

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 207**

51 Int. Cl.:

C07K 14/765 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2016 PCT/US2016/053183**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.03.2017 WO17053617**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2016 E 16781233 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3353199**

54 Título: **Dominios de fibronectina de tipo iii de unión a seroalbúmina con velocidad de disociación rápida**

30 Prioridad:

23.09.2015 US 201562222508 P

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

31.08.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KRYSTEK, STANLEY, RICHARD, JR.;
MITCHELL, TRACY, S.;
GOSELIN, MICHAEL, L.;
LIPOVSEK, DASA y
JUNEJA, JUHI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 781 207 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dominios de fibronectina de tipo iii de unión a seroalbúmina con velocidad de disociación rápida

5 **Antecedentes**

Las semividas inadecuadas de los productos terapéuticos a menudo requieren su administración a altas frecuencias y/o a dosis más altas, o el uso de formulaciones de liberación sostenida, para mantener niveles en suero necesarios para obtener efectos terapéuticos. Sin embargo, a menudo esto se asocia a efectos secundarios negativos. Una estrategia para superar semividas inadecuadas es fusionar el producto terapéutico con un polipéptido de semivida prolongada. No obstante, aunque prolongar la semivida puede ser beneficioso, un producto terapéutico excesivamente estabilizado también puede provocar efectos secundarios negativos. Por consiguiente, la capacidad de ajustar bien las semividas de los productos puede ser beneficiosa. Esta solicitud proporciona compuestos que ajustan bien las semividas en suero de diversos productos terapéuticos y métodos para generarlos.

15 **Compendio**

La invención se basa, al menos en parte, en el desarrollo de nuevos décimos dominios de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3) de unión a seroalbúmina humana (HSA, siglas del inglés *human serum albumin*) que proporcionan versatilidad en el control de las semividas de compañeros de fusión (por ejemplo, polipéptidos terapéuticos).

En un aspecto, en el presente documento se proporciona un polipéptido que comprende un dominio ¹⁰F_n3 (décimo dominio de unión a fibronectina de tipo III), en donde el dominio F_n3 se une a HSA con una K_D de 1 μM o menor y comprende los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG, en donde el bucle CD tiene 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en relación con el bucle CD correspondiente de un dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23, en donde las 1 o 2 sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en:

- (i) la arginina (R) en la posición 2 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, E, A, Q o N;
- (ii) la glutamina (Q) en la posición 5 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por D;
- (iii) la tirosina (Y) en la posición 7 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de S o A;
- (iv) la leucina (L) en la posición 10 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de S, T o A;
- (v) la leucina (L) en la posición 13 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, S o A;
- (vi) la tirosina (Y) en la posición 14 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de A o T;
- (vii) la isoleucina (I) en la posición 15 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, S o A; y
- (viii) La tirosina (Y) en la posición 16 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de Q, E, S o A.

En determinadas realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 tiene 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en relación con el bucle CD correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23, como se describió anteriormente, y el dominio ¹⁰F_n3 tiene 1 sustitución de aminoácidos en relación con el bucle FG correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23. En determinadas realizaciones, la lisina (K) en la posición 12 del bucle FG (SEQ ID NO: 29) se sustituye por un aminoácido seleccionado de A, T o S.

En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a las regiones de bucle que no son de CD de una cualquiera de las SEQ ID NO: 23-27, 30-34, 36-40, 42-46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 65-68, 70, 71, 73-76, 78, 79, 81-84, 86, 87, 89-98, 100-109 y 111-118, opcionalmente con la condición de que la secuencia no sea la de ADX_2629_E06. En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 30-34, 36-40, 42-46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 65-68, 70, 71, 73-76, 78, 79, 81-84, 86, 87, 89-98, 100-109 y 111-118, opcionalmente con la condición de que la secuencia no sea la de ADX_2629_E06.

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

En determinadas realizaciones, el polipéptido se une a HSA con una velocidad de disociación (K_D) que es mayor que la K_D del dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23.

En determinadas realizaciones, la relación entre la velocidad de disociación del polipéptido y la velocidad de disociación del dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23 es de al

menos aproximadamente 3. En determinadas realizaciones, la relación es de al menos aproximadamente 25. En determinadas realizaciones, la relación es de al menos aproximadamente 25. En determinadas realizaciones, la relación es de al menos aproximadamente 50. En determinadas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento comprenden además una proteína heteróloga, tal como un resto terapéutico (por ejemplo, un dominio ¹⁰F_n3).

En determinados aspectos, en el presente documento se proporciona una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende un polipéptido que comprende cualquiera de los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA o que comprende dichos polipéptidos de fusión, como se describe en el presente documento, y un vehículo (por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable).

En determinados aspectos, en el presente documento se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica uno cualquiera de los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA (por ejemplo, un ácido nucleico aislado que codifica una cualquiera de las SEQ ID NO: 30-34, 36-40, 42-46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 65-68, 70, 71, 73-76, 78, 79, 81-84, 86, 87, 89-98, 100-109 y 111-118) o que comprende dichos polipéptidos de fusión, como se describe en el presente documento, vectores de expresión que comprenden los mismos, y células que comprenden las moléculas de ácido nucleico.

En determinados aspectos, en el presente documento se proporciona un método de producción de los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA o que comprende dichos polipéptidos de fusión, como se describe en el presente documento, que comprende cultivar la célula que comprende las moléculas de ácido nucleico que la codifican, en condiciones adecuadas para expresar los dominios ¹⁰F_n3 o polipéptidos de fusión, y purificar los mismos.

En determinados aspectos, en el presente documento se proporciona un método para mejorar la semivida de un residuo, que comprende unir al residuo un dominio ¹⁰F_n3 de unión de a HSA descrito en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

Las **figuras 1 y 2** son sensogramas de RPS (resonancia de plasmón superficial) de adnectinas que se unen a HSA, normalizados al inicio de la fase de disociación para ilustrar diferencias en las constantes de disociación de la unión.

La **figura 3** muestra sensogramas de RPS de adnectinas adicionales que se unen a HSA y a seroalbúmina de ratón (MSA, siglas del inglés *mouse serum albumin*), normalizados al inicio de la fase de disociación para ilustrar diferencias en las constantes de disociación de la unión.

Las **figuras 4A-4D** son datos de cinética de RPS de la adnectina precursora (ADX_7016_A01; PKE2) y de las adnectinas 7016_C03, 7016_E02 y 7016_G01 para determinar afinidades con HSA, MSA, seroalbúmina de rata (SA de rata) y seroalbúmina de cinomolgo (SA de cino).

La **figura 5** es un gráfico que representa las semividas plasmáticas en ratas de la adnectina precursora (ADX_7016_A01; PKE2) y de las adnectinas 7016_C03, 7016_E02 y 7016_G01.

La **figura 6** es un gráfico que representa las semividas plasmáticas en ratones de la adnectina precursora (ADX_7016_A01; PKE2) y de las adnectinas 7016_C03, 7016_E02 y 7016_G01.

Descripción detallada

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende un experto familiarizado con la técnica. Aunque en la práctica o análisis de la presente invención se puede usar cualquier método y composición similar o equivalente a los descritos en el presente documento, en dicho se describen los métodos y las composiciones preferidos(as).

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

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

5 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 podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) en más de un 95 % en peso de polipéptido
10 según se determina mediante el método de Lowry y, lo más preferentemente, en más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos restos de una secuencia de aminoácidos de extremo N (N-terminal) o interna usando un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. Un polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* con células recombinantes, ya que no estará presente al menos un componente del
15 ambiente natural del polipéptido. Sin embargo, habitualmente, el polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Como se usa en el presente documento, un "dominio ¹⁰F_n3" o "residuo ¹⁰F_n3" o "molécula ¹⁰F_n3" se refiere a ¹⁰F_n3 natural (*wild-type*) y a sus variantes biológicamente activas, por ejemplo, variantes biológicamente activas que se unen específicamente a una diana, tal como una proteína diana. Un dominio ¹⁰F_n3 humano natural puede comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1. Las variantes biológicamente activas de un dominio ¹⁰F_n3 humano natural incluyen dominios ¹⁰F_n3 que comprenden al menos, como máximo o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40 o 45 cambios de aminoácidos, es decir, sustituciones, adiciones o deleciones, en relación con un dominio ¹⁰F_n3 que comprende la SEQ ID NO: 1.
25

Una "región" de un dominio ¹⁰F_n3, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de un bucle (AB, BC, CD, DE, EF y FG), una cadena β (A, B, C, D, E, F y G), el extremo N (que corresponde a los restos de aminoácidos 1-8 de la SEQ ID NO: 1) o el extremo C (que corresponde a los restos de aminoácidos 93-94 de la SEQ ID NO: 1) del dominio ¹⁰F_n3 humano.
30

Un "bucle de polo norte" se refiere a uno cualquiera de los bucles BC, DE y FG de un décimo dominio de fibronectina de tipo 3 (¹⁰F_n3) humano.

35 Un "bucle de polo sur" se refiere a uno cualquiera de los bucles AB, CD y EF de un décimo dominio de fibronectina de tipo 3 (¹⁰F_n3) humano.

Como se usa en el presente documento, "adnectina" se refiere a un dominio ¹⁰F_n3 que se modifica para unirse específicamente a una diana de interés.

40 Una "región armazón" se refiere a cualquier región no bucle de un dominio ¹⁰F_n3 humano. La región armazón incluye las cadenas β, A, B, C, D, E, F y G, así como la región de extremo N (aminoácidos correspondientes a los restos 1-8 de la SEQ ID NO: 1) y la región de extremo C (aminoácidos correspondientes a los restos 93-94 de la SEQ ID NO: 1) y que comprende opcionalmente los 7 aminoácidos que constituyen el enlazador natural entre la 10^a y 11^a repetición del dominio F_n3 en la fibronectina humana).
45

En el presente documento el "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en una secuencia seleccionada, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuese necesario, para obtener el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos, la alineación puede realizarse de diversas maneras que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles al público, tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para obtener la alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se van a comparar. Sin embargo, para los fines del presente documento, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se obtienen como se describe a continuación usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, programado por Genentech, Inc., se ha archivado con la documentación del usuario en la Oficina de derechos de autor de los Estados Unidos, Washington D.C., 20559, donde está registrado con el N.º de registro de derechos de autor de los Estados Unidos TXU510087, y está disponible al público en Genentech, Inc., Sur de San Francisco, Calif. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente digital UNIX V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencia se exponen en el programa ALIGN-2 y no varían.
50
55
60

65 Para los fines del presente documento, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada en, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que puede, como alternativa, citarse

como una secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos en, con o frente a una secuencia de aminoácidos B) se calcula de la siguiente manera: 100 veces la fracción X/Y , en donde X es el número de restos de aminoácidos puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencia ALIGN-2 en la alineación del programa de A y B, y en donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A.

Las expresiones "se une específicamente", "unión específica", "unión selectiva", y "se une selectivamente", como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a una adnectina que exhibe afinidad por HSA, pero que no se une significativamente (por ejemplo, unión menor de aproximadamente 10 %) a un polipéptido diferente medido por una técnica disponible en la materia, tal como, aunque sin limitación, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva (por ejemplo, ELISA de competencia, ensayo BIACORE). Las expresiones son también aplicables cuando, por ejemplo, un dominio de unión de una adnectina de la invención es específico para HSA.

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

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

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

Los términos " k_{ass} ", " k_{on} " y " k_a " se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a la constante de velocidad de asociación para la asociación de una adnectina en el complejo adnectina/proteína.

Los términos " k_{diss} ", " k_{off} " y " k_d " se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a la constante de velocidad de disociación para la disociación de una adnectina del complejo adnectina/proteína.

La expresión " CI_{50} ", como se usa en el presente documento, se refiere a la concentración de una adnectina que inhibe una respuesta, en un ensayo *in vitro* o en un ensayo *in vivo*, a un nivel que es el 50 % de la respuesta inhibitoria máxima, es decir, a la mitad entre la respuesta inhibitoria máxima y la respuesta no tratada.

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

Como se usa en el presente documento, la "prevención" de una enfermedad o trastorno se refiere a la reducción de la probabilidad de que aparezca una patología en una muestra estadística en relación con una muestra de control no tratada, o retrasar el inicio o reducir la gravedad de uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno en relación con la muestra de control no tratada. Los pacientes pueden seleccionarse para terapia preventiva basándose en factores que se sabe que aumentan el riesgo de padecer una patología clínica en comparación con la población general.

El término "tratar" como se usa en el presente documento incluye (a) inhibir la patología, es decir, detener su desarrollo; y/o (b) aliviar la patología, es decir, causando el retroceso de la patología una vez que se ha establecido.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa ± 10 % del valor indicado.

Descripción general

5 Los nuevos polipéptidos armazón basados en fibronectina descritos en el presente documento, se unen a HSA y se pueden acoplar a una o más moléculas adicionales, tal como otros dominios ¹⁰F_{n3} que se unen a diferentes dianas, o polipéptidos para los cuales el aumento de la semivida es beneficioso.

A. Dominios ¹⁰F_{n3} de unión a seroalbúmina humana

10 F_{n3} se refiere a un dominio de fibronectina de tipo III. Un dominio F_{n3} es pequeño, monomérico, soluble y estable. Carece de enlaces disulfuro y, por tanto, es estable en condiciones reductoras. La estructura general de F_{n3} se asemeja al pliegue de inmunoglobulina. Los dominios F_{n3} comprenden, en orden desde el extremo N al extremo C, una cadena beta o de tipo beta, A; un bucle, AB; una cadena beta o de tipo beta, B; un bucle, BC; una cadena beta o de tipo beta, C; un bucle, CD; una cadena beta o de tipo beta, D; un bucle, DE; una cadena beta o de tipo beta, E; un bucle, EF; una cadena beta o de tipo beta, F; un bucle, FG; y una cadena beta o de tipo beta, G. Las siete cadenas β antiparalelas se disponen como dos láminas beta que forman un núcleo estable, creando así dos "caras" compuestas de los bucles que conectan las cadenas beta o de tipo beta. Los bucles AB, CD y EF se localizan en una cara ("el polo sur") y los bucles BC, DE y FG se localizan en la cara opuesta ("el polo norte"). Cualquiera o todos los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG pueden participar en la unión del ligando. Hay al menos 15 módulos F_{n3} diferentes en la fibronectina humana, y aunque la homología de secuencia entre los módulos es baja, todos comparten una elevada similitud en la estructura terciaria.

En determinadas realizaciones, el dominio F_{n3}, que es un dominio F_{n3} derivado del décimo módulo natural del dominio de fibronectina humana de tipo III (¹⁰F_{n3}):
 25 VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATIS
 GLKPGVDYITVYAVTGRGDSPASSKPI SINYRT (SEQ ID NO: 1) (los bucles AB, CD y EF están subrayados, y los bucles BC, DE y FG están en negrita).

30 En determinadas realizaciones, las secuencias de unión a no ligando de ¹⁰F_{n3} pueden modificarse siempre que ¹⁰F_{n3} conserve la función de unión al ligando y/o la estabilidad estructural. Se ha informado acerca de una variedad de armazones ¹⁰F_{n3} mutantes. En un aspecto, uno o más de Asp 7, Glu 9 y Asp 23, se reemplaza por otro aminoácido, tal como, por ejemplo, un resto de aminoácido no cargado negativamente (por ejemplo, Asn, Lys, etc.). Se ha informado que, en comparación con la forma natural, estas mutaciones tienen el efecto de promover una mayor estabilidad del ¹⁰F_{n3} mutante a pH neutro (véase, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 02/04523). Se ha desvelado una variedad de alteraciones adicionales en el armazón ¹⁰F_{n3} que son beneficiosas o neutras. Véase, por ejemplo, Batori et al., Protein Eng 2002;15:1015-20; Koide et al., Biochemistry, 2001;40:10326-33.

40 Las proteínas ¹⁰F_{n3} tanto variantes como naturales se caracterizan por la misma estructura, específicamente siete secuencias de dominio de cadena beta, denominadas de la A a la G y seis regiones bucle (bucle AB, bucle BC, bucle CD, bucle DE, bucle EF y bucle FG) que conectan las siete secuencias de dominio de cadena beta. En los documentos WO 2013/067029 A2 y WO 2011/130354 A1, se describen polipéptidos que comprenden dominios F_{n3} aleatorizados o mutados. Las cadenas beta situadas más cerca de los extremos N y C pueden adoptar una conformación de tipo beta en solución. En la SEQ ID NO: 1, el bucle AB corresponde a los restos 14-17, el bucle BC corresponde a los restos 23-31, el bucle CD corresponde a los restos 37-47, el bucle DE corresponde a los restos 51-56, el bucle EF corresponde a los restos 63-67 y el bucle FG corresponde a los restos 75-87. Gran parte de la variabilidad generalmente ocurrirá en uno o más de los bucles. Sin embargo, se debería de entender que no todos los restos de una región de bucle deben modificarse para obtener un dominio de unión de ¹⁰F_{n3} que tenga fuerte afinidad por una diana deseada. En algunas realizaciones, solo los restos del bucle CD se modifican para producir dominios ¹⁰F_{n3} de unión a diana con alta afinidad.

