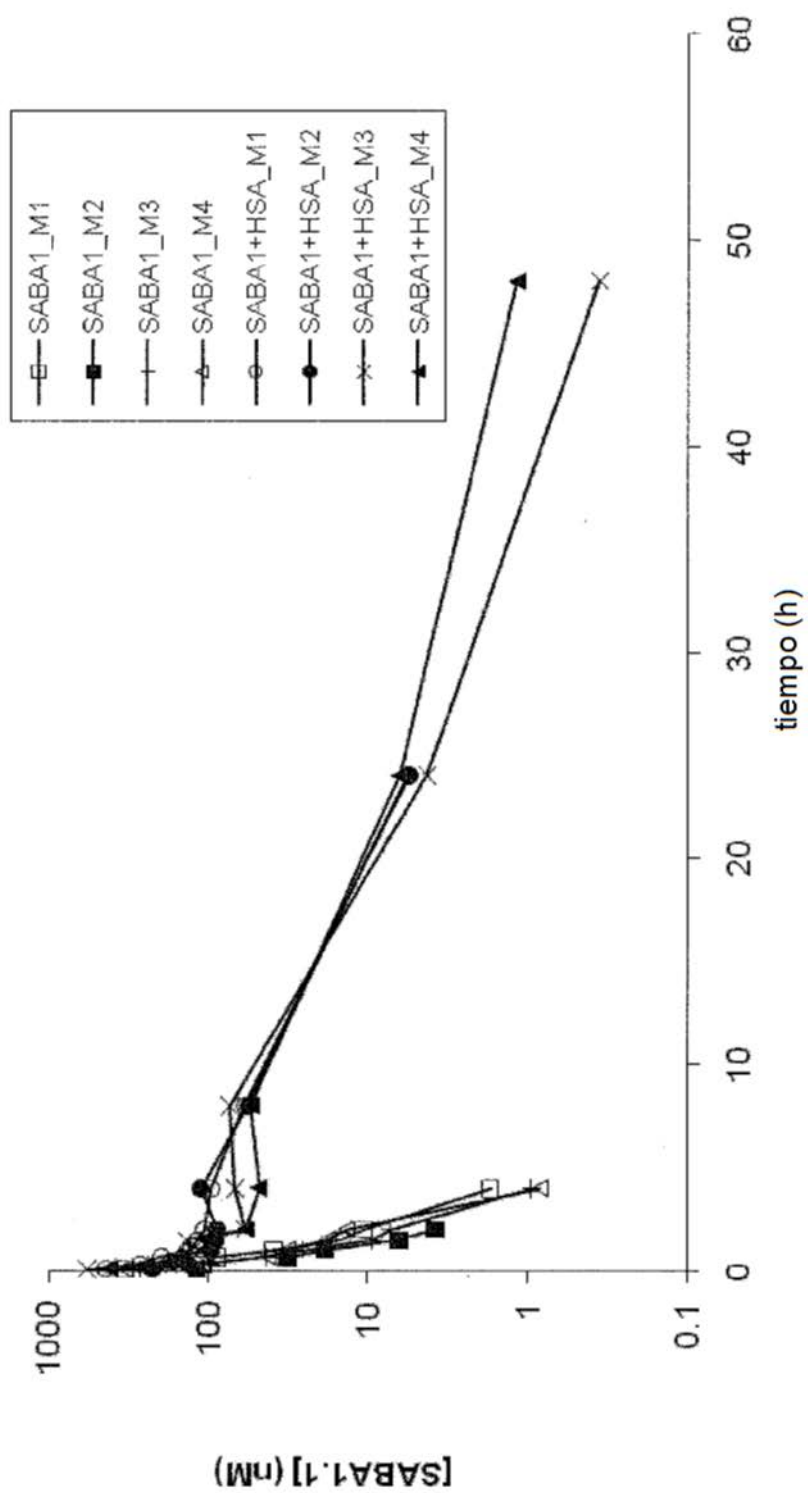


FIG. 24 (continuación)

B.