50 Cada una de las cadenas beta o de tipo beta de un polipéptido ¹⁰F_{n3} puede consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95% o 100% idéntica a la secuencia de una cadena beta o de tipo beta de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 30-34, 36-40, 42-46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 65-68, 70, 71, 73-76, 78, 79, 81-84, 86, 87, 89-98, 100-109 y 111-118, siempre que dicha variación no altere la estabilidad del polipéptido en condiciones fisiológicas.

60 Además, también pueden realizarse inserciones y deleciones en las regiones bucle mientras se siguen produciendo dominios de unión ¹⁰F_{n3} de unión a HSA. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la longitud de uno o más bucles seleccionados de AB, BC, CD, DE, EF y FG se puede alargar o acortar en relación con el correspondiente bucle en el ¹⁰F_{n3} humano natural. En cualquier polipéptido dado, la longitud de uno o más bucles puede alargarse, reducirse o puede ser una combinación de esto. En determinadas realizaciones, la longitud de un bucle dado se puede extender en 2-25, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20, o 10-15 aminoácidos. En determinadas realizaciones, la longitud de un bucle dado se puede reducir en 1-15, 1-11, 1-10, 1-5, 1-3, 1-2, 2-10 o 2-5 aminoácidos.

65 En el presente documento se proporcionan polipéptidos que comprenden un dominio ¹⁰F_{n3} que se une

específicamente a HSA con una K_D de 1 μM o menor, en donde el dominio $^{10}\text{Fn3}$ comprende los bucles AB, BC, CD, DE y FG, y tiene al menos un bucle seleccionado de los bucles CD y FG con una secuencia de aminoácidos modificada en relación con la secuencia del bucle correspondiente del dominio $^{10}\text{Fn3}$ humano de la SEQ ID NO: 1 o del dominio $^{10}\text{Fn3}$ humano de unión a HSA de la SEQ ID NO: 23. En algunas realizaciones, los bucles AB, CD y FG están modificados. En determinadas realizaciones, solo se modifica el bucle CD. En determinados aspectos de la divulgación, solo se modifica el bucle FG. En determinadas realizaciones, una o más alteraciones de armazón específicas se combinan con una o más alteraciones de bucle. Por "alterado" se entiende una o más alteraciones de la secuencia de aminoácidos en relación con una secuencia molde (es decir, el correspondiente dominio de fibronectina humana natural o dominio $^{10}\text{Fn3}$ expuesto en la SEQ ID NO: 23) e incluye adiciones, deleciones y sustituciones de aminoácidos.

En determinadas realizaciones, el dominio $^{10}\text{Fn3}$ tiene una combinación de alteraciones de bucle de polo norte y sur. Por ejemplo, uno o más de los bucles CD y FG, en combinación con uno o más de los bucles AB, BC, DE y EF, puede alterarse en relación con los bucles correspondientes del dominio $^{10}\text{Fn3}$ humano de la SEQ ID NO: 1 o del dominio $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA de la SEQ ID NO: 23.

En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende un dominio $^{10}\text{Fn3}$ que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 100 % idéntica a las regiones no bucle y/o regiones bucle no modificadas de una cualquiera de las SEQ ID NO: 30-34, 36-40, 42-46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 65-68, 70, 71, 73-76, 78, 79, 81-84, 86, 87, 89-98, 100-109 y 111-118, en donde al menos un bucle seleccionado de AB, BC, CD, DE, EF o FG está modificado. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el bucle AB puede tener hasta 4 sustituciones de aminoácidos, hasta 10 inserciones de aminoácidos, hasta 3 deleciones de aminoácidos o una combinación de las mismas; el bucle BC puede tener hasta 9 sustituciones de aminoácidos, hasta 4 inserciones de aminoácidos, hasta 3 deleciones de aminoácidos o una combinación de las mismas; el bucle CD puede tener hasta 6 sustituciones de aminoácidos, hasta 10 inserciones de aminoácidos, hasta 4 deleciones de aminoácidos o una combinación de las mismas; el bucle DE puede tener hasta 6 sustituciones de aminoácidos, hasta 10 inserciones de aminoácidos, hasta 4 deleciones de aminoácidos o una combinación de las mismas; el bucle EF puede tener hasta 5 sustituciones de aminoácidos, hasta 10 inserciones de aminoácidos, hasta 3 deleciones de aminoácidos o una combinación de las mismas; y/o el bucle FG puede tener hasta 12 sustituciones de aminoácidos, hasta 11 deleciones de aminoácidos, hasta 25 inserciones de aminoácidos o una combinación de las mismas, en relación con los bucles AB, BC, CD, DE, EF y/ o FG correspondientes de las SEQ ID NO: 30-34, 36-40, 42-46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 65-68, 70, 71, 73-76, 78, 79, 81-84, 86, 87, 89-98, 100-109 y 111-118.

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

En determinadas realizaciones, la proteína armazón basada en fibronectina comprende un dominio $^{10}\text{Fn3}$ que se define generalmente siguiendo la secuencia:

VSDVPRDLEVVA(A)_uLLISW(X)_vYRITY(X)_wFTV(X)_xATISGL(X)_yYTITVYA(X)_zISI NYRT (SEQ ID NO: 2)

En la SEQ ID NO: 2, el bucle AB se representa mediante (X)_u, el bucle BC se representa mediante (X)_v, el bucle CD se representa mediante (X)_w, el bucle DE se representa mediante (X)_x, el bucle EF se representa mediante (X)_y y el bucle FG se representa mediante X_z. X representa cualquier aminoácido, y el subíndice después de la X representa un número entero del número de aminoácidos. En particular, u, v, w, x, y y z pueden estar independientemente en cualquier lugar entre 2-20, 2-15, 2-10, 2-8, 5-20, 5-15, 5-10, 5-8, 6-20, 6-15, 6-10, 6-8, 2-7, 5-7 o 6-7 aminoácidos. Las secuencias de las cadenas beta (subrayadas) pueden tener en cualquier parte de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2 o de 0 a 1 sustituciones, deleciones o adiciones en las 7 regiones armazón en relación con los correspondientes aminoácidos mostrados en la SEQ ID NO: 2. En determinadas realizaciones, las secuencias de las cadenas beta pueden tener en cualquier parte de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, o de 0 a 1 sustituciones conservativas en las 7 regiones de armazón en relación con los aminoácidos correspondientes mostrados en la SEQ ID NO: 2. En determinadas realizaciones, los restos de aminoácidos del núcleo hidrófobo (restos en negrita en la SEQ ID NO: 2 anterior) son fijos, y cualquier sustitución, sustitución conservativa, deleción o adición se produce en restos distintos de los restos de aminoácidos del núcleo hidrófobo. En algunas realizaciones, los restos del núcleo hidrófobo de los polipéptidos proporcionados en el presente documento, no se han modificado en relación con el dominio $^{10}\text{Fn3}$ humano natural (SEQ ID NO: 1).

En determinados aspectos, la solicitud proporciona dominios $^{10}\text{Fn3}$ con modificaciones de polo sur y/o polo norte que se unen específicamente a HSA para prolongar la $t_{1/2}$ de un residuo que está ligado al dominio $^{10}\text{Fn3}$.

En los seres humanos, la HSA tiene una concentración en suero de 600 μM y una $t_{1/2}$ de 19 días. La $t_{1/2}$ prolongada

de HSA se ha atribuido, en parte, a su reciclaje a través del receptor Fc neonatal (FcRn). La 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 nuevamente en la corriente sanguínea, desviándola de la degradación lisosómica. El FcRn se expresa ampliamente y se considera que la ruta de reciclaje es constitutiva. En la mayoría de los tipos celulares, la mayor parte del FcRn reside en el endosoma de clasificación intracelular. La HSA se internaliza fácilmente mediante un mecanismo inespecífico de pinocitosis en fase fluida y se rescata de la degradación en el lisosoma por FcRn. Al pH ácido encontrado en el endosoma, la afinidad de la HSA por el FcRn aumenta (5 μ M a pH 6,0). Una vez unida al FcRn, la HSA se desvía de la ruta de degradación lisosómica, se transcitosiza y se libera en la superficie celular.

Las adnectinas de unión a HSA basadas en polo norte se denominan adnectinas de unión a seroalbúmina de "primera generación", y se describen, por ejemplo, en el documento WO2011140086. Para mejorar las adnectinas de unión a seroalbúmina (SABA, del inglés *serum albumin binding adnectins*) basadas en polo norte después de la primera generación, de las cuales algunas no se unieron a la seroalbúmina de ratón o rata, no tenían alta afinidad por las seroalbúminas entre especies, y no siempre fueron compatibles en una plataforma multivalente basada en 10 Fn3, se desarrollaron adnectinas de unión a HSA basadas en polo sur de segunda generación (adnectinas PKE2) con bucles de polo sur modificados (véase el documento PCT/US15/21535). Una de dichas adnectinas es la ADX_7016_A01 (una adnectina PKE2 de segunda generación) que se une al dominio I-II de HSA y que tiene la siguiente secuencia núcleo:
EWAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIT
VYAVTGS~~G~~ESPASSK~~P~~ISINYRT (SEQ ID NO: 23; los bucles CD y FG están subrayados)

La ADX_7016_A01 tiene baja inmunogenicidad y se une a HSA con una K_D de aproximadamente 3-6 nM. Un polipéptido de fusión que comprende un dominio 10 Fn3 heterólogo fusionado con ADX_7016_A01 tiene una semivida de aproximadamente 82 horas en ratones. Aunque la ADX_7016_A01 prolonga sustancialmente la semivida de los compañeros de fusión, determinadas situaciones pueden requerir que el compañero de fusión tenga una semivida más corta que la otorgada por ADX_7016_A01.

Por tanto, en el presente documento se proporcionan polipéptidos que comprenden un dominio 10 Fn3 que se une a HSA, en donde el bucle CD y/o FG del dominio 10 Fn3 tiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, y el bucle FG opcionalmente 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos en relación con los bucles CD y FG de un dominio 10 Fn3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23, en donde la semivida en suero de un residuo (por ejemplo, polipéptido) que está unido al dominio 10 Fn3 se prolonga en relación con la del residuo que no está unido al dominio 10 Fn3.

De acuerdo con un aspecto de la invención, el bucle CD tiene 2 sustituciones de aminoácidos en relación con el bucle CD correspondiente del dominio 10 Fn3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23.

Según otro aspecto de la invención, el bucle CD tiene 1 sustitución de aminoácidos en relación con el bucle CD del dominio 10 Fn3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23.

En determinadas realizaciones, el bucle FG tiene 1 sustitución de aminoácidos en relación con el bucle FG del dominio 10 Fn3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23.

En determinadas realizaciones, el bucle CD tiene 1 sustitución de aminoácidos y el bucle FG tiene 1 sustitución en relación con el bucle CD y el bucle FG del dominio 10 Fn3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23.

En determinadas realizaciones, el polipéptido se une a HSA con una velocidad de disociación (kd) que es mayor que la kd del dominio 10 Fn3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23.

En el presente documento, los polipéptidos que comprenden un dominio 10 Fn3 con una velocidad de disociación (kd) que es mayor que la kd del dominio 10 Fn3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23, reciben el nombre de adnectinas "PKE3".

Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan polipéptidos que comprenden un dominio 10 Fn3 que se une a la HSA con una K_D de 1 μ M o menor, en donde el bucle CD y/o FG del dominio 10 Fn3 tiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, y opcionalmente, el bucle FG tiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos en relación con los bucles CD y FG de un dominio 10 Fn3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23, en donde el dominio 10 Fn3 se une a HSA con una velocidad de disociación (kd) que es mayor que la kd del dominio 10 Fn3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23, y en donde la semivida en suero del polipéptido se prolonga en relación con el polipéptido que carece del dominio 10 Fn3.

En determinadas realizaciones, la relación entre la velocidad de disociación del dominio 10 Fn3 y la velocidad de disociación del dominio 10 Fn3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23, es de al menos aproximadamente 2, tal como de al menos aproximadamente 3, al menos de aproximadamente 4, al menos

de aproximadamente 5, al menos de aproximadamente 6, al menos de aproximadamente 7, al menos de aproximadamente 8, al menos de aproximadamente 9, al menos de aproximadamente 10, al menos de aproximadamente 15, al menos de aproximadamente 20, al menos de aproximadamente 25, al menos de aproximadamente 30, al menos de aproximadamente 35, al menos de aproximadamente 40, al menos de aproximadamente 45, al menos de aproximadamente 50, al menos de aproximadamente 75, al menos de aproximadamente 100 o mayor. En determinadas realizaciones, la relación es de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29, aproximadamente 30, aproximadamente 31, aproximadamente 32, aproximadamente 33, aproximadamente 34, aproximadamente 35, aproximadamente 36, aproximadamente 37, aproximadamente 38, aproximadamente 39, aproximadamente 40, aproximadamente 41, aproximadamente 42, aproximadamente 43, aproximadamente 44, aproximadamente 45, aproximadamente 46, aproximadamente 47, aproximadamente 48, aproximadamente 49, aproximadamente 50, aproximadamente 51, aproximadamente 52, aproximadamente 53, aproximadamente 54, aproximadamente 55, aproximadamente 56, aproximadamente 57, aproximadamente 58, aproximadamente 59 o aproximadamente 60. En determinadas realizaciones, la relación es 1,0, 1,1, 1,2, 3,3, 3,9, 4,0, 4,1, 4,8, 5,0, 5,6, 6,5, 6,6, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 28, 28,9, 30,3, 32,0, 34,0, 34,3, 37,3, 50,0, 52, 52,7, 53,0, 56,0 o 79,4. En determinadas realizaciones, la relación está en el intervalo de 2-100, 2-75, 2-50, 2-45, 2-40, 2-35, 2-30, 2-25, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 5-100, 5-75, 5-50, 5-45, 5-40, 5-35, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-100, 10-75, 10-50, 10-45, 10-40, 10-35, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 20-100, 20-75, 20-50, 20-45, 20-40, 20-35, 20-30, 20-25, 30-100, 30-75, 30-50, 30-45, 30-40, 30-35, 40-100, 40-75, 40-50, 40-45, 50-100, 50-75, 60-100, 60-75, 70-100, 70-75, 80-100, 80-90, 90-100, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 25-40, 30-40, 50-55, 75-85, 1-80, 1-70, 1-60, 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-10 o 1-5.

En determinadas realizaciones, la velocidad de disociación de un dominio $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA es de al menos $2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $2,5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$; $3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$; $5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$; 10^{-3} s^{-1} ; $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; $7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; 10^{-2} s^{-1} ; $3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$; o $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. En determinadas realizaciones, la velocidad de disociación de un dominio $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA está en el intervalo de $2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a $5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$; de $3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ a $10 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$; de $5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ a $10 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$; de $7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ a $10 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$; de 3×10^4 a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; de 10^{-3} s^{-1} a 10^{-2} s^{-1} ; o de $3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ a 10^{-3} s^{-1} .

En determinadas realizaciones, el polipéptido se une a HSA con una velocidad de asociación (k_a) que está aproximadamente dentro de un orden de magnitud (es decir, dentro de aproximadamente 10 veces) del de la k_a del dominio $^{10}\text{Fn3}$ que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23.

Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan polipéptidos que comprenden un dominio $^{10}\text{Fn3}$ que se une a la HSA con una K_D de $1 \mu\text{M}$ o menor, en donde el bucle CD y/o FG del dominio $^{10}\text{Fn3}$ tiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, y opcionalmente, el bucle FG tiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos en relación con los bucles CD y FG de un dominio $^{10}\text{Fn3}$ que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23, en donde el polipéptido se une a HSA con una velocidad de disociación (k_d) que es mayor que la k_d del dominio $^{10}\text{Fn3}$ que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23, en donde el polipéptido se une a HSA con una velocidad de asociación (k_a) que está dentro de aproximadamente un orden de magnitud (es decir, dentro de aproximadamente 10 veces) del de la k_a del dominio $^{10}\text{Fn3}$ que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23, y en donde la semivida en suero de un residuo (por ejemplo, polipéptido) que está ligado al dominio $^{10}\text{Fn3}$ se prolonga en relación con el del residuo que no está ligado al dominio $^{10}\text{Fn3}$.