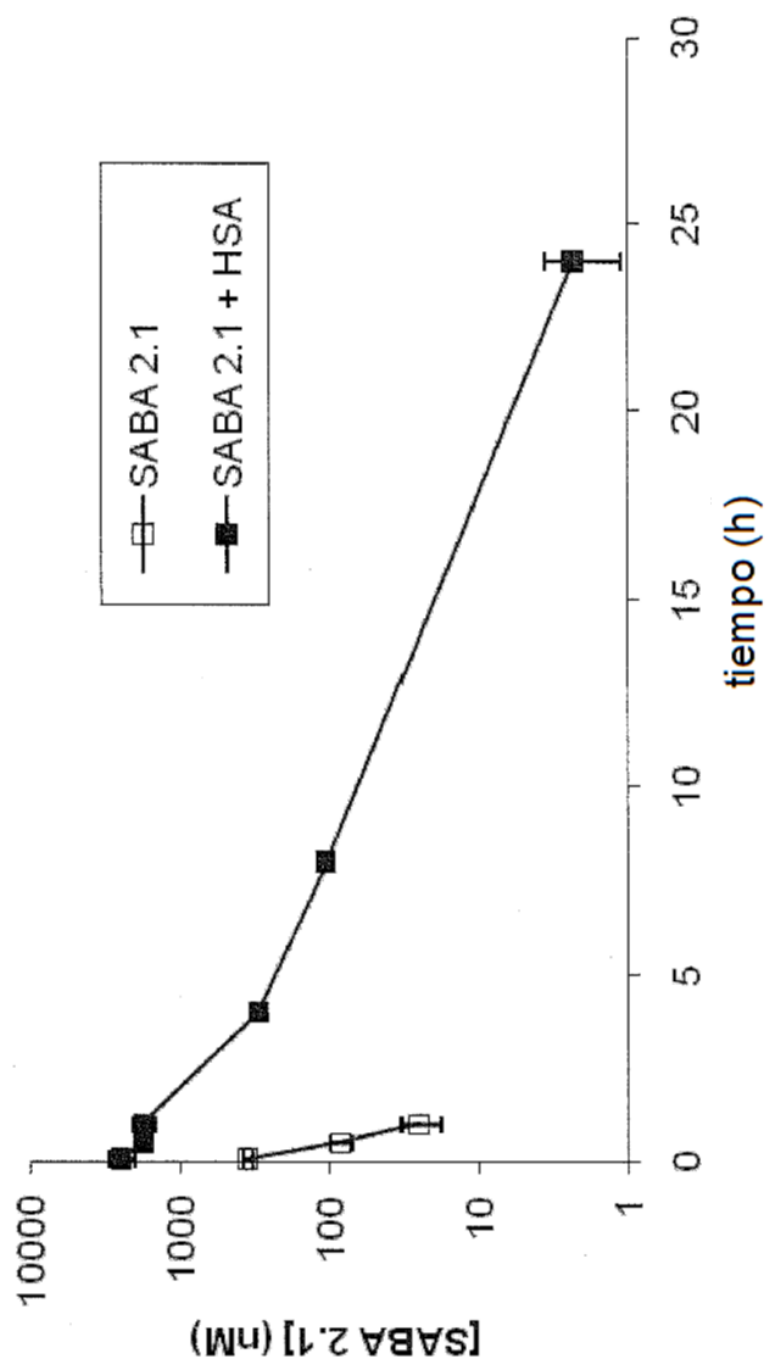
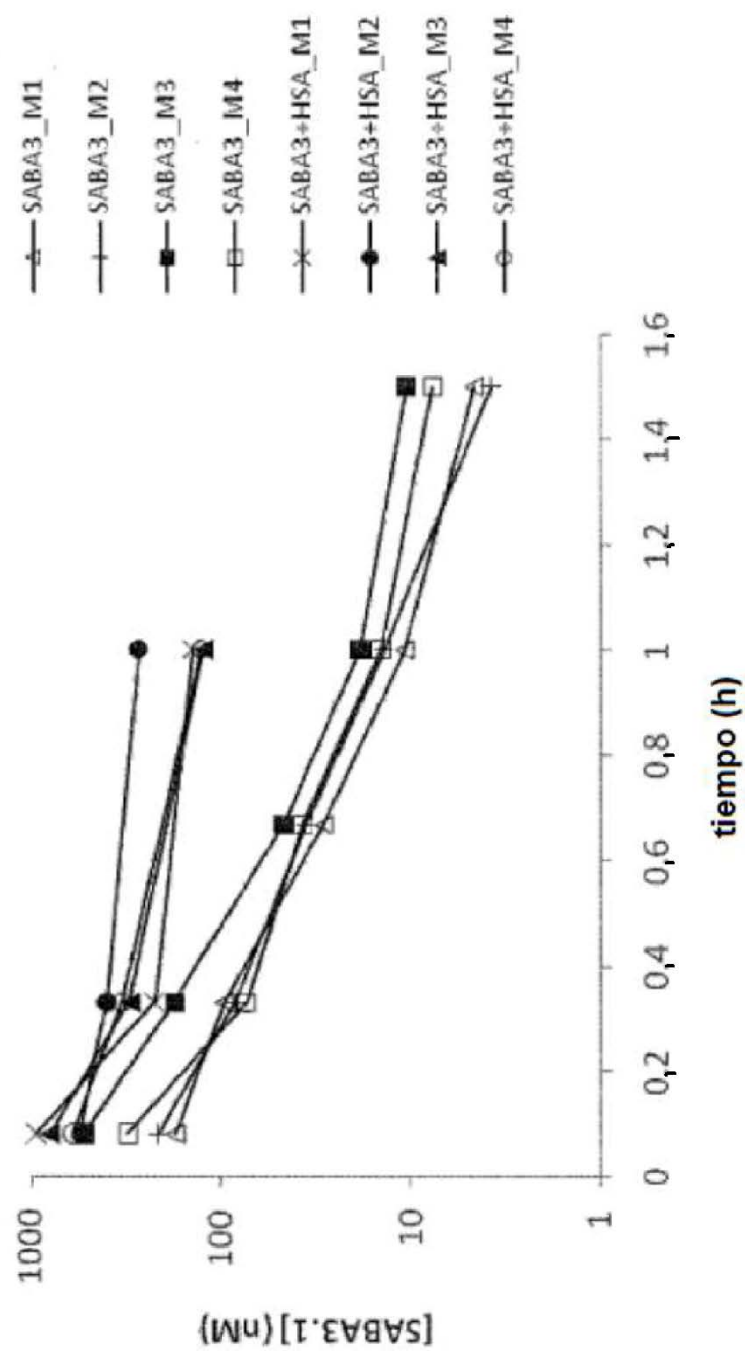