Según un aspecto de la invención, el bucle CD del dominio $^{10}\text{Fn3}$ tiene 2 sustituciones de aminoácidos en relación con el bucle CD correspondiente del dominio $^{10}\text{Fn3}$ que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23.

Según otro aspecto de la invención, el bucle CD del dominio $^{10}\text{Fn3}$ tiene 2 sustituciones de aminoácidos en relación con el bucle CD correspondiente del dominio $^{10}\text{Fn3}$ que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23, en donde las 2 sustituciones de aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en:

- (i) la arginina (R) en la posición 2 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, E, A, Q o N;
- (ii) la glutamina (Q) en la posición 5 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por D;
- (iii) la tirosina (Y) en la posición 7 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de S o A;
- (iv) la leucina (L) en la posición 10 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de S, T o A;
- (v) la leucina (L) en la posición 13 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, S o A;
- (vi) la tirosina (Y) en la posición 14 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado

de A o T;

(vii) la isoleucina (I) en la posición 15 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, S o A; y

5 (viii) La tirosina (Y) en la posición 16 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de Q, E, S o A.

Según otro aspecto de la invención, el bucle CD del dominio ¹⁰F_n3 tiene 1 sustitución de aminoácido en relación con el bucle CD correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23.

10 Según otro aspecto de la invención, el bucle CD del dominio ¹⁰F_n3 tiene 1 sustitución de aminoácido en relación con el bucle CD correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23, en donde la sustitución de 1 aminoácido se selecciona del grupo que consiste en:

15 (i) la arginina (R) en la posición 2 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, E, A, Q o N;

(ii) la glutamina (Q) en la posición 5 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por D;

(iii) la tirosina (Y) en la posición 7 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de S o A;

20 (iv) la leucina (L) en la posición 10 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de S, T o A;

(v) la leucina (L) en la posición 13 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, S o A;

25 (vi) la tirosina (Y) en la posición 14 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de A o T;

(vii) la isoleucina (I) en la posición 15 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, S o A; y

(viii) La tirosina (Y) en la posición 16 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de Q, E, S o A.

30 En determinadas realizaciones, el bucle FG del dominio ¹⁰F_n3 tiene 1 sustitución de aminoácido en relación con el bucle FG correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23.

35 En determinadas realizaciones, el bucle FG del dominio ¹⁰F_n3 tiene 1 sustitución de aminoácido en relación con el bucle FG correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23, en donde la lisina (K) en la posición 12 del bucle FG (SEQ ID NO: 29) se sustituye por un aminoácido seleccionado de A, T o S.

40 En determinadas realizaciones, el bucle CD del dominio ¹⁰F_n3 tiene 1 sustitución de aminoácido y el bucle FG tiene 1 sustitución de aminoácido en relación con el bucle CD y el bucle FG del dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23.

45 En determinadas realizaciones, el bucle CD del dominio ¹⁰F_n3 tiene 1 sustitución de aminoácido y el bucle FG tiene 1 sustitución de aminoácido en relación con el bucle CD y el bucle FG del dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23, en donde

a) la sustitución de 1 aminoácido en el bucle CD se selecciona del grupo que consiste en

50 (i) la arginina (R) en la posición 2 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, E, A, Q o N;

(ii) la glutamina (Q) en la posición 5 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por D;

(iii) la tirosina (Y) en la posición 7 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de S o A;

55 (iv) la leucina (L) en la posición 10 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de S, T o A;

(v) la leucina (L) en la posición 13 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, S o A;

60 (vi) la tirosina (Y) en la posición 14 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de A o T;

(vii) la isoleucina (I) en la posición 15 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, S o A; y

(viii) La tirosina (Y) en la posición 16 del bucle CD (SEQ ID NO: 28) se sustituye por un aminoácido seleccionado de Q, E, S o A; y

65 b) la lisina en la posición 12 del bucle FG (SEQ ID NO: 29) se sustituye por un aminoácido seleccionado de A, T

o S.

En determinadas realizaciones, los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA comprenden una secuencia que tiene al menos 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con el dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 30-34, 36-40, 42-46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 65-68, 70, 71, 73-76, 78, 79, 81-84, 86, 87, 89-98, 100-109 y 111-118, o que comprende, como máximo, una diferencia de 1, 2, 3, 1-2 o 1-3 aminoácidos (es decir, sustitución, por ejemplo, delección, adición o sustitución conservativa), tal como una o más de las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones, las moléculas de unión a HSA comprenden una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la región de bucle no CD de las SEQ ID NO: 23-27, 30-34, 36-40, 42-46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 65-68, 70, 71, 73-76, 78, 79, 81-84, 86, 87, 89-98, 100-109 y 111-118.

En determinadas realizaciones, el bucle CD de los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA, descritos en el presente documento, comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

GREVQKYS~~D~~LGPLYIYQE (SEQ ID NO: 28),
 GREVQKYS~~O~~LGPLYI**S**QE (SEQ ID NO: 35),
 GREVQKYS~~D~~TGPLYIYQE (SEQ ID NO: 41),
 GREVQKYS~~O~~LGPLYI**Q**QE (SEQ ID NO: 47),
 GREVQK**S**SDLGPLYIYQE (SEQ ID NO: 59),
 G**A**EVQKYS~~D~~LGPLYIYQE (SEQ ID NO: 64),
 G**N**EVQKYS~~D~~LGPLYIYQE (SEQ ID NO: 69),
 GREVQKYS~~D~~LG**P**AIYIYQE (SEQ ID NO: 72),
 GREVQKYS~~D~~LGPLY**A**YQE (SEQ ID NO: 77),
 GREVQKYS~~D~~LGPLYI**A**QE (SEQ ID NO: 80),
 GREVQKYS~~D~~LGPLY**S**YQE (SEQ ID NO: 85),
 GREV**D**KYS~~O~~LGPLYIYQE (SEQ ID NO: 88),
 GREVQK**A**S~~D~~LGPLYIYQE (SEQ ID NO: 99),
 GREVQKYS~~D~~LG**P**S~~I~~YIYQE (SEQ ID NO: 110) y
 GREVQKYS~~D~~LGPLY**A**EQE (SEQ ID NO: 119).

En determinadas realizaciones, el bucle FG de los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA, descritos en el presente documento, comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

VTGSGESPASSKP (SEQ ID NO: 29),
 VTGSGESPASSAP (SEQ ID NO: 50),
 VTGSGESPASSTP (SEQ ID NO: 53) y
 VTGSGESPASSSP (SEQ ID NO: 56).

En determinadas realizaciones, regiones adicionales en el dominio ¹⁰F_n3, tales como las regiones de cadena β, de extremo N y/o de extremo C, también pueden modificarse en cuanto a la secuencia en relación con las SEQ ID NO: 23, 30-34, 36-40, 42-46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 65-68, 70, 71, 73-76, 78, 79, 81-84, 86, 87, 89-98, 100-109 y 111-118, y dichas modificaciones adicionales también pueden contribuir a la unión con la diana.

Las regiones de no unión de los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA, descritos en el presente documento, pueden tener 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 conservativas, delecciones o adiciones en relación con los restos de aminoácidos de armazón de las SEQ ID NO: 1, 23, 30-34, 36-40, 42-46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 65-68, 70, 71, 73-76, 78, 79, 81-84, 86, 87, 89-98, 100-109 y 111-118. Dichas modificaciones de armazón pueden hacerse, siempre y cuando el dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA sea capaz de unirse a la HSA con una K_D deseada.

En determinadas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de las regiones de extremo N y/o de extremo C de los polipéptidos proporcionados en el presente documento pueden modificarse mediante delección, sustitución o inserción en relación con las secuencias de aminoácidos de las regiones correspondientes del dominio ¹⁰F_n3 humano natural (SEQ ID NO: 1). Los dominios ¹⁰F_n3 generalmente comienzan con el aminoácido número 1 de la SEQ ID NO: 1. Sin embargo, también se incluyen dominios con delecciones de aminoácidos.

También pueden añadirse secuencias adicionales al extremo N o C de un dominio ¹⁰F_n3 que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 30-34, 36-40, 42-46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 65-68, 70, 71, 73-76, 78, 79, 81-84, 86, 87, 89-98, 100-109 y 111-118. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la extensión del extremo N consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: M, MG y G, que puede añadirse a los dominios ¹⁰F_n3 que comienzan con "VSD" como, por ejemplo, en la SEQ ID NO: 1. En realizaciones ilustrativas, puede añadirse una región del extremo N alternativa que tenga una longitud de 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 aminoácidos, o de 1 aminoácido, a la región del extremo N de una cualquiera de las SEQ ID NO: 30-34, 36-40, 42-46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 65-68, 70, 71, 73-76, 78, 79, 81-84, 86, 87,

- 89-98, 100-109 y 111-118. Como ejemplos de regiones del extremo N alternativas se incluyen (representadas mediante el código de aminoácidos de una sola letra) M, MG, G, MGVSDVPRDL (SEQ ID NO: 3) y GVSDVPRDL (SEQ ID NO: 4). Otras regiones del extremo N adecuadas alternativas incluyen, por ejemplo, X_nSDVPRDL (SEQ ID NO: 5), X_nDVPRDL (SEQ ID NO: 6), X_nVPRDL (SEQ ID NO: 7), X_nPRDL (SEQ ID NO: 8) X_nRDL (SEQ ID NO: 9), X_nDL (SEQ ID NO: 10) o X_nL, en donde n = 0, 1 o 2 aminoácidos, en donde cuando n = 1, X es Met o Gly, y cuando n = 2, X es Met-Gly. Cuando se añade una secuencia de Met-Gly al extremo N de un dominio ¹⁰F_n3, la M generalmente se escindirá, dejando una G en el extremo N. En determinadas realizaciones, la región del extremo N alternativa comprende la secuencia de aminoácidos MASTSG (SEQ ID NO: 11).
- 10 En realizaciones ilustrativas, puede añadirse una región de extremo C alternativa que tenga una longitud de 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 aminoácidos, o de 1 aminoácido, a la región de extremo C de una cualquiera de las SEQ ID NO: 30-34, 36-40, 42-46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 65-68, 70, 71, 73-76, 78, 79, 81-84, 86, 87, 89-98, 100-109 y 111-118. Como ejemplos específicos de secuencias de extremo C alternativas se incluyen, por ejemplo, polipéptidos que comprenden, que consisten esencialmente en, o que consisten en, EIEK (SEQ ID NO: 12), EGSGC (SEQ ID NO: 13), EIEKPCQ (SEQ ID NO: 14), EIEKPSQ (SEQ ID NO: 15), EIEKP (SEQ ID NO: 16), EIEKPS (SEQ ID NO: 17) o EIEKPC (SEQ ID NO: 18). En determinadas realizaciones, la región de extremo C alternativa comprende EIDK (SEQ ID NO: 19), y en realizaciones particulares, la región de extremo C alternativa es EIDKPCQ (SEQ ID NO: 20) o EIDKPSQ (SEQ ID NO: 21). Como regiones adicionales de extremo C alternativas adecuadas se incluyen las expuestas en las SEQ ID NO: 148-172.
- 15
- 20 En determinadas realizaciones, las secuencias de extensión de extremo C comprenden restos E y D, y pueden tener una longitud de entre 8 y 50, 10 y 30, 10 y 20, 5 y 10 y 2 y 4 aminoácidos. En determinadas realizaciones, las secuencias de cola incluyen enlazadores basados en ED en los que la secuencia comprende repeticiones en tándem de ED. En determinadas realizaciones, la secuencia de cola comprende 2-10, 2-7, 2-5, 3-10, 3-7, 3-5, 3, 4 o 5 repeticiones de ED. En determinadas realizaciones, las secuencias de cola basadas en ED también pueden incluir restos de aminoácidos adicionales, tales como, por ejemplo, EI, EID, ES, EC, EGS y EGC. Dichas secuencias están basadas, en parte, en secuencias de cola de adnectina conocidas, tal como EIDKPSQ (SEQ ID NO: 21), en la que se ha eliminado los restos D y K. En determinadas realizaciones, la cola basada en ED comprende restos E, I o EI antes de que se repita DE.
- 25
- 30 En determinadas realizaciones, un residuo en el extremo C alternativo, que puede ligarse a los aminoácidos RT de extremo C (es decir, correspondiente a los aminoácidos 93-94 de la SEQ ID NO: 1) de cualquiera de los dominios ¹⁰F_n3 proporcionados en el presente documento, comprende los aminoácidos P_mX_n, en donde P es prolina, X es cualquier aminoácido, m es un número entero que es al menos 1 y n es 0 o un número entero que es al menos 1. En determinadas realizaciones, el residuo en el extremo C alternativo comprende los aminoácidos PI, PC, PID, PIE, PIDK (SEQ ID NO: 159), PIEK (SEQ ID NO: 160), PIDKP (SEQ ID NO: 161), PIEKP (SEQ ID NO: 162), PIDKPS (SEQ ID NO: 163), PIEKPS (SEQ ID NO: 164), PIDKPC (SEQ ID NO: 165), PIEKPC (SEQ ID NO: 166), PIDKPSQ (SEQ ID NO: 167), PIEKPSQ (SEQ ID NO: 168), PIDKPCQ (SEQ ID NO: 169), PIEKPCQ (SEQ ID NO: 170), PHHHHHH (SEQ ID NO: 171) y PCHHHHHH (SEQ ID NO: 172).
- 35
- 40 En determinadas realizaciones, los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA, descritos en el presente documento, comprenden, o como alternativa, carecen de una cola de 6 histidinas.
- 45 En determinadas realizaciones, los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA corresponden a los dominios ¹⁰F_n3 núcleo que carecen de líder en el extremo N y de cola en el extremo C, como se exponen en las SEQ ID NO: 30, 36, 42, 48, 51, 54, 57, 60, 62, 65, 67, 70, 73, 75, 78, 81, 83, 86, 89, 91, 93, 95, 97, 100, 102, 104, 106, 108, 111, 113, 115 y 117.
- 50 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA mutantes, que tienen un resto de cisteína introducido en una posición específica para permitir, por ejemplo, la conjugación química con residuos heterólogos (por ejemplo, un polipéptido heterólogo tal como un dominio ¹⁰F_n3). En realizaciones preferidas, las mutaciones de cisteína no alteran sustancialmente la unión del dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA con HSA.
- 55 En determinadas realizaciones, en el extremo C del dominio ¹⁰F_n3, se introduce un resto de prolina, por ejemplo, como se muestra, por ejemplo, en las SEQ ID NO: 33, 34, 39, 40, 45 y 46. Los otros dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA descritos en el presente documento, por ejemplo, los que tienen una secuencia núcleo de las de SEQ ID NO: 48, 51, 54, 57, 60, 62, 65, 67, 70, 73, 75, 78, 81, 83, 86, 89, 91, 93, 95, 97, 100, 102, 104, 106, 108, 111, 113, 115 y 117, pueden modificarse de manera similar. En determinadas realizaciones, el resto de prolina se introduce en el extremo C de una adnectina de unión a HSA en tándem. La adición del resto de prolina no impide la adición de secuencias de aminoácidos adicionales en el extremo C de un dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA o de una adnectina de unión a HSA en tándem.
- 60
- 65 En determinadas realizaciones, los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA, descritos en el presente documento, se unen a HSA con una K_D menor de 3 μM, 2,5 μM, 2 μM, 1,5 μM, 1 μM, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, 50 pM o 10 pM. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, 0,1 nM a

100 nM, 0,1 µM a 1 µM, 0,5 nM a 50 nM, 0,5 nM a 100 nM, 0,5 µM a 1 µM, 1 nM a 50 nM, 1 nM a 100 nM, 1 µM a 1 µM, 50 µM a 3 µM, 50 µM a 2 µM, 50 µM a 1 µM, 50 nM a 500 nM, 50 nM a 100 nM, 100 µM a 3 µM, 100 µM a 2 µM, 100 µM a 1 µM, 250 µM a 3 µM, 250 µM a 2 µM, 250 µM a 1 µM, 250 nM a 500 nM, 500 µM a 3 µM, 500 µM a 2 µM, 500 µM a 1 µM, 1 µM a 3 µM o 1 µM a 2 µM.

5 En determinadas realizaciones, los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA, descritos en el presente documento, también pueden unirse a la seroalbúmina de uno o más de mono cinomolgo, mono *Rhesus*, rata o ratón.

10 En determinadas realizaciones, los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA, descritos en el presente documento, se unen a la seroalbúmina de mono *Rhesus* (*RhSA*, *rhesus serum albumin*) o a la seroalbúmina de mono cinomolgo (*CySA*, *cynomolgus monkey serum albumin*) con una K_D menor de 3 µM, 2,5 µM, 2 µM, 1,5 µM, 1 µM, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, 100 pM, 50 pM o 10 pM. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, 0,1 nM a 100 nM, 0,1 µM a 1 µM, 0,5 nM a 50 nM, 0,5 nM a 100 nM, 0,5 µM a 1 µM, 1 nM a 50 nM, 1 nM a 100 nM, 1 µM a 1 µM, 50 µM a 3 µM, 50 µM a 2 µM, 50 µM a 1 µM, 50 nM a 500 nM, 50 nM a 100 nM, 100 µM a 3 µM, 100 µM a 2 µM, 100 µM a 1 µM, 250 µM a 3 µM, 250 µM a 2 µM, 250 µM a 1 µM, 250 nM a 500 nM, 500 µM a 3 µM, 500 µM a 2 µM, 500 µM a 1 µM, 1 µM a 3 µM o 1 µM a 2 µM.

20 En determinadas realizaciones, los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA, descritos en el presente documento, se unen a la seroalbúmina de mono *Rhesus* (*RhSA*), seroalbúmina de mono cinomolgo (*CySA*) y seroalbúmina de ratón (*MSA*) con una K_D menor de 3 µM, 2,5 µM, 2 µM, 1,5 µM, 1 µM, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, 100 pM, 50 pM o 10 pM. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, 0,1 nM a 100 nM, 0,1 µM a 1 µM, 0,5 nM a 50 nM, 0,5 nM a 100 nM, 0,5 µM a 1 µM, 1 nM a 50 nM, 1 nM a 100 nM, 1 µM a 1 µM, 50 µM a 3 µM, 50 µM a 2 µM, 50 µM a 1 µM, 50 nM a 500 nM, 50 nM a 100 nM, 100 µM a 3 µM, 100 µM a 2 µM, 100 µM a 1 µM, 250 µM a 3 µM, 250 µM a 2 µM, 250 µM a 1 µM, 250 nM a 500 nM, 500 µM a 3 µM, 500 µM a 2 µM, 500 µM a 1 µM, 1 µM a 3 µM o 1 µM a 2 µM.

30 En determinadas realizaciones, los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA, descritos en el presente documento, se unen a seroalbúmina de mono *Rhesus* (*RhSA*), seroalbúmina de mono cinomolgo (*CySA*), seroalbúmina de ratón (*MSA*) y seroalbúmina rata (*RSA*) con una K_D menor de 3 µM, 2,5 µM, 2 µM, 1,5 µM, 1 µM, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, 100 pM, 50 pM o 10 pM. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, 0,1 nM a 100 nM, 0,1 µM a 1 µM, 0,5 nM a 50 nM, 0,5 nM a 100 nM, 0,5 µM a 1 µM, 1 nM a 50 nM, 1 nM a 100 nM, 1 µM a 1 µM, 50 µM a 3 µM, 50 µM a 2 µM, 50 µM a 1 µM, 50 nM a 500 nM, 50 nM a 100 nM, 100 µM a 3 µM, 100 µM a 2 µM, 100 µM a 1 µM, 250 µM a 3 µM, 250 µM a 2 µM, 250 µM a 1 µM, 250 nM a 500 nM, 500 µM a 3 µM, 500 µM a 2 µM, 500 µM a 1 µM, 1 µM a 3 µM o 1 µM a 2 µM.

35 En determinadas realizaciones, los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA, descritos en el presente documento, se unen a HSA a un intervalo de pH de 5,5 a 7,4.

40 En determinadas realizaciones, los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA, descritos en el presente documento, se unen al dominio I-II de HSA.

45 En determinadas realizaciones, la semivida en suero de los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA, descritos en el presente documento, o la semivida en suero del dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA ligado a un residuo heterólogo (por ejemplo, un segundo dominio ¹⁰F_n3) es de al menos 2 horas, 2,5 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 15 horas, 20 horas, 25 horas, 30 horas, 35 horas, 40 horas, 50 horas, 60 horas, 70 horas, 80 horas, 90 horas, 100 horas, 110 horas, 120 horas, 130 horas, 135 horas, 140 horas, 150 horas, 160 horas o 200 horas. En determinadas realizaciones, la semivida en suero de los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA o la semivida en suero del dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA ligado a un residuo heterólogo (por ejemplo, un segundo dominio ¹⁰F_n3) es de 2-200 horas, 5-200 horas, 10-200 horas, 25-200 horas, 50-200 horas, 100-200 horas, 150-200 horas, 2-150 horas, 2-100 horas, 2-50 horas, 2-25 horas, 2-10 horas, 2-5 horas, 5-150 horas, 10-100 horas o 25-50 horas.

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

55 En el presente documento se proporcionan proteínas, tales como adnectinas, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, moléculas pequeñas, péptidos y similares que compiten (por ejemplo, competencia cruzada) por la unión con HSA con los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA particulares descritos en el presente documento, por ejemplo, los dominios ¹⁰F_n3 (adnectinas) de unión a HSA que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 30-34, 36-40, 42-46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 65-68, 70, 71, 73-76, 78, 79, 81-84, 86, 87, 89-98, 100-109 y 111-118. Dichas proteínas competidoras pueden identificarse en función de su capacidad para inhibir competitivamente la unión con HSA de los dominios ¹⁰F_n3 de unión a seroalbúmina descritos en el presente documento en ensayos convencionales de unión a seroalbúmina. Por ejemplo, se pueden usar ensayos ELISA convencionales en los que la HSA recombinante se inmoviliza en la placa, una de las proteínas se marca con fluorescencia y se evalúa la capacidad de la proteína no marcada para competir con la unión de la proteína marcada.

65 Se proporcionan los siguientes ejemplos de ensayos de competencia en el contexto de dominios ¹⁰F_n3 de unión a

HSA que compiten con uno de los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA, descritos en el presente documento, por la unión con HSA. Cuando se analiza la competencia de una proteína que no es adnectina se pueden realizar los mismos ensayos. En una realización, puede realizarse un formato de ensayo ELISA competitivo para determinar si dos adnectinas de unión a HSA se unen a sitios de unión a adnectina (epítomos) solapantes en la HSA. En un formato, la adnectina n.º 1 se aplica a una placa, que después se bloquea y se lava. A esta placa se añade HSA sola o HSA preincubada con una concentración saturante de adnectina n.º 2. Después de un período de incubación adecuado, la placa se lava y se explora con un anticuerpo policlonal anti-HSA, seguido de detección con conjugado de estreptavidina-HRP y de procedimientos convencionales de revelado con tetrametilbencidina. Si la señal de DO es la misma con o sin preincubación con adnectina n.º 2, entonces las dos adnectinas se unen independientemente entre sí, y sus sitios de unión a adnectina no se solapan. Sin embargo, si la señal de DO para los pocillos que recibieron mezclas de seroalbúmina/adnectina n.º 2 es más baja que la de pocillos que recibieron HSA sola, entonces se confirma que la unión de la adnectina n.º 2 bloquea la unión de la adnectina n.º 1 con la HSA.

Como alternativa, se llevó a cabo un experimento similar mediante resonancia de plasmón superficial (RPS, por ejemplo, BIAcore). La adnectina n.º 1 se inmoviliza en una superficie de microplaca de RPS, seguido de inyecciones de HSA sola o HSA preincubada con una concentración saturante de adnectina n.º 2. Si la señal de unión para las mezclas de HSA/adnectina n.º 2 es igual o mayor que la de la HSA sola, entonces las dos adnectinas se unen independientemente entre sí, y sus sitios de unión a adnectina no se solapan. Sin embargo, si la señal de unión para las mezclas de HSA/adnectina n.º 2 es más baja que la señal de unión para la HSA sola, entonces se confirma que la unión de la adnectina n.º 2 bloquea la unión de la adnectina n.º 1 con la HSA. Una característica de estos experimentos es el uso de concentraciones saturantes de adnectina n.º 2. Si la HSA no está saturada con la adnectina n.º 2, entonces las conclusiones anteriores no son válidas. Para determinar si dos proteínas de unión a HSA se unen a sitios de unión de adnectina solapantes se pueden usar experimentos similares.

Ambos ensayos ilustrados anteriormente también pueden realizarse en el orden inverso, en donde la adnectina n.º 2, se inmoviliza y a la placa se añade HSA-adnectina n.º 1. Como alternativa, Las adnectinas n.º 1 y/o n.º 2 se pueden reemplazar por un anticuerpo monoclonal y/o una proteína de fusión receptor-Fc soluble.

En determinadas realizaciones, la competencia puede determinarse utilizando un ensayo HTRF (fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo) de tipo sándwich.

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

En determinadas realizaciones, en el presente documento se proporcionan adnectinas que se unen al mismo sitio de unión de la adnectina que los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA descritos en el presente documento. El epítipo unido por una adnectina particular puede determinarse usando métodos de mapeo epitópico reconocidos en la técnica, tales como análisis de rayos X de cristales de complejos de antígeno:adnectina (que proporciona resolución atómica del epítipo), mapeo de proteasas, espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX-MS), resonancia magnética nuclear bidimensional, exploración con alanina y exploración mutacional profunda (véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

C. Adnectinas multivalentes/en tándem

En el presente documento se proporcionan proteínas multivalentes que comprenden dos o más dominios ¹⁰F_n3, al menos uno de los cuales se une específicamente a HSA. Por ejemplo, una proteína multivalente puede comprender 2, 3 o más dominios ¹⁰F_n3 que están asociados de manera covalente. En determinadas realizaciones, la proteína multivalente es una proteína biespecífica o dimerica que comprende dos dominios ¹⁰F_n3. En determinadas realizaciones, una proteína multivalente comprende un primero dominio ¹⁰F_n3 que se une a HSA (por ejemplo, un dominio ¹⁰F_n3 descrito anteriormente en el apartado A) y un segundo dominio ¹⁰F_n3 que se une a una segunda molécula diana. Cuando tanto la primera como la segunda moléculas diana son HSA, el primer y el segundo dominios ¹⁰F_n3 pueden unirse al mismo epítipo o a epítomos diferentes. Además, cuando la primera y la segunda moléculas diana son iguales, las regiones de modificación en el dominio ¹⁰F_n3 que están asociadas a la unión con la diana pueden ser iguales o diferentes.

En determinadas realizaciones, cada dominio ¹⁰F_n3 de un armazón de proteína multivalente basado en fibronectina, se une a HSA con una K_D menor de 3 μM, 2,5 μM, 2 μM, 1,5 μM, 1 μM, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, 100 pM, 50 pM o 10 pM. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, 0,1 nM a 100 nM, 0,1 μM a 1 μM, 0,5 nM a 50 nM, 0,5 nM a 100 nM, 0,5 μM a 1 μM, 1 nM a 50 nM, 1 nM a 100 nM, 1 μM a 1 μM, 50 μM a 3 μM, 50 μM a 2 μM, 50 μM a 1 μM, 50 nM a 500 nM, 50 nM a 100 nM, 100 μM a 3 μM, 100 μM a 2 μM, 100 μM a 1 μM, 250 μM a 3 μM, 250 μM a 2 μM, 250 μM a 1 μM, 250 nM a 500 nM, 500 μM a 3 μM, 500 μM a 2 μM, 500 μM a 1 μM, 1 μM a 3 μM o 1 μM a 2 μM. En realizaciones ilustrativas, cada dominio ¹⁰F_n3 de un armazón de proteína multivalente basado en fibronectina, se une específicamente a HSA, es decir, a una diana no unida por

un dominio ¹⁰F_n natural, en particular, el dominio ¹⁰F_n humano natural.

Los dominios ¹⁰F_n en un armazón de proteína multivalente basado en fibronectina, pueden estar conectados por un enlazador polipeptídico. Los enlazadores polipeptídicos ilustrativos incluyen polipéptidos que tienen 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, o 1-2 aminoácidos. Los enlazadores adecuados para unir los dominios ¹⁰F_n son los que permiten que los dominios separados se plieguen independientemente entre sí formando una estructura tridimensional que permite la unión de alta afinidad a una molécula diana. Como ejemplos específicos de enlazadores adecuados se incluyen enlazadores basados en glicina-serina, enlazadores basados en glicina-prolina, enlazadores basados en prolina-alanina, así como enlazadores que tienen la secuencia de aminoácidos PSTPPTSPSTPPTSPS (SEQ ID NO: 120). En determinadas realizaciones, el enlazador es un enlazador basado en glicina-serina. En determinadas realizaciones, el enlazador es un enlazador basado en glicina-serina. Estos enlazadores comprenden restos de glicina y serina y pueden tener una longitud entre 8 y 50, 10 y 30 y 10 y 20 aminoácidos. Como ejemplos se incluyen enlazadores que tienen una secuencia de aminoácidos (GS)₇ (SEQ ID NO: 121), G(GS)₆ (SEQ ID NO: 122) y G(GS)₇G (SEQ ID NO: 123). Otros enlazadores contienen ácido glutámico e incluyen, por ejemplo, (GSE)₅ (SEQ ID NO: 124) y GGSEGGSE (SEQ ID NO: 125). Otros ejemplos de enlazadores de glicina-serina incluyen (GS)₄ (SEQ ID NO: 126), (GGGS)₇ (SEQ ID NO: 127), (GGGS)₅ (SEQ ID NO: 128) y (GGGS)₃G (SEQ ID NO: 129). En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador basado en glicina-prolina. Estos enlazadores comprenden restos de glicina y prolina y pueden tener una longitud de entre 3 y 30, 10 y 30 y 3 y 20 aminoácidos. Como ejemplos se incluyen enlazadores que tienen una secuencia de aminoácidos (GP)₃G (SEQ ID NO: 130), (GP)₅G (SEQ ID NO: 131) y GPG. En determinadas realizaciones, el enlazador puede ser un enlazador basado en prolina-alanina que tiene una longitud entre 3 y 30, 10 y 30 y 3 y 20 aminoácidos. Como ejemplos de enlazadores basados en prolina-alanina se incluyen, por ejemplo, (PA)₃ (SEQ ID NO: 132), (PA)₆ (SEQ ID NO: 133) y (PA)₉ (SEQ ID NO: 134). Se contempla, que la longitud óptima del enlazador y la composición de aminoácidos pueden determinarse mediante experimentación habitual por métodos bien conocidos en la materia. En realizaciones ilustrativas, el enlazador no contiene ningún par Asp-Lys (DK).

En determinadas realizaciones, el enlazador tiene la secuencia de aminoácidos PSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 135), PSPEPPTPEPPSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 136), PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 137) o PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 138). Generalmente un enlazador puede comprender la secuencia de aminoácidos (PSPEPPTPEP)_n (SEQ ID NO: 144), en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1-5 o 1-10. En determinadas realizaciones, el enlazador tiene la secuencia de aminoácidos EEEEEDE (SEQ ID NO: 139), EEEEEEEEEDE (SEQ ID NO: 140), EEEEEEEEEDEEEEEEEEEDE (SEQ ID NO: 141), EEEEEEEEEDEEEEEEEEEDEEEEEEEEEDE (SEQ ID NO: 142). Generalmente, un enlazador puede comprender la secuencia (EEEEDE)_nE (SEQ ID NO: 145), en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1-5 o 1-10. En determinadas realizaciones, el enlazador tiene la secuencia de aminoácidos RGGEEKKKEKEKEEQEERETKTP (SEQ ID NO: 143). Dichos enlazadores pueden usarse para conectar la adnectina de unión a HSA con otro polipéptido (por ejemplo, otra adnectina). A continuación se muestran ejemplos de usos del enlazador PSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 135) (la "G" después de YRTP en la SEQ ID NO: 74 y de TPEP en la SEQ ID NO: 75, es opcional).

40 Adnectina de extremo N conectada a polipéptido de extremo C:
...NYRTPG**PSPEPPTPEP**-polipéptido (SEQ ID NO: 146)

45 Polipéptido de extremo N conectado a adnectina de extremo C:
polipéptido-**PSPEPPTPEP**GVSDV... (SEQ ID NO: 147)

En determinadas realizaciones, la adnectina multivalente es una adnectina en tándem que comprende un primer dominio ¹⁰F_n que se une a HSA (por ejemplo, una adnectina PKE3) y un segundo dominio ¹⁰F_n que se une a una diana específica. Las adnectinas en tándem pueden tener la configuración Adnectina-X de unión a HSA y Adnectina de unión a X-HSA, en donde X es un dominio ¹⁰F_n específico de diana. El experto en la técnica estaría familiarizado con los métodos para analizar la actividad funcional y evaluar las propiedades biofísicas de dichas moléculas de adnectina en tándem.