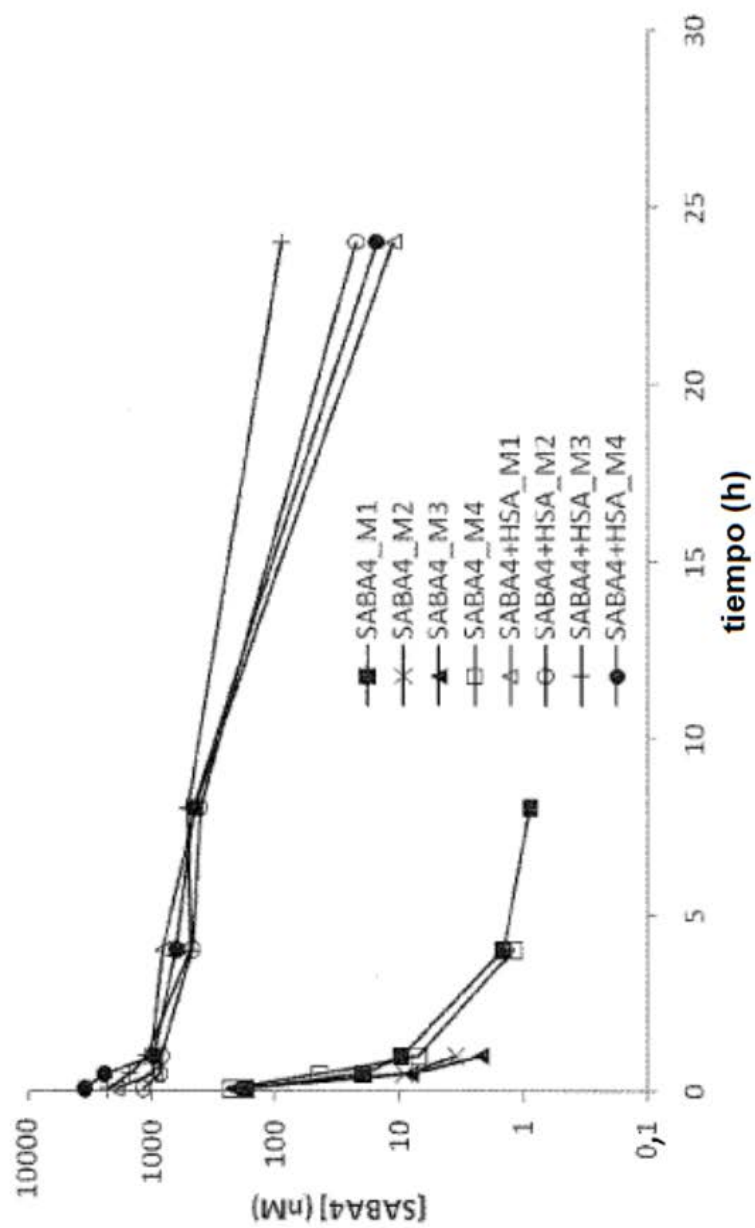


FIG. 24 (continuación)



C.

FIG. 24 (continuación)



D.

FIG. 25

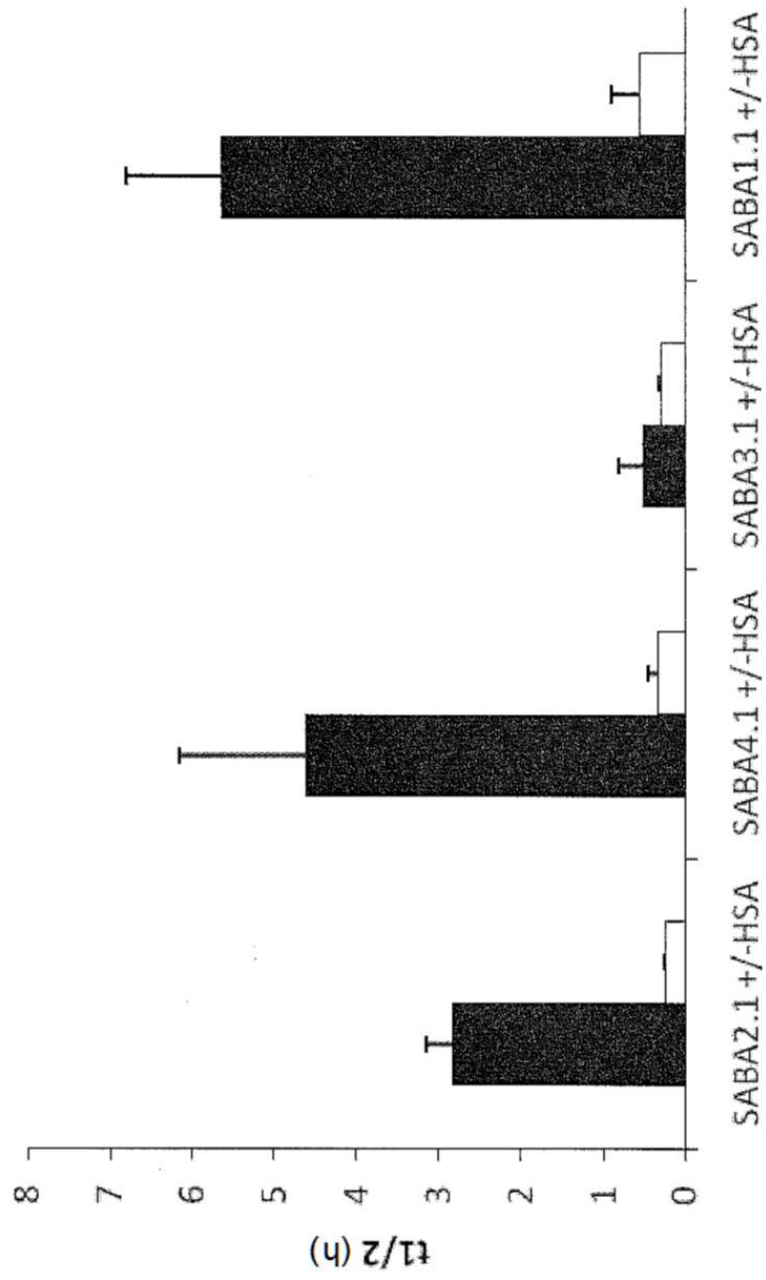


FIG. 26

A.