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende un primer décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3) y un segundo dominio ¹⁰F_n3, en donde el primer dominio ¹⁰F_n3 se une a HSA y comprende los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG, en donde el bucle CD tiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos y el bucle FG tiene, opcionalmente, 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, en relación con los bucles CD y FG de un dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23 (por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos en los bucles CD y/o FG descritos anteriormente en el apartado A), y en donde la semivida en suero de un residuo (por ejemplo, polipéptido) que está ligado al dominio ¹⁰F_n3 se prolonga en relación con la del residuo que no está ligado al dominio ¹⁰F_n3. Un "primer" dominio y un segundo "dominio" pueden estar en la orientación de extremo N a extremo C o de extremo C a extremo N.

En determinadas realizaciones, la relación entre la velocidad de disociación del primer dominio ¹⁰F_n3 y la velocidad de disociación del dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23 es de al menos aproximadamente 2, tal como de al menos aproximadamente 3, al menos de aproximadamente 4, al menos de aproximadamente 5, al menos de aproximadamente 6, al menos de aproximadamente 7, al menos de

aproximadamente 8, al menos de aproximadamente 9, al menos de aproximadamente 10, al menos de aproximadamente 15, al menos de aproximadamente 20, al menos de aproximadamente 25, al menos de aproximadamente 30, al menos de aproximadamente 35, al menos de aproximadamente 40, al menos de aproximadamente 45, al menos de aproximadamente 50, al menos de aproximadamente 75, al menos aproximadamente 100 o mayor. En determinadas realizaciones, la relación es de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29, aproximadamente 30, aproximadamente 31, aproximadamente 32, aproximadamente 33, aproximadamente 34, aproximadamente 35, aproximadamente 36, aproximadamente 37, aproximadamente 38, aproximadamente 39, aproximadamente 40, aproximadamente 41, aproximadamente 42, aproximadamente 43, aproximadamente 44, aproximadamente 45, aproximadamente 46, aproximadamente 47, aproximadamente 48, aproximadamente 49, aproximadamente 50, aproximadamente 51, aproximadamente 52, aproximadamente 53, aproximadamente 54, aproximadamente 55, aproximadamente 56, aproximadamente 57, aproximadamente 58, aproximadamente 59 o aproximadamente 60. En determinadas realizaciones, la relación es 1,0, 1,1, 1,2, 3,3, 3,9, 4,0, 4,1, 4,8, 5,0, 5,6, 6,5, 6,6, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 28, 28,9, 30,3, 32,0, 34,0, 34,3, 37,3, 50,0, 52, 52,7, 53,0, 56,0 o 79,4. En determinadas realizaciones, la relación está en el intervalo de 2-100, 2-75, 2-50, 2-45, 2-40, 2-35, 2-30, 2-25, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 5-100, 5-75, 5-50, 5-45, 5-40, 5-35, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-100, 10-75, 10-50, 10-45, 10-40, 10-35, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 20-100, 20-75, 20-50, 20-45, 20-40, 20-35, 20-30, 20-25, 30-100, 30-75, 30-50, 30-45, 30-40, 30-35, 40-100, 40-75, 40-50, 40-45, 50-100, 50-75, 60-100, 60-75, 70-100, 70-75, 80-100, 80-90, 90-100, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 25-40, 30-40, 50-55, 75-85, 1-80, 1-70, 1-60, 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-10 o 1-5.

En determinadas realizaciones, el primer dominio ¹⁰Fn3 se une a HSA con una velocidad de asociación (k_a) que está dentro de un orden de magnitud (es decir, dentro de 10 veces) del de la k_a del dominio ¹⁰Fn3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23.

En determinadas realizaciones, por ejemplo, de adnectinas multivalentes, el primer dominio ¹⁰Fn3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 30-34, 36-40, 42-46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 65-68, 70, 71, 73-76, 78, 79, 81-84, 86, 87, 89-98, 100-109 y 111-118, o difiere de ellas a lo sumo en 1, 1-2, 1-5, 1-10 o 1-20 aminoácidos (por ejemplo, deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservativas de aminoácidos), tal como una o más de las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento).

En determinadas realizaciones, el primer dominio ¹⁰Fn3 comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEC ID NO: 30-34, 36-40, 42-46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 65-68, 70, 71, 73-76, 78, 79, 81-84, 86, 87, 89-98, 100-109 y 111-118.

En algunas realizaciones, la adnectina multivalente comprende un segundo dominio ¹⁰Fn3 que es un dominio ¹⁰Fn3 que se une específicamente a una proteína diana distinta de HSA, por ejemplo, una proteína diana (por ejemplo, residuo terapéutico) descrita más adelante en el apartado D.

En un aspecto, las adnectinas en tándem de unión a HSA descritas en el presente documento, se unen a HSA con una K_D menor de 3 μ M, 2,5 μ M, 2 μ M, 1,5 μ M, 1 μ M, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, 100 pM, 50 pM o 10 pM. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, 0,1 nM a 100 nM, 0,1 μ M a 1 μ M, 0,5 nM a 50 nM, 0,5 nM a 100 nM, 0,5 μ M a 1 μ M, 1 nM a 50 nM, 1 nM a 100 nM, 1 μ M a 1 μ M, 50 μ M a 3 μ M, 50 μ M a 2 μ M, 50 μ M a 1 μ M, 50 nM a 500 nM, 50 nM a 100 nM, 50 nM a 100 nM, 100 μ M a 3 μ M, 100 μ M a 2 μ M, 100 μ M a 1 μ M, 250 μ M a 3 μ M, 250 μ M a 2 μ M, 250 μ M a 1 μ M, 250 nM a 500 nM, 500 μ M a 3 μ M, 500 μ M a 2 μ M, 500 μ M a 1 μ M, 1 μ M a 3 μ M o 1 μ M a 2 μ M.

En determinadas realizaciones, las adnectinas en tándem de unión a HSA descritas en el presente documento, también pueden unirse a seroalbúmina de uno o más de mono cinomolgo, mono *Rhesus*, rata o ratón.

En determinadas realizaciones, las adnectinas en tándem de unión a HSA descritas en el presente documento, se unen a seroalbúmina de mono *Rhesus* (RhSA) o a seroalbúmina de mono cinomolgo (CySA) con una K_D menor de 3 μ M, 2,5 μ M, 2 μ M, 1,5 μ M, 1 μ M, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, 100 pM, 50 pM o 10 pM. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, 0,1 nM a 100 nM, 0,1 μ M a 1 μ M, 0,5 nM a 50 nM, 0,5 nM a 100 nM, 0,5 μ M a 1 μ M, 1 nM a 50 nM, 1 nM a 100 nM, 1 μ M a 1 μ M, 50 μ M a 3 μ M, 50 μ M a 2 μ M, 50 μ M a 1 μ M, 50 nM a 500 nM, 50 nM a 100 nM, 100 μ M a 3 μ M, 100 μ M a 2 μ M, 100 μ M a 1 μ M, 250 μ M a 3 μ M, 250 μ M a 2 μ M, 250 μ M a 1 μ M, 250 nM a 500 nM, 500 μ M a 3 μ M, 500 μ M a 2 μ M, 500 μ M a 1 μ M, 1 μ M a 3 μ M o 1 μ M a 2 μ M.

En determinadas realizaciones, las adnectinas en tándem de unión a HSA descritas en el presente documento, se

unen a seroalbúmina de mono *Rhesus* (RhSA), seroalbúmina de mono cinomolgo (CySA) y seroalbúmina de ratón (MSA) con una K_D menor 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. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, 0,1 nM a 100 nM, 0,1 μ M a 1 μ M, 0,5 nM a 50 nM, 0,5 nM a 100 nM, 0,5 μ M a 1 μ M, 1 nM a 50 nM, 1 nM a 100 nM, 1 μ M a 1 μ M, 50 μ M a 3 μ M, 50 μ M a 2 μ M, 50 μ M a 1 μ M, 50 nM a 500 nM, 50 nM a 100 nM, 100 μ M a 3 μ M, 100 μ M a 2 μ M, 100 μ M a 1 μ M, 250 μ M a 3 μ M, 250 μ M a 2 μ M, 250 μ M a 1 μ M, 250 nM a 500 nM, 500 μ M a 3 μ M, 500 μ M a 2 μ M, 500 μ M a 1 μ M, 1 μ M a 3 μ M o 1 μ M a 2 μ M.

En determinadas realizaciones, las adnectinas en tándem de unión a HSA descritas en el presente documento, se unen a seroalbúmina de mono *Rhesus* (RhSA), seroalbúmina de mono cinomolgo (CySA), seroalbúmina de ratón (MSA) y seroalbúmina de rata (RSA) con una K_D menor 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. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, 0,1 nM a 100 nM, 0,1 μ M a 1 μ M, 0,5 nM a 50 nM, 0,5 nM a 100 nM, 0,5 μ M a 1 μ M, 1 nM a 50 nM, 1 nM a 100 nM, 1 μ M a 1 μ M, 50 μ M a 3 μ M, 50 μ M a 2 μ M, 50 μ M a 1 μ M, 50 nM a 500 nM, 50 nM a 100 nM, 100 μ M a 3 μ M, 100 μ M a 2 μ M, 100 μ M a 1 μ M, 250 μ M a 3 μ M, 250 μ M a 2 μ M, 250 μ M a 1 μ M, 250 nM a 500 nM, 500 μ M a 3 μ M, 500 μ M a 2 μ M, 500 μ M a 1 μ M, 1 μ M a 3 μ M o 1 μ M a 2 μ M.

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

En determinadas realizaciones, las adnectinas en tándem de unión a HSA descritas en el presente documento, se unen al dominio I-II de HSA.

En determinadas realizaciones, las adnectinas en tándem de unión a HSA descritas en el presente documento, tienen una semivida en suero en presencia de HSA, seroalbúmina de mono cinomolgo, seroalbúmina de mono *Rhesus*, seroalbúmina de ratón y/o seroalbúmina de rata, de al menos 1 hora, 2 horas, 5 horas, 10 horas, 20 horas, 30 horas, 40 horas, 50 horas, 60 horas, 70 horas, 80 horas, 90 horas, 100 horas, 150 horas, 200 horas o de al menos aproximadamente 300 horas.

En determinadas realizaciones, las adnectinas en tándem de unión a HSA descritas en el presente documento, tienen una semivida en suero en presencia de HSA, seroalbúmina de mono cinomolgo, seroalbúmina de mono *Rhesus*, seroalbúmina de ratón y/o seroalbúmina de rata de 1-300 horas, tal como de 1-250 horas, 1-200 horas, 1-150 horas, 1-100 horas, 1-90 horas, 1-80 horas, 1-70 horas, 1-60 horas, 1-50 horas, 1-40 horas, 1-30 horas, 1-20 horas, 1-10 horas, 1-5 horas, 5-300 horas, 10-300 horas, 20-300 horas, 30-300 horas, 40-300 horas, 50-300 horas, 60-300 horas, 70-300 horas, 80-300 horas, 90-300 horas, 100-300 horas, 150-300 horas, 200-300 horas, 250-300 horas, 5-250 horas, 10-200 horas, 50-150 horas u 80-120 horas.

En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la adnectina compañera en la adnectina en tándem de unión a HSA, se incrementa en relación con la semivida en suero de la adnectina compañera cuando no se conjuga con la adnectina de unión a HSA.

En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la adnectina del tándem de unión a HSA es al menos 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500, 1800, 1900, 2000, 2500, o 3000 % más larga en relación con la semivida en suero de la adnectina compañera cuando no se fusiona con la adnectina de unión a HSA.

En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la adnectina en tándem de unión a HSA es 20-3 000 %, tal como 40-3 000 %, 60-3 000 %, 80-3 000 %, 100-3 000 %, 120-3 000 %, 150-3 000 %, 180-3 000 %, 200-3 000 %, 400-3 000 %, 600-3 000 %, 800-3 000 %, 1 000-3 000 %, 1 200-3 000 %, 1 500-3 000 %, 1 800-3 000 %, 1 900-3 000 %, 2 000-3 000 %, 2 500-3 000 %, 20-2 500 %, 20-2 000 %, 20-1 900 %, 20-1 800 %, 20-1 500 %, 20-1 200 %, 20-1 000 %, 20-800 %, 20-600 %, 20-400 %, 20-200 %, 20-180 %, 20-150 %, 20-120 %, 20-100 %, 20-80 %, 20-60 %, 20-40 %, 50-2 500 %, 100-2 000 %, 150-1 500 %, 200-1 000 %, 400-800 % o 500-700 % más larga en relación con la semivida en suero de la adnectina compañera cuando no se fusiona con la adnectina de unión a HSA.

En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la adnectina en tándem de unión a HSA es al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 10 veces, 12 veces, 13 veces, 15 veces, 17 veces, 20 veces, 22 veces, 25 veces, 27 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces o 50 veces mayor que la semivida en suero de la adnectina compañera cuando no se fusiona con la adnectina de unión a HSA.

En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la adnectina en tándem de unión a HSA es 1,5-50 veces, tal como 1,5-40 veces, 1,5-35 veces, 1,5-30 veces, 1,5-27 veces, 1,5-25 veces, 1,5-22 veces, 1,5-20 veces, 1,5-17 veces, 1,5-15 veces, 1,5-13 veces, 1,5-12 veces, 1,5-10 veces, 1,5-9 veces, 1,5-8 veces, 1,5-7 veces, 1,5-6 veces, 1,5-5 veces, 1,5-4,5 veces, 1,5-4 veces, 1,5-3,5 veces, 1,5-3 veces, 1,5-2,5 veces, 1,5-2 veces, 2-50 veces, 2,5-50 veces, 3-50 veces, 3,5-50 veces, 4-50 veces, 4,5-50 veces, 5-50 veces, 6-50 veces, 7-50 veces, 8-50 veces, 10-50

veces, 12-50 veces, 13-50 veces, 15-50 veces, 17-50 veces, 20-50 veces, 22-50 veces, 25-50 veces, 27-50 veces, 30-50 veces, 40-50 veces, 2-40 veces, 5-35 veces, 10-20 veces o 10-15 veces mayor que la semivida en suero de la adnectina compañera cuando no se fusiona con la adnectina de unión a HSA.

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

D. Conjugados de adnectinas de unión a HSA

20 Determinados aspectos de la presente invención proporcionan conjugados que comprenden un dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA (por ejemplo, como se describe anteriormente en los apartados A y B) y al menos un residuo adicional (por ejemplo, un residuo terapéutico). El residuo adicional puede ser útil para cualquier finalidad diagnóstica, de obtención de imágenes o terapéutica.

25 En algunas realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA se fusiona con un segundo residuo que es una molécula orgánica pequeña, un ácido nucleico, un péptido o una proteína.

30 En determinadas realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA se fusiona con un segundo residuo terapéutico que se dirige a receptores, ligandos de receptores, proteínas de cubierta vírica, proteínas del sistema inmunitario, hormonas, enzimas, antígenos o proteínas de señalización celular. La fusión puede formarse uniendo el segundo residuo con cualquiera de los extremos del dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA, es decir, las disposiciones molécula terapéutica-dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA o dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA-molécula terapéutica.

35 En determinadas realizaciones, la semivida en suero de un residuo (por ejemplo, polipéptido) que está ligado al dominio ¹⁰F_n3 se prolonga en relación con la del residuo que no está ligado al dominio ¹⁰F_n3. En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la fusión del dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA es al menos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 180, 200, 400, 600, 800, 1 000, 1 200, 1 500, 1 800, 1 900, 2 000, 2 500 o 3 000 % más larga en relación con la semivida en suero del residuo cuando no se fusiona con el dominio ¹⁰F_n3. En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la fusión del dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA es 5-3 000 %, tal como 10-3 000 %, 15-3 000 %, 20-3 000 %, 30-3 000 %, 40-3 000 %, 50-3 000 %, 60-3 000 %, 70-3 000 %, 80-3 000 %, 90-3 000 %, 100-3 000 %, 120-3 000 %, 150-3 000 %, 180-3 000 %, 200-3 000 %, 400-3 000 %, 600-3 000 %, 800-3 000 %, 1 000-3 000 %, 1 200-3 000 %, 1 500-3 000 %, 1 800-3 000 %, 1 900-3 000 %, 2 000-3 000 %, 2 500-3 000 %, 20-2 500 %, 20-2 000 %, 20-1 900 %, 20-1 800 %, 20-1 500 %, 20-1 200 %, 20-1 000 %, 20-800 %, 20-600 %, 20-400 %, 20-200 %, 20-180 %, 20-150 %, 20-120 %, 20-100 %, 20-80 %, 20-60 %, 20-40 %, 10-2 000 %, 10-1 900 %, 10-1 800 %, 10-1 500 %, 10-1 200 %, 10-1 000 %, 10-800 %, 10-600 %, 10-400 %, 10-200 %, 10-180 %, 10-150 %, 10-120 %, 10-100 %, 10-80 %, 10-60 %, 10-40 %, 10-20 %, 5-2 000 %, 5-1 900 %, 5-1 800 %, 5-1 500 %, 5-1 200 %, 5-1 000 %, 5-800 %, 5-600 %, 5-400 %, 5-200 %, 5-180 %, 5-150 %, 5-120 %, 5-100 %, 5-80 %, 5-60 %, 5-40 %, 5-20 %, 5-15 %, 5-10 %, 50-2 500 %, 100-2 000 %, 150-1 500 %, 200-1 000 %, 400-800 % o 500-700 % más larga en relación con la semivida en suero del residuo cuando no se fusiona con el dominio ¹⁰F_n3.

55 En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la fusión del dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA es 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 10 veces, 12 veces, 13 veces, 15 veces, 17 veces, 20 veces, 22 veces, 25 veces, 27 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces o 50 veces mayor que la semivida en suero del residuo cuando no se fusiona con el dominio ¹⁰F_n3.

60 En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la fusión del dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA es 1,5-50 veces, tal como 1,5-40 veces, 1,5-35 veces, 1,5-30 veces, 1,5-27 veces, 1,5-25 veces, 1,5-22 veces, 1,5-20 veces, 1,5-17 veces, 1,5-15 veces, 1,5-13 veces, 1,5-12 veces, 1,5-10 veces, 1,5-9 veces, 1,5-8 veces, 1,5-7 veces, 1,5-6 veces, 1,5-5 veces, 1,5-4,5 veces, 1,5-4 veces, 1,5-3,5 veces, 1,5-3 veces, 1,5-2,5 veces, 1,5-2 veces, 2-50 veces, 2,5-50 veces, 3-50 veces, 3,5-50 veces, 4-50 veces, 4,5-50 veces, 5-50 veces, 6-50 veces, 7-50 veces, 8-50 veces, 10-50 veces, 12-50 veces, 13-50 veces, 15-50 veces, 17-50 veces, 20-50 veces, 22-50 veces, 25-50 veces, 27-50 veces, 30-50 veces, 40-50 veces, 2-40 veces, 5-35 veces, 10-20 veces o 10-15 veces mayor que la semivida en suero del residuo cuando no se fusiona con el dominio ¹⁰F_n3.

- En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la fusión del dominio ¹⁰Fn3 de unión a HSA es de al menos 2 horas, 2,5 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 15 horas, 20 horas, 25 horas, 30 horas, 35 horas, 40 horas, 50 horas, 60 horas, 70 horas, 80 horas, 90 horas, 100 horas, 110 horas, 120 horas, 130 horas, 135 horas, 140 horas, 150 horas, 160 horas o 200 horas. En determinadas realizaciones, la semivida en suero de la fusión de la adnectina de unión a HSA es de 2-200 horas, 2,5-200 horas, 3-200 horas, 4-200 horas, 5-200 horas, 6-200 horas, 7-200 horas, 8-200 horas, 9-200 horas, 10-200 horas, 15-200 horas, 20-200 horas, 25-200 horas, 30-200 horas, 35-200 horas, 40-200 horas, 50-200 horas, 60-200 horas, 70-200 horas, 80-200 horas, 90-200 horas, 100-200 horas, 125-200 horas, 150-200 horas, 175-200 horas, 190-200 horas, 2-190 horas, 2-175 horas, 2-150 horas, 2-125 horas, 2-100 horas, 2-90 horas, 2-80 horas, 2-70 horas, 2-60 horas, 2-50 horas, 2-40 horas, 2-35 horas, 2-30 horas, 2-25 horas, 2-20 horas, 2-15 horas, 2-10 horas, 2-9 horas, 2-8 horas, 2-7 horas, 2-6 horas, 2-5 horas, 2-4 horas, 2-3 horas, 5-175 horas, 10-150 horas, 15-125 horas, 20-100 horas, 25-75 horas o 30-60 horas.
- En determinadas realizaciones, las proteínas de fusión de dominio ¹⁰Fn3 de unión a HSA se unen a HSA con una K_D menor de 3 μM, 2,5 μM, 2 μM, 1,5 μM, 1 μM, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, 100 pM, 50 pM o 10 pM. La K_D puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 nM a 50 nM, 0,1 nM a 100 nM, 0,1 μM a 1 μM, 0,5 nM a 50 nM, 0,5 nM a 100 nM, 0,5 μM a 1 μM, 1 nM a 50 nM, 1 nM a 100 nM o 1 nM a 1 μM.
- En determinadas realizaciones, un residuo terapéutico puede estar ligado directa o indirectamente a un dominio ¹⁰Fn3 de unión a HSA, por ejemplo, a través de un enlazador polimérico, como se describe en el presente documento (por ejemplo, un enlazador como se describe anteriormente en el apartado C). Los enlazadores poliméricos pueden usarse para variar de manera óptima la distancia entre cada componente de la fusión para crear una fusión de proteínas con una o más de las siguientes características: 1) impedimento estérico reducido o aumentado de la unión de uno o más dominios de proteínas cuando se unen a una proteína de interés, 2) mayor estabilidad o solubilidad de las proteínas, 3) disminución de la agregación de proteínas y 4) aumento global de la avidez o afinidad de la proteína.
- Cualquiera de los enlazadores para unir dos adnectinas, por ejemplo, los descritos en el apartado C del presente documento, puede usarse para unir una adnectina con un residuo heterólogo, tal como un polipéptido.
- En determinadas realizaciones, un residuo, por ejemplo, un polipéptido, se une a una adnectina de unión a HSA a través de un enlazador polipeptídico que tiene un sitio de proteasa que es escindible por una proteasa en la sangre o el tejido diana. Dichas realizaciones pueden usarse para liberar una proteína terapéutica para mejorar el suministro o las propiedades terapéuticas o para obtener una producción más eficaz.
- En el extremo C de un dominio ¹⁰Fn3 entre el dominio ¹⁰Fn3 y el enlazador polipeptídico, se pueden introducir enlazadores o espaciadores adicionales.
- En determinadas realizaciones, un residuo terapéutico está unido a un dominio ¹⁰Fn3 de unión a HSA a través de un polímero biocompatible, tal como un azúcar polimérico. El azúcar polimérico puede incluir un sitio de escisión enzimática que es escindible por una enzima en la sangre o el tejido diana. Dichas realizaciones pueden usarse para liberar una proteína terapéutica para mejorar el suministro o las propiedades terapéuticas o para obtener una producción más eficaz.
- Las moléculas de fusión de dominio ¹⁰Fn3 de unión a HSA descritas en el presente documento, son útiles para aumentar la semivida de un residuo terapéutico creando una fusión entre el residuo terapéutico y el dominio ¹⁰Fn3 de unión a HSA. Dichas moléculas de fusión pueden usarse para tratar afecciones que responden a la actividad biológica del residuo terapéutico contenido en la fusión. Por tanto, en el presente documento se proporciona el uso de molécula de fusión de dominio ¹⁰Fn3 de unión a HSA en enfermedades causadas por la regulación incorrecta de cualquiera de las siguientes proteínas o moléculas.
- En determinadas realizaciones, el residuo terapéutico que está ligado (ya sea en el extremo C o en el extremo N) al dominio ¹⁰Fn3 de unión a HSA, es VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3, Her-1, Her-2, Her-3, EGF-I, EGF-2, EGF-3, Alpha3, cMet, ICOS, CD40L, LFA-I, c-Met, ICOS, LFA-I, IL-6, B7.1, W1.2, OX40, IL-1b, TACI, IgE, BAFF o BLys, TPO-R, CD19, CD20, CD22, CD33, CD28, IL-I-R1, TNF-alfa, TRAIL-R1, receptor de complemento 1, FGFA, osteopontina, vitronectina, efrina A1-A5, efrina B1-B3, alfa-2-macroglobulina, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CXCL16, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, PDGF, TGFb, GMCSF, SCF, p40 (IL12/IL23), IL1b, IL1a, IL1ra, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12, IL15, IL23, Fas, FasL, ligando Flt3, 41BB, ACE, ACE-2, KGF, FGF-7, SCF, netrina 1,2, IFNa, b, g, caspasa 2,3,7,8,10, ADAM S1,S5,8,9,15,TS1,TS5; adiponectina, ALCAM, ALK-I, APRIL, anexina V, angiogenina, anfirregulina, angiopoyetina 1,2,4, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1, B7-H2, B7-H3, Bcl-2, BACE-I, BAK, BCAM, BDNF, bNGF, bECGF, BMP2,3,4,5,6,7,8; CRP, cadherina 6, 8, 11; cathepsina A, B, C, D, E, L, S, V, X; CD1 1a/IFA-1, LFA-3, GP2b3a, receptor de GH, proteína F del RSV, IL-23 (p40, p19), IL-12, CD80, CD86, CD28, CTLA-4, alfa4-beta1, alfa4-beta7, TNF/infotoxina, IgE, CD3, CD20, IL-6, IL-6R, BLYS/BAFF, IL-2R, HER2, EGFR, CD33, CD52, digoxina, Rho (D), varicela, hepatitis, CMV, tétanos, variolovacuna, antiveneno, *Botulinum*, Trail-RI, Trail-R2,

cMet, familia de TNF-R, tal como LA NGF-R, CD27, CD30, CD40, CD95, receptor de linfotóxina a/b, Wsl-I, TL1A/TNFSF15, BAFF, BAFF-R/TNFRSF13C, TRAIL R2/TNFRSF10B, TRAIL R2/TNFRSF10B, Fas/TNFRSF6 CD27/TNFRSF7, DR3/TNFRSF25, HVEM/TNFRSF14, TROY/TNFRSF19, ligando CD40/TNFSF5, BCMA/TNFRSF17, CD30/TNFRSF8, LIGHT/TNFSF14, 4-1BB/TNFRSF9, CD40/TNFRSF5, GITR/[Gamma]TNFRSF 18, Osteoprotegerina/TNFRSF1 IB, RANK/TNFRSF1 IA, TRAIL R3/TNFRSF10C, TRAIL/TNFSF10, TRANCE/RANK L/ligando TNFSF11,4-1BB/TNFSF9, TWEAK/TNFSF12, ligando CD40/TNFSF5, ligando Fas/TNFSF6, RELT/TNFRSF19L, APRIL/TNFSF13, DcR3/TNFRSF6B, TNF RI/TNFRSF1A, TRAIL R1/TNFRSF10A, TRAIL R4/TNFRSF10D, ligando CD30/TNFSF8, ligando de GITR/TNFSF18, TNFSF18, TACI/TNFRSF13B, NGF R/TNFRSF16, ligando OX40/TNFSF4, TRAIL R2/TNFRSF10B, TRAIL R3/TNFRSF10C, TWEAK R/TNFRSF12, 10 BAFF/BLyS/TNFSF13, DR6/TNFRSF21, TNF-alfa/TNFSF1 A, Pro-TNF-alfa/TNFSF1A, linfotóxina beta R/TNFRSF3, quimera de linfotóxina beta R (LTbR)/Fc, TNF RI/TNFRSF1A, TNF-beta/TNFSF1 B, PGRP-S, TNF RI/TNFRSF1A, TNF RII/TNFRSF1B, EDA-A2, TNF-alfa/TNFSF1A, EDAR, XEDAR, TNF RI/TNFRSF1A.

En determinadas realizaciones, el residuo terapéutico que está ligado (ya sea en el extremo C o en el extremo N) al dominio ¹⁰Fn3 de unión a HSA es cualquiera de las siguientes proteínas o proteínas de unión de las mismas: 4EBP1, 14-3-3 zeta, 53BP1, 2B4/SLAMF4, CCL21/6CKine, 4-1BB/TNFRSF9, 8D6A, ligando 4-1BB/TNFSF9, 8-oxo-dG, 4-amino-1,8-naftalimida, A2B5, aminopeptidasa LRAP/ERAP2, A33, aminopeptidasa N/ANPEP, Aag, aminopeptidasa P2/XPNPEP2, ABCG2, aminopeptidasa P1/XPNPEP1, ACE, aminopeptidasa PILS/ARTS1, ACE-2, amnionless, actina, anfirregulina, beta actina, AMPK alfa 1/2, activina A, AMPK alfa 1, activina AB, AMPK alfa 2, activina B, 20 AMPK beta 1, activina C, AMPK-beta 2, activina RIA/ALK-2, andrógeno R/NR3C4, activina RIB/ALK-4, angiogenina, activina RIIA, angiopoyetina 1, activina RIIIB, angiopoyetina 2, ADAMS, angiopoyetina 3, ADAM9, angiopoyetina 4, ADAM10, angiopoyetina tipo 1, ADAM12, angiopoyetina tipo-2, ADAM15, angiopoyetina tipo 3, TACE/ADAM17, angiopoyetina tipo 4, ADAM19, angiopoyetina tipo 7/CDT6, ADAM33, angiostatina, ADAMTS4, anexina A1/anexina I, ADAMTS5, anexina A7, ADAMTS1, anexina A10, ADAMTSL-1/punctina, anexina V, adiponectina/Acrp30, ANP, 25 AEBSF, Sitio AP, agrecano, APAF-I, agrina, APC, AgRP, APE, AGTR-2, APJ, AIF, APLP-I, Akt, APLP-2, Akt1, apolipoproteína A1, Akt2, apolipoproteína B, Akt3, APP, seroalbúmina, APRIL/TNFSF13, ALCAM, ARC, ALK-I, artemina, ALK-7, arilsulfatasa AJARSA, fosfatasa alcalina, ASAH2/amidohidrolasa-2 N-acilesfingosina, alfa 2u-globulina, ASC, alfa-1-glucoproteína ácida, ASGR1, alfafetoproteína, ASK1, ALS, ATM, ATRIP ameloblástico, AMICA/JAML, aurora A, AMIGO, aurora B, AMIGO2, Axina 1, AMIGO3, Axl, aminoacilasa/ACY1, 30 azurocidina/CAP37/HBP, aminopeptidasa A/ENPEP, B4GALT1, BIM, B7-1/CD80, 6-Biotina-17-NAD, B7-2/CD86, BLAME/SLAMF8, B7-H1/PD-L1, CXCL13/BLC/BCA-1, B7-H2, BLIMP1, B7-H3, Bik, B7-H4, BMI-I, BACE-I, BMP-1/PCP, BACE-2, BMP-2, Bad, BMP-3, BAFF/TNFSF13B, BMP-3b/GDF-10, BAFF R/TNFRSF 13C, BMP-4, Bag-1, BMP-5, BAK, BMP-6, BAMBI/NMA, BMP-7, BARD 1, BMP-8, Bax, BMP-9, BCAM, BMP-10, Bcl-10, BMP-15/GDF-9B, Bcl-2, BMPR-IA/ALK-3, proteína A1 relacionada con Bcl-2, BMPR-IB/ALK-6, Bcl-w, BMPR-II, Bcl-x, BNIP3L, Bcl-xL, BOC, BCMA/TNFRSF17, BOK, BDNF, BPDE, benzamida, Brachyury, cadena beta común, B-Raf, beta IG-H3, CXCL14/BRAK, betacelululina, BRCA1, beta-defensina 2, BRCA2, BID, BTLA, biglicano, Bub-1, proteína 35 exterminadora similar a Bik, c-jun, CD90/Thyl, c-Rel, CD94, CCL6/C10, CD97, Clq R1/CD93, CD151, ClqTNF1, CD160, ClqTNF4, CD163, ClqTNF5, CD164, componente del complemento C1r, CD200, componente del complemento C1s, CD200 R1, componente del complemento C2, CD229/SLAMF3, componente del complemento C3a, CD23/Fc epsilon R11, componente del complemento C3d, CD2F-10/SLAMF9, componente del complemento C5a, CD5L, cadherina-4/R-cadherina, CD69, cadherina-6, CDC2, cadherina-8, CDC25A, cadherina-11, CDC25B, cadherina-12, CDCP1, cadherina-13, CDO, cadherina-17, CDX4, E-cadherina, CEACAM-1/CD66a, N-cadherina, CEACAM-6, P-cadherina, cerberus 1, VE-cadherina, CFTR, calbindina D, cGMP, calcineurina A, quemerina R23, calcineurina B, quemerina, calreticulina 2, envases muestreadores de quimiocinas, CaM cinasa II, quitinasa 3 tipo 1, 45 cAMP, quitotriosidasa/CHIT1, R1 canabinoideo, Chk1, R2 canabinoideo/CB2/CNR2, Chk2, CAR/NR113, CHL-1/11CAM-2, anhidrasa carbónica I, colina acetil transferasa/CbAT, anhidrasa carbónica II, condrolectina, anhidrasa carbónica III, cordina, anhidrasa carbónica IV, cordina tipo 1, anhidrasa carbónica VA, cordina tipo 2, anhidrasa carbónica VB, CINC-I, anhidrasa carbónica VI, CINC-2, anhidrasa carbónica VII, CINC-3, anhidrasa carbónica VIII, claspina, anhidrasa carbónica IX, claudina 6, anhidrasa carbónica X, CLC, anhidrasa carbónica XII, CLEC-I, 50 anhidrasa carbónica XIII, CLEC-2, anhidrasa carbónica XIV, CLECSF 13 / CLEC4F, carboximetil lisina, CLECSF8, carboxipeptidasa A1/CPA1, CLF-I, carboxipeptidasa A2, CL-P1/COLEC12, carboxipeptidasa A4, clusterina; carboxipeptidasa B1, clusterina tipo 1, carboxipeptidasa E/CPE, CMG-2, carboxipeptidasa X1, CMV UL146, cardiotrofina 1, CMV UL147, carnosina dipeptidasa 1, CNP, Caronte, CNTF, CART, CNTF R alfa, caspasa, factor de coagulación II/trombina, caspasa 1, factor de coagulación I11/factor tisular, caspasa 2, factor de coagulación VII, caspasa 3, factor de coagulación X, caspasa 4, factor de coagulación XI, caspasa 6, factor de coagulación XIV/proteína C, caspasa 7, COCO, caspasa 8, cohesina, caspasa-9, colágeno I, caspasa 10, colágeno II, caspasa 12, colágeno IV, caspasa 13, cadena gamma común/IL-2 R gamma, inhibidores peptídicos de caspasa, COMP/Trombospondina 5, catalasa, componente del complemento C1rLP, beta catenina, componente del complemento ClqA, catepsina 1, componente del complemento ClqC, catepsina 3, factor D del complemento, 60 catepsina 6, factor del complemento I, catepsina A, MASP3 del complemento, catepsina B, conexina 43, catepsina C/DPPI, contactina 1, catepsina D, contactina 2/TAG1, catepsina E, contactina 4, catepsina F, contactina 5, catepsina H, Corina, catepsina L, cornulina, catepsina O, CORS26/ClqTNF,3, catepsina S, células madre corticales de rata, catepsina V, cortisol, catepsina XITJ?, COUP-TF I/NR2F1, CBP, COUP-TF II/NR2F2, CCI, COX-I, CCK-A R, COX-2, CCL28, CRACC/SLAMF7, CCR1, proteína reactiva con C, CCR2, creatina cinasa, músculo/CKMM, CCR3, creatinina, CCR4, CREB, CCR5, CREG, CCR6, CRELD1, CCR7, CRELD2, CCR8, CRHBP, CCR9, CRHR-I, CCR10, CRIM1, CD155/PVR, Cripto, CD2, CRISP-2, CD3, CRISP-3, CD4, Crossveinless-2, CD4+/45RA-, CRTAM,