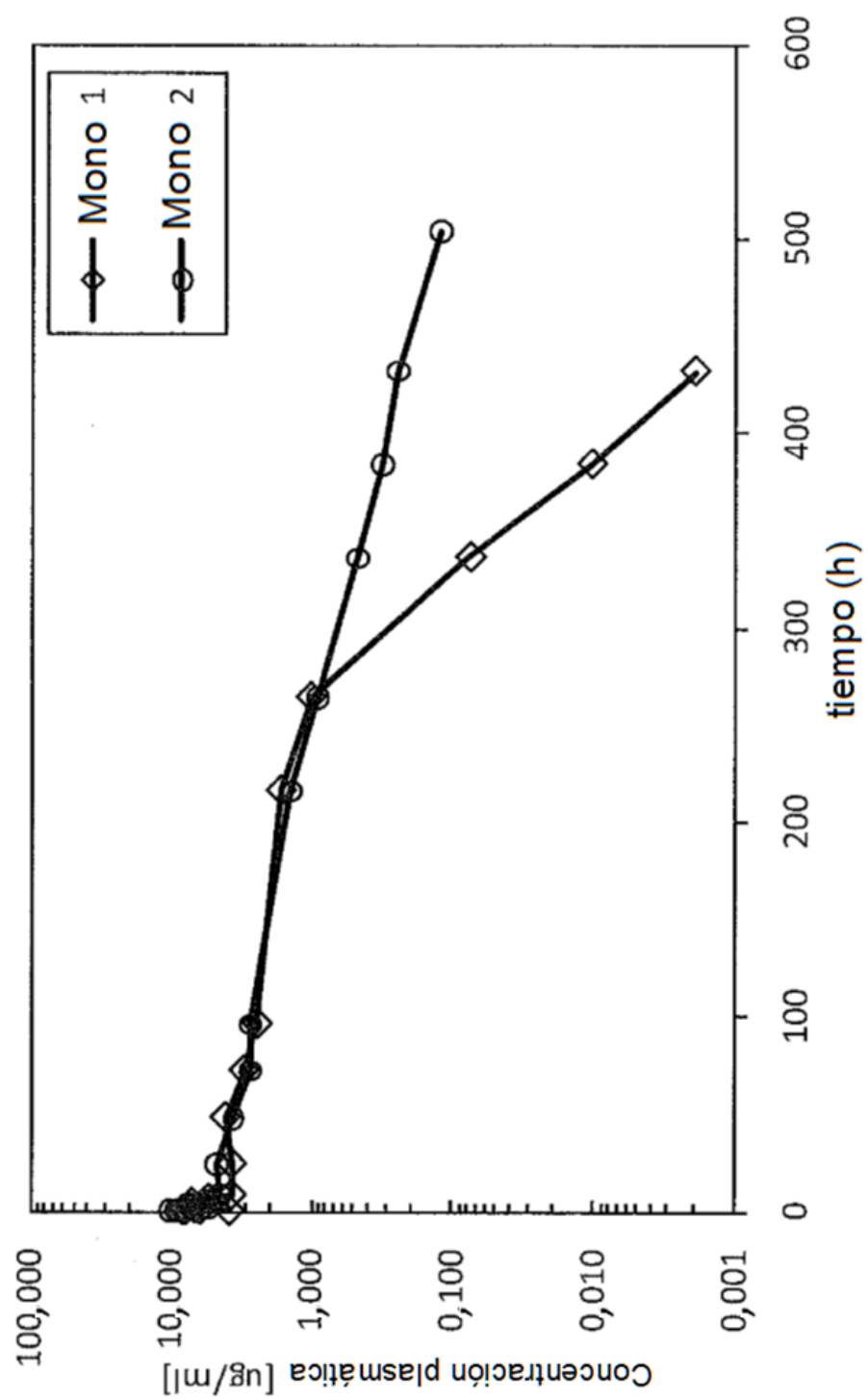


FIG. 26 (continuación)

B.