CD4+/45RO, CRTH-2, CD4+/CD62L-/CD44, CRY1, CD4+/CD62L+/CD44, críptica, CD5, CSB/ERCC6, CD6, CCL27/CTACK, CD8, CTGF/CCN2, CD8+/45RA-, CTLA-4, CD8+/45RO-, cubilina, CD9, CX3CR1, CD14, CXADR, CD27/TNFRSF7, CXCL16, ligando CD27/TNFSF7, CXCR3, CD28, CXCR4, CD30/TNFRSF8, CXCR5, Ligando CD30/TNFSF8, CXCR6, CD31/PECAM-1, ciclofilina A, CD34, Cyr61/CCN1, CD36/SR-B3, cistatina A, CD38,

5 cistatina B, CD40/TNFRSF5, cistatina C, ligando CD40/TNFSF5, cistatina D, CD43, cistatina E/M, CD44, cistatina F, CD45, cistatina H, CD46, cistatina H2, CD47, cistatina S, CD48/SLAMF2, cistatina SA, CD55/DAF, cistatina SN, CD58/IFA-3, citocromo c, CD59, apocitocromo c, CD68, holocitocromo c, CD72, citoqueratina 8, CD74, citoqueratina

10 14, CD83, citoqueratina 19, CD84/SLAMF5, citonina, D6, DISP1, DAN, Dkk-1, DANCE, Dkk-2, DARPP-32, Dkk-3, DAX1/NR0B1, Dkk-4, DCC, DLEC, DCIR/CLEC4A, DLL1, DCAR, DLL4, DcR3/TNFRSF6B, d-luciferina, DC-SIGN, ADN ligasa IV, DC-SIGNR/CD299, ADN polimerasa beta, DcTRAIL R1/TNFRSF23, DNAM-I, DcTRAIL R2/TNFRSF22, ADN-PKcs, DDR1, DNER, DDR2, Dopa descarboxilasa/DDC, DEC-205, DPCR-I, decapentaplégica, DPP6, decorina, DPP A4, dectina 1/CLEC7A, DPPA5/ESG1, dectina 2/CLEC6A, DP-PII/QPP/DPP7, DEP-1/CD148, DPPIV/CD26, erizo del desierto, DR3/TNFRSF25, desmina, DR6/TNFRSF21, desmogleína 1, DSCAM, desmogleína

15 2, DSCAM-L1, desmogleína 3, DSPG3, dishevelled-1, Dtk, dishevelled-3, dinamina, EAR2/NR2F6, EphA5, ECE-I, EphA6, ECE-2, EphA7, ECF-L/CHI3L3, EphA8, ECM-I, EphB1, ecotina, EphB2, EDA, EphB3, EDA-A2, EphB4, EDAR, EphB6, EDG-I, efrina, EDG-5, efrina A1, EDG-8, efrina A2, eEF-2, efrina A3, EGF, efrina A4, EGF R, efrina A5, EGR1, efrina B, EG-VEGF/PK1, efrina B1, eIF2 alfa, efrina B2, eIF4E, efrina B3, Elk-1, Epigen, EMAP-II, epimorfina/sintaxina 2, EMMPRIN/CD147, epirregulina, CXCL5/ENA, receptor EPR-1/Xa, endocan, ErbB2, endogлина/CD105, ErbB3, endoglucaño, ErbB4, endonucleasa III, ERCC1, endonucleasa IV, ERCC3, endonucleasa

20 V, ERK1/ERK2, endonucleasa VIII, ERK1, endorrepellina/perlecan, ERK2, endostatina, ERK3, endotelina-1, ERK5/BMK1, engrailed 2, ERR alfa/NR3B1, EN-RAGE, ERR beta/NR3B2, enteropeptidasa/enterocinasa, ERR gamma/NR3B3, CCL1 1/eotaxina, eritropoyetina, CCL24/eotaxina 2, eritropoyetina R, CCL26/eotaxina 3, ESAM, Ep-CAM/TROP-1, ER alfa/NR3A1, EPCR, ER beta/NR3A2, Eph, exonucleasa III, EphA1, exostosina tipo 2/EXTL2, EphA2, exostosina tipo 3/EXTL3, EphA3, FABP1, FGF-BP, FABP2, FGF R1-4, FABP3, FGF R1, FABP4, FGF R2, FABP5, FGF R3, FABP7, FGF R4, FABP9, FGF R5, factor B del complemento, Fgr, FADD, FHR5, FAM3A, fibronectina, FAM3B, ficolina 2, FAM3C, ficolina 3, FAM3D, FITC, Proteína alfa de activación de fibroblastos/FAP, FKBP38, Fas/TNFRSF6, Flap, ligando Fas/TNFSF6, FLIP, FATP1, FLRG, FATP4, FLRT1, FATP5, FLRT2, Fc gamma R1/CD64, FLRT3, Fc gamma RI-IB/CD32b, Flt-3, Fc gamma RIIC/CD32c, ligando Flt-3, Fc gamma RIIA/CD32a, folistatina, Fc gamma RIIB/CD16, folistatina tipo 1, FcRH1/IRTA5, FosB/GOS3, FcRH2/IRTA4, FoxD3, FcRH4/IRTA1, FoxJ1, FcRH5/IRTA2, FoxP3, Receptor Fc tipo 3/CD16-2, Fpg, FEN-I, FPR1, fetuína A, FPRL1, fetuína B, FPRL2, FGF ácido, CX3CL1/Fractalkina, FGF básico, Frizzled-1, FGF-3, Frizzled-2, FGF-4, Frizzled-3, FGF-5, Frizzled-4, FGF-6, Frizzled-5, FGF-8, Frizzled-6, FGF-9, Frizzled-7, FGF-10, Frizzled-8, FGF-11, Frizzled-9, FGF-12, Frk, FGF-13, sFRP-1, FGF-16, sFRP-2, FGF-17, sFRP-3, FGF-19, sFRP-4, FGF-20, furina, FGF-21, FXR/NR1H4, FGF-22, Fyn, FGF-23, G9a/EHMT2, GFR alfa-3/GDNF R alfa-3, GABA-A-R alfa 1, GFR alfa-4/GDNF R alfa-4, GABA-A-R alfa 2, GITR/TNFRSF18, GABA-A-R alfa 4, ligando de GITR/TNFSF18, GABA-A-R alfa 5, GLI-I, GABA-A-R alfa 6, GLI-2, GABA-A-R beta 1, GLP/EHMT1, GABA-A-R beta 2, GLP-I R, GABA-A-R beta 3, glucagón, GABA-A-R gamma 2, glucosamina (N-acetil)-6-sulfatasa/GNS, GABA-B-R2, GluR1, GAD1/GAD67, GluR2/3, GAD2/GAD65, GluR2, GADD45 alfa, GluR3, GADD45 beta, Glut1, GADD45 gamma, Glut2, galectina-1, Glut3, galectina-2, Glut4, galectina-3, Glut5, galectina-3 BP, glutarredoxina 1, galectina-4, glicina R, galectina-7, glucoforina

30 A, galectina-8, glipicano 2, galectina-9, glipicano 3, Ga1NAc4S-6ST, glipicano 5, GAP-43, glipicano 6, GAPDH, GM-CSF, Gas1, GM-CSF R alfa, Gas6, GMF-beta, GASP-1/WFIKKNRP, gpl30, GASP-2/WFIKKN, glucógeno fosforilasa BB/GPBB, GATA-I, GPR15, GATA-2, GPR39, GATA-3, GPVI, GATA-4, GR/NR3C1, GATA-5, Gr-1/ly-6G, GATA-6, granulinsina, GBL, granzima A, GCNF/NR6A1, granzima B, CXCL6/GCP-2, granzima D, G-CSF, granzima G, G-CSF R, granzima H, GDF-I, GRASP, GDF-3 GRB2, GDF-5, gremlina, GDF-6, GRO, GDF-7, CXCL1/GRO alfa, GDF-8, CXCL2/GRO beta, GDF-9, CXCL3/GRO gamma, GDF-11, hormona del crecimiento, GDF-15, R de hormona del crecimiento, GDNF, GRP75/HSPA9B, GFAP, GSK-3 alfa/beta, GFI-I, GSK-3 alfa, GFR alfa-1/GDNF R alfa-1, GSK-3 beta, GFR alfa-2/GDNF R alfa-2, EZFIT, H2AX, histidina, H60, HM74A, HAI-I, HMGA2, HAI-2, HMGB1, HAI-2A, TCF-2/HNF-1 beta, HAI-2B, HNF-3 beta/FoxA2, HAND1, HNF-4 alfa/NR2A1, HAPLN1, HNF-4 gamma/NR2A2, proteasa similar a la tripsina de la vías respiratorias/HAT, HO-1/HMOX1/HSP32, HB-EGF, HO-2/HMOX2, CCL 14a/HCC-1, HPRG, CCL14b/HCC-3, Hrk, CCL16/HCC-4, HRP-I, alfa HCG, HS6ST2, Hck, HSD-I, HCR/CRAM-A/B, HSD-2, HDGF, HSP 10/EPF, hemoglobina, HSP27, hepasocina, HSP60, HES-1, HSP70, HES-4, HSP90, HGF, HTRA/proteasa Do, activador de HGF, HTRA1/PRSS11, R del HGF, HTRA2/0 ml, HIF-I alfa, HVEM/TNFRSF14, HIF-2 alfa, hialuronano, HIN-1/secretoglobulina 3A1, 4-hidroxinonenal, Hip, CCL1/I-309/TCA-3, IL-IO, cIAP (pan), IL-IO R alfa, cIAP-1/HiAP-2, R beta de IL-10, cIAP-2/HiAP-1, IL-11, IBSP/sialoproteína II, EL-11 R alfa, ICAM-1/CD54, IL-12, ICAM-2/CD102, p40 de IL-12/IL-23, ICAM-3/CD50, R beta 1 de IL-12, ICAM-5, R beta 2 de IL-12, ICAT, IL-13, ICOS, R alfa 1 de IL-13, iduronato 2-sulfatasa/EOS, R alfa 2 de IL-13, EFN, IL-15, IFN-alfa, R alfa de IL-15, IFN-alfa 1, IL-16, IFN-alfa 2, IL-17, IFN-alfa 4b, R de IL-17, IFN-alfa A, IL-17 RC, IFN-alfa B2, R D de IL-17, IFN-alfa C, IL-17B, IFN-alfa D, R B de IL-17B, IFN-alfa F, IL-17C, IFN-alfa G, IL-17D, IFN-alfa H2, IL-17E, IFN-alfa I, IL-17F, IFN-alfa J1, IL-18/IL-1F4, IFN-alfa K, Bpa de IL-18, WA de IFN-alfa, Bpc de IL-18, R1 alfa/beta de IFN, Bpd de IL-18, R2 alfa/beta de IFN, IL-18 R alfa/IL-1 R5, IFN-beta, R beta de IL-18/R7 de IL-1, IFN-gamma, IL-19, IFN-gamma R1, IL-20, IFN-gamma R2, IL-20 R alfa, IFN-omega, IL-20 R beta, IgE, IL-21, IGFBP-I, R B de IL-21, IGFBP-2, IL-22, IGFBP-3, R B de IL-22, IGFBP-4, IL-22BP, IGFBP-5, IL-23, IGFBP-6, IL-23 R, IGFBP-L1, IL-24, IGFBP-rp1/IGFBP-7, IL-26/AK155, IGFBP-rPI, IL-27, IGF-I, EL-28A, R de IGF-I, IL-28B, IGF-II, IL-29/EFN-lambda 1, R de IGF-II, IL-31, IgG, EL-31 RA, IgM, IL-32 alfa, IGSF2, IL-33, IGSF4A/SinCAM, ILT2/CD85J, IGSF4B, ILT3/CD85k, IGSF8, ILT4/CD85d, IgY, ILT5/CD85a, IKB-beta, ILT6/CD85e, IKK alfa, erizo indio, IKK epsilon, INSRR, EKK gamma, insulina, IL-1 alfa/IL-1F1, insulina R/CD220, IL-1 beta/IL-1F2, proinsulina, IL-1ra/IL-1F3, insulinsina/EDE, IL-1F5/FIL1