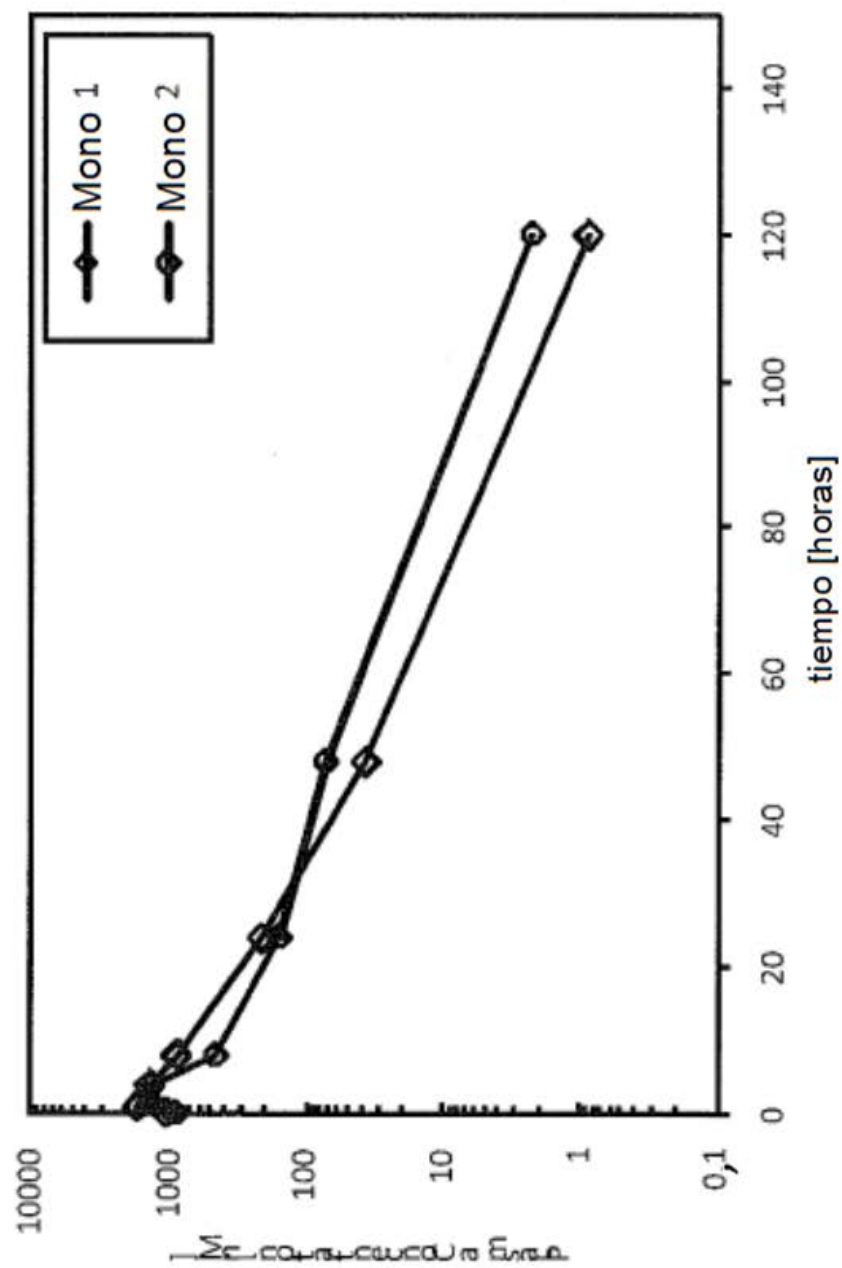


FIG. 27

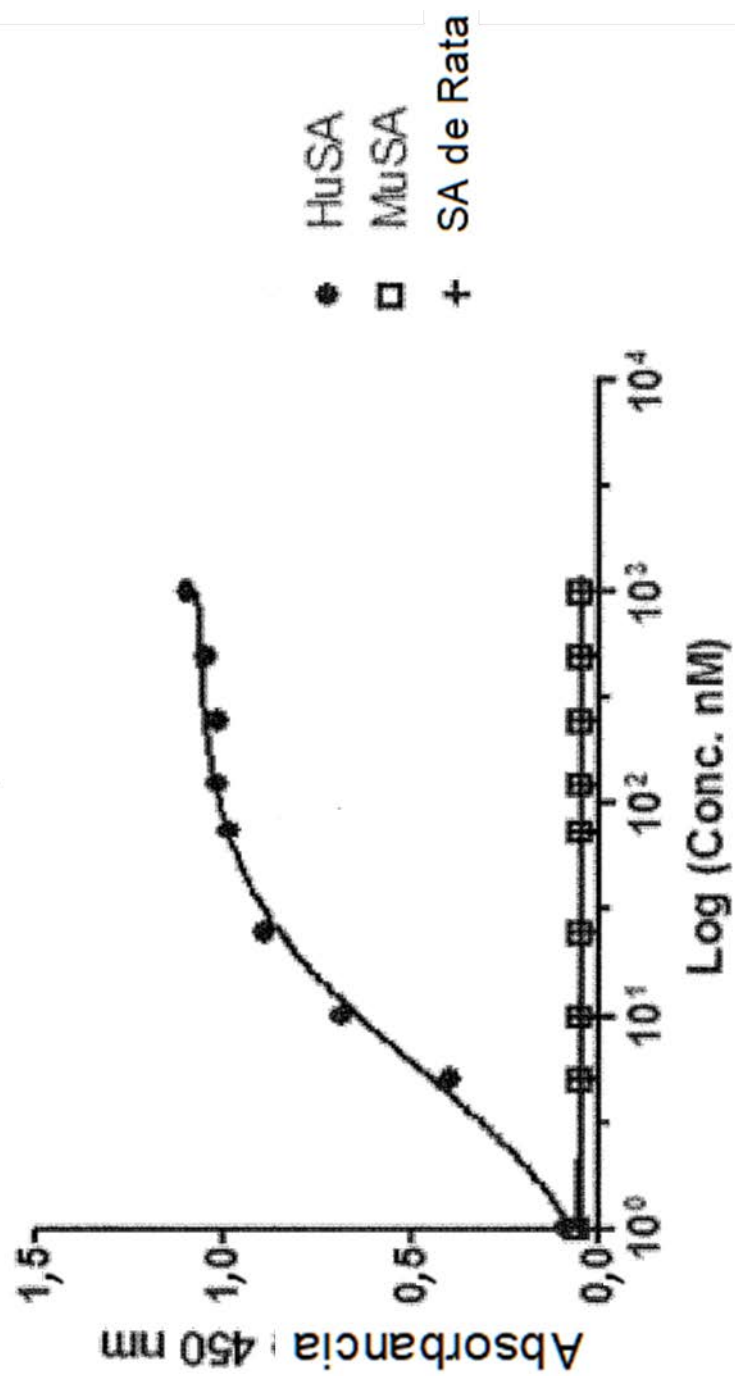


FIG. 28

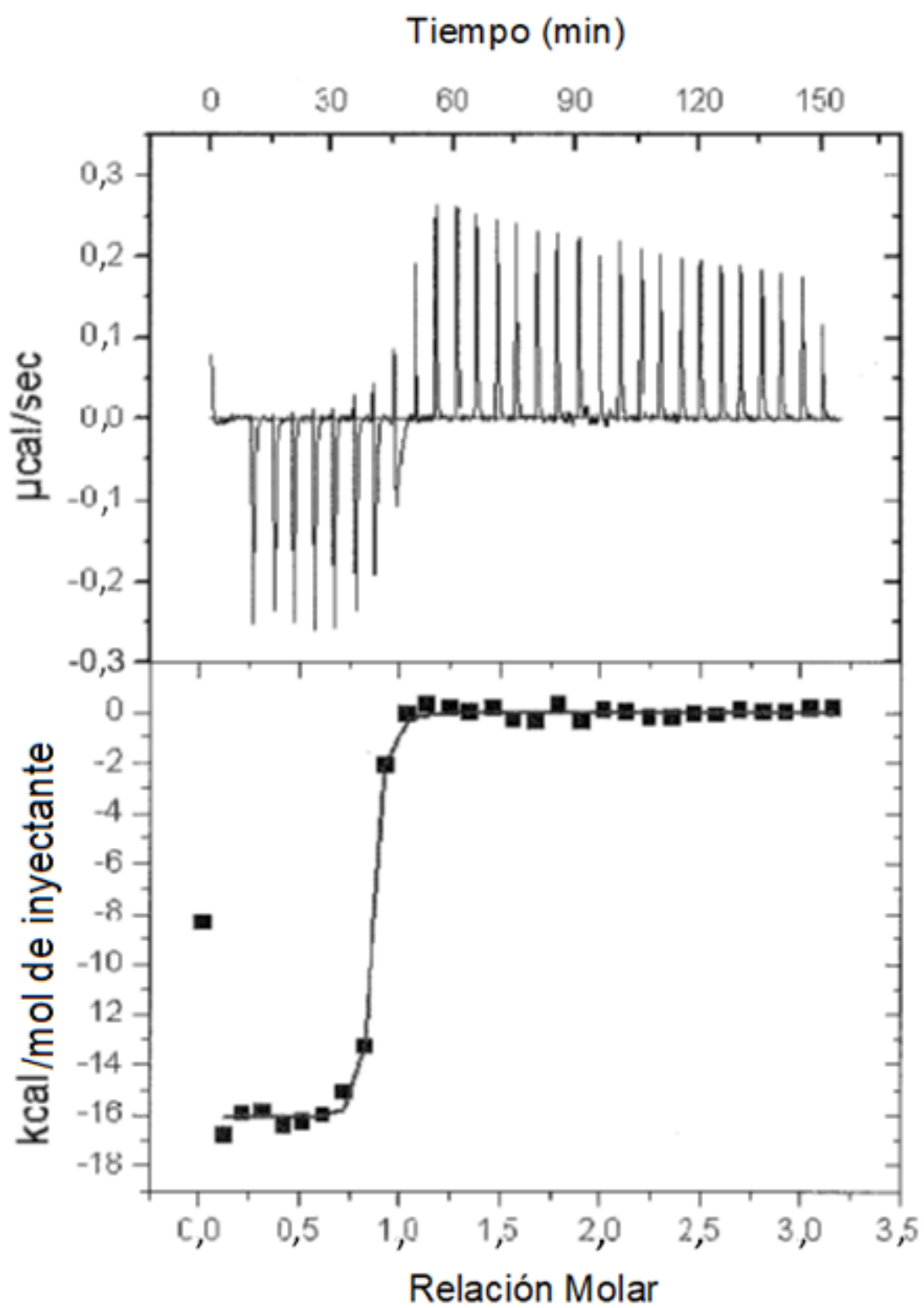


FIG. 29

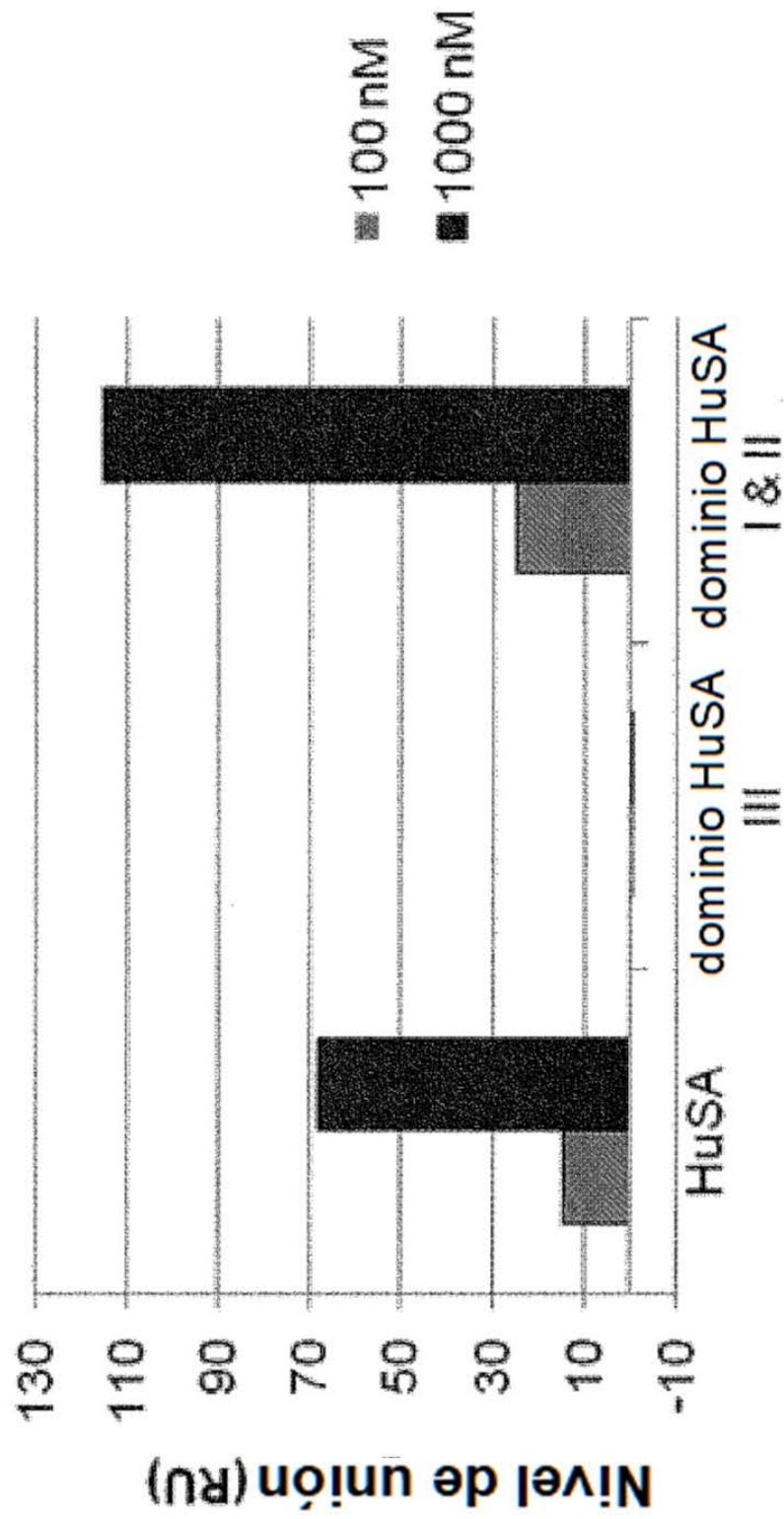


FIG. 30

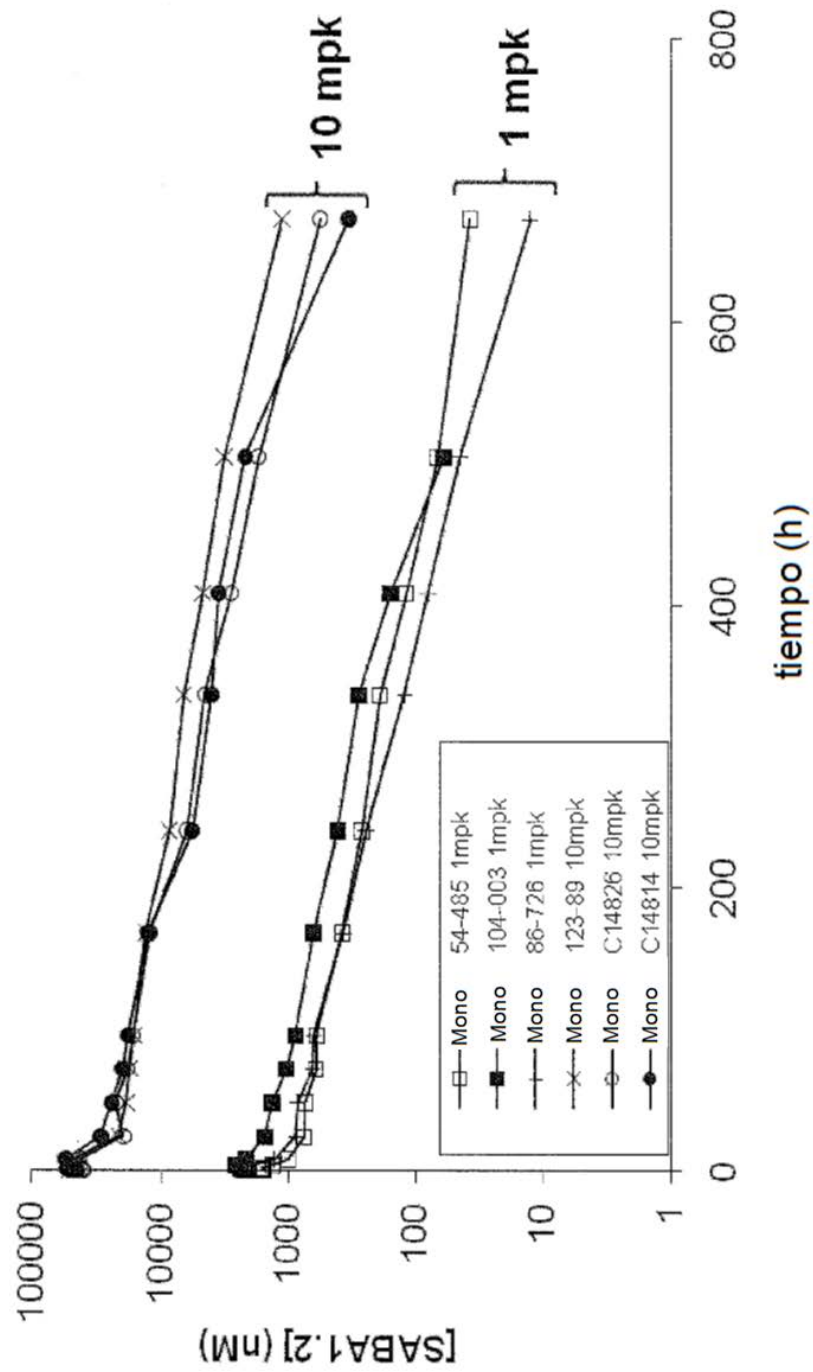


FIG. 31