delta, integrina alfa 2/CD49b, IL-1F6/FIL1 épsilon, integrina alfa 3/CD49c, IL-1F7/FIL1 zeta, integrina alfa 3 beta 1/VLA-3, IL-1F8/FIL1 zeta, integrina alfa 4/CD49d, H1 de IL-1F9/IL-1, integrina alfa 5/CD49e, IL-1F10/IL-1HY2, integrina alfa 5 beta 1, IL-1 RI, integrina alfa 6/CD49f, IL-1 RII, integrina alfa 7, R3 de IL-1/R AcP de IL-1, integrina alfa 9, IL-1 R4/ST2, integrin alfa E/CD103, IL-1 R6/IL-1 R rp2, integrina alfa L/CD1 la, IL-1 R8, integrina alfa L beta 2, IL-1 R9, integrina alfa M/CD1 lb, IL-2, integrina alfa M beta 2, IL-2 R alfa, integrina alfa V/CD51, IL-2 R beta, integrina alfa V beta 5, IL-3, integrina alfa V beta 3, IL-3 R alfa, integrina alfa V beta 6, R beta de IL-3, integrina alfa XJCD1 lc, IL-4, integrina beta 1/CD29, R B de IL-4, integrina beta 2/CD18, IL-5, integrina beta 3/CD61, IL-5 R alfa, integrina beta 5, IL-6, integrina beta 6, IL-6 R, integrina beta 7, IL-7, CXCL10/EP-10/CRG-2, IL-7 R alfa/CD127, IRAKI, CXCR1/IL-8 RA, IRAK4, CXCR2/IL-8 RB, ERS-I, CXCL8/IL-8, Islote-1, IL-9, CXCL1 1/I-TAC, R de IL-9, Jagged 1, JAM-4/IGSF5, Jagged 2, JNK, JAM-A, JNK1/JNK2, JAM-B/VE-JAM, JNK1, JAM-C, JNK2, cininógeno, caliceína 3/PSA, cininostatina, caliceína 4, KER/CD158, caliceína 5, KER2D1, caliceína 6/neurosina, KIR2DL3, caliceína 7, KIR2DL4/CD158d, caliceína 8/neuropsina, KIR2DS4, caliceína 9, KIR3DL1, caliceína plasmática/KLKB1, KER3DL2, caliceína 10, Kirrel2, caliceína 11, KLF4, caliceína 12, KLF5, caliceína 13, KLF6, caliceína 14, Klotho, caliceína 15, Klotho beta, KC, KOR, Keap1, Kremen-1, Kel1, Kremen-2, KGF/FGF-7, LAG-3, LINGO-2, LAIR1, lipina 2, LAIR2, lipocalina-1, laminina alfa 4, lipocalina-2/NGAL, laminina gamma 1,5-lipoxigenasa, laminina I, LXR alfa/NR1H3, laminina S, LXR beta/NR1H2, laminina-1, livina, laminina-5, LEX, LAMP, LMIR1/CD300A, langerina, LMIR2/CD300c, LAR, LMIR3/CD300LF, latexina, LMIR5/CD300LB, layilina, LMIR6/CD300LE, LBP, LMO2, LDL R, LOX-1/SR-E1, LECT2, LRH-1/NR5A2, LEDGF, LRIG1, Lefty, LRIG3, Lefty-1, LRP-I, Lefty-A, LRP-6, legumaina, LSECTin/CLEC4G, leptina, lumicano, R leptina, CXCL15/lungkina, leucotrieno B4, XCL1/linfotactina, leucotrieno B4 R1, linfotoxina, LEF, linfotoxina beta/TNFSF3, LIF R alfa, linfotoxina beta R/TNFRSF3, LIGHT/TNFSF14, Lyn, limitina, Lyp, LIMPII/SR-B2, lisil oxidasa homólogo 2, LIN-28, LYVE-I, LINGO-I, alfa 2-macroglobulina, CXCL9/MIG, MAD2L1, mimecan, MadCAM-1, Mindin, MafB, R mineralocorticoide/NR3C2, mafF, CCL3L1/isoforma MIP-1 alfa LD78 beta, MafG, CCL3/MIP-1 alfa, mafK, CCL4L1/IAG-1, MAG/Siglec-4-a, CCL4/MIP-1 beta, MANF, CCL15/MEP-1 delta, MAP2, CCL9/10/MIP-1 gamma, MAPK, MIP-2, marapsina/pancreasina, CCL19/MIP-3 beta, MARCKS, CCL20/MIP-3 alfa, MARCO, MIP-I, Mash1, MIP-II, matrilina-2, MIP-III, matrilina-3, MIS/AMH, matrilina-4, MIS RII, matriptasa/ST14, MIXL1, MBL, MKK3/MKK6, MBL-2, MKK3, melanocortina 3R/MC3R, MKK4, MCAM/CD146, MKK6, MCK-2, MKK7, Mcl-I, MKP-3, MCP-6, MLH-I, CCL2/MCP-1, MLK4 alfa, MCP-11, MMP, CCL8/MCP-2, MMP-1, CCL7/MCP-3/MARC, MMP-2, CCL13/MCP-4, MMP-3, CCL12/MCP-5, MMP-7, M-CSF, MMP-8, R M-CSF, MMP-9, MCV-tipo II, MMP-IO, MD-I MMP-I 1, MD-2, MMP-12, CCL22/MDC, MMP-13, MDL-1/CLEC5A, MMP-14, MDM2, MMP-15, MEA-I, MMP-16/MT3-MMP, MEK1/MEK2, MMP-24/MT5-MMP, MEK1, MMP-25/MT6-MMP, MEK2, MMP-26, melusina, MMR, MEPE, MOG, meprin alfa, CCL23/MPHF-1, meprin beta, M-Ras/R-Ras3, Mer, Mrel 1, mesotelina, MRP1 meteorina, MSK1/MSK2, metionina aminopeptidasa 1, MSK1, metionina aminopeptidasa, MSK2, metionina aminopeptidasa 2, MSP, MFG-E8, MSP R/Ron, MFRP, Mug, MgcRacGAP, MULT-I, MGL2, Musashi-1, MGMT, Musashi-2, MIA, MuSK, MICA, MutY ADN glucosilasa, MICB, MyD88, MICL/CLEC12A, mieloperoxidasa, beta 2 microglobulina, miocardina, midquina, miocilina, MIF, mioglobina, NAIP NGFI-B gamma/NR4A3, Nanog, NgR2/NgRH1, CXCL7/NAP-2, NgR3/NgRH2, Nbsl, nidogen-1/entactina, NCAM-1/CD56, nidogen-2, NCAM-L1, óxido nítrico, nectina-1, nitrotirosina, nectina-2/CD1 12, NKG2A, nectina-3, NKG2C, nectina-4, NKG2D, neogenina, NKp30, neprilina/CDIO, NKp44, neprilina-2/MMEL1/MMEL2, NKp46/NCR1, nestina, NKp80/KLRF1, NETO2, NKX2.5, netrina-1, NMDA R, subunidad NR1, netrina-2, NMDA R, subunidad NR2A, netrina-4, NMDA R, subunidad NR2B, netrina-Gla, NMDA R, subunidad NR2C, netrina-G2a, N-Me-6,7-diOH-TIQ, neurregulina-1/NRG1, nodal, neurregulina-3/NRG3, nogina, neuritina, receptor Nogo, NeuroD1, Nogo-A, neurofascina, NOMO, neurogenina-1, Nope, neurogenina-2, norrina, neurogenina-3, eNOS, neuroisina, iNOS, neurofisina II, nNOS, neuropilina-1, Notch-1, neuropilina-2, Notch-2, neuropoyetina, Notch-3, neurotrimina, Notch-4, neurturina, NOV/CCN3, NFAM1, NRAGE, NF-H, NrCAM, NFkB1, NRL, NFkB2, NT-3, NF-L, NT-4, NF-M, NTB-A/SLAMF6, NG2/MCSP, NTH1, NGF R/TNFRSF16, nucleostemina, beta-NGF, Nurr-1/NR4A2, NGFI-B alfa/NR4A1, OAS2, orexina B, OBCAM, OSCAR, OCAM, OSF-2/periostina, OCIL/CLEC2d, oncostatina M/OSM, OCILRP2/CLEC21, OSM R beta, Oct-3/4, osteoactivina/GPNMB, OGG1, osteoadherina, Olig 1, 2, 3, osteocalcina, Olig1, osteocrina, Olig2, osteopontina, Olig3, osteoprotegerina/TNFRSF1 IB, marcador de oligodendrocitos 01, Otx2, marcador de oligodendrocitos 04, OV-6, OMGp, OX40/TNFRSF4, opticina, ligando OX40/TNFSF4, orexina A, OAS2, orexina B, OBCAM, OSCAR, OCAM, OSF-2/Periostina, OCIL/CLEC2d, oncostatina M/OSM, OCILRP2/CLEC2i, OSM R beta, Oct-3/4, osteoactivina/GPNMB, OGG1, osteoadherina, Olig 1, 2, 3, osteocalcina, Olig1, osteocrina, Olig2, osteopontina, Olig3, osteoprotegerina/TNFRSF1 IB, marcador de oligodendrocitos 01, Otx2, marcador de oligodendrocitos 04, OV-6, OMGp, OX40/TNFRSF4, Opticina, ligando OX40/TNFSF4, orexina A, RACK1, Ret, Rad1, REV-ERB alfa/NR1D1, Rad17, REVERB beta/NR1D2, Rad51, Rex-1, Rae-1, RGM-A, Rae-1 alfa, RGM-B, Rae-1 beta, RGM-C, Rae-1 delta, Rheb, Rae-1 épsilon, proteína ribosómica S6, Rae-1 gamma, RIP1, Raf-1, ROBO1, RAGE, ROBO2, Ra1A/Ra1B, R0B03, Ra1A, ROBO4, Ra1B, R0R/NR1F1-3 (pan), RANK/TNFRSF1 1A, ROR alfa/NR1F1, CCL5/RANTES, ROR gamma/NR1F3, Rap1A/B, receptor huérfano tipo RTK 1/ROR1, RAR alfa/NR1B1, receptor huérfano tipo RTK 2/ROR2, RAR beta/NR1B2, RP105, RAR gamma/NR1B3, RP A2, Ras, RSK (pan), RBP4, RSK1/RSK2, RECK, RSK1, Reg 2/PAP, RSK2, Reg I, RSK3, Reg II, RSK4, Reg III, R-espondina 1, Reg I1ia, R-espondina 2, Reg IV, R-espondina 3, relaxina-1, RUNX1/CBFA2, relaxina-2, RUNX2/CBFA1, relaxina-3, RUNX3/CBFA3, RELM alfa, RXR alfa/NR2B1, RELM beta, RXR beta/NR2B2, RELT/TNFRSF19L, RXR gamma/NR2B3, resistina, S100AIO, SLITRK5, S100A8, SLPI, S100A9, SMAC/Diablo, S100B, Smad1, S100P, Smad2, SALL1, Smad3, delta-sarcoglicano, Smad4, Sca-1/ly6, Smad5, SCD-I, Smad7, SCF, Smad8, SCF R/c-kit, SMC1, SCGF, alfa actina de músculo liso, SCL/Tall, SMUG1, SCP3/SYCP3, Snail, CXCL12/SDF-1, intercambiador de calcio y sodio 1, SDNSF/MCFD2, Soggy-1, alfa-secretasa, erizo sónico, gamma-secretasa, S o CS1, beta-secretasa, S o CS3, E-selectina, sortilina, L-selectina, SOST, P-selectina, SOX1, semaforina 3A, SOX2, semaforina 3C, SOX3, semaforina

- 3E, SOX7, semaforina 3F, SOX9, semaforina 6A, SOX10, semaforina 6B, SOX 17, semaforina 6C, SOX21 semaforina 6D, SPARC, semaforina 7 A, SPARC tipo 1, separasa, SP-D, sustrato de serina/treonina fosfatasa I, espinesina, serpina A1, F-espondina, serpina A3, SR-AI/MSR, serpina A4/calistatina, Src, serpina A5/inhibidor de la proteína C, SREC-I/SR-F1, serpina A8/angiotensinógeno, SREC-II, serpina B5, SSEA-I, serpina C1/antitrombina-III, SSEA-3, serpina D1/cofactor de heparina II, SSEA-4, serpina E1/PAI-1, ST7/IRP12, serpina E2, estabilina-1, serpina F1, estabilina-2, serpina F2, estañocalcina 1, inhibidor de serpina G1/C1, estañocalcina 2, serpina 12, STAT1, seroamiloide A1, STAT2, SF-1/NR5A1, STAT3, SGK, STAT4, SHBG, STAT5a/b, SHIP, STAT5a, SHP/NR0B2, STAT5b, SHP-I, STATE, SHP-2, VE-estatina, SIGIRR, Stella/Dppa3, Siglec-2/CD22, STRO-I, Siglec-3/CD33, sustancia P, Siglec-5, sulfamidasa/SGSH, Siglec-6, factor modificador de sulfatasa 1/SUMF1, Siglec-7, factor modificador de sulfatasa 2/SUMF2, Siglec-9, SUMO1, Siglec-10, SUMO2/3/4, Siglec-11, SUMO3, Siglec-F, superóxido dismutasa, SIGNR1/CD209, superóxido dismutasa-1/Cu[0099]-Zn SOD, SIGNR4, superóxido dismutasa-2/Mn-SOD, SIRP beta 1, superóxido dismutasa-3/EC-SOD, SKI, survivina, SLAM/CD150, sinapsina I, tansposasa de la Bella Durmiente, sindecán-I/CD 138, Slit3, sindecán-2, SLITRK1, sindecán-3, SLITRK2, sindecán-4, SLITRK4, TACI/TNFRSF13B, TMEFF 1/tomorregulina 1, TAO2, TMEFF2, TAPP1, TNF-alfa/TNFSF IA, CCL17/TARC, TNF-beta/TNFSF1B, Tau, TNF R1/TNFRSFIA, TC21/R-Ras2, TNF RII/TNFRSF1B, TCAM-I, TOR, TCCR/WSX-1, TP-I, TC-PTP, TP63/TP73L, TDG, TR, CCL25/TECK, TR alfa/NR1A1, tenascina C, TR beta 1/NR1A2, tenascina R, TR2/NR2C1, TER-119, TR4/NR2C2, *TERT*, TRA-1-85, testicán 1/SPOCK1, TRADD, testicán 2/SPOCK2, TRAF-1, testicán 3/SPOCK3, TRAF-2, TFPI, TRAF-3, TFPI-2, TRAF-4, TGF-alfa, TRAF-6, TGF-beta, TRAIL/TNFSF10, TGF-beta 1, TRAIL R1/TNFRSF10A, LAP (TGF-beta 1), TRAIL R2/TNFRSF10B, TGF-beta 1 latente, TRAIL R3/TNFRSF10C, TGF-beta 1,2, TRAIL R4/TNFRSF10D, TGF-beta 2, TRANCE/TNFSF1 1, TGF-beta 3, TfR (transferrina R), TGF-beta 5, apotransferrina, TGF-beta latente bp1, holotransferrina, TGF-beta latente bp2, trappina 2/elafina, TGF-beta latente bp4, TREM-1, R1 beta de TGF/ALK-5, TREM-2, TGF-beta R11, TREM-3, TGF-beta RIIb, TREML1/TLT-1, RIII beta de TGF, TRF-I, termolisina, TRF-2, tiorredoxina-1, ectoenzima degradadora de TRH/TRHDE, tiorredoxina-2, TRIMS, tiorredoxina-80, tripeptidilpeptidasa I, tiorredoxina tipo 5/TRP14, TrkA, THOP1, TrkB, trombospondina/CD141, TrkC, trombopoyetina, TROP-2, R trombopoyetina, troponina I péptido 3, trombospondina-1, troponina T, trombospondina-2, TROY/TNFRSF 19, trombospondina-4, tripsina 1, timopoyetina, tripsina 2/PRSS2, quimiocina-1 de timo, tripsina 3/PRSS3, Tie-1, Triptasa-5/Prss32, Tie-2, triptasa alfa/TPS1, TIM-I/KIM-I/HAVCR, triptasa beta-1/MCPT-7, TIM-2, triptasa beta-2/TPSB2, TIM-3, triptasa épsilon/BSSP-4, TIM-4, triptasa gamma-1/TPSG1, TIM-5, triptófano hidroxilasa, TIM-6, TSC22, TIMP-I, TSG, TIMP-2, TSG-6, TIMP-3, TSK, TIMP-4, TSLP, TL1A/TNFSF15, TSLP R, TLR1, TSP50, TLR2, beta-III tubulina, TLR3, TWEAK/TNFSF12, TLR4, TWEAK R/TNFRSF 12, TLR5, Tyk2, TLR6, fosfotirosina, TLR9, tirosina hidroxilasa, TLX/NR2E1, sustrato de tirosina fosfatasa I, ubiquitina, UNC5H3, Ugi, UNC5H4, UGRP1, UNG, ULBP-I, uPA, ULBP-2, uPAR, ULBP-3, URB, UNC5H1, UVDE, UNC5H2, R1 vaniloide, R de VEGF, VASA, VEGF R1/Flt-1, vasohibina, VEGF R2/KDR/Flk-1, vasorina, VEGF R3/FU-4, vasostatina, versican, Vav-1, VG5Q, VCAM-1, VHR, VDR/NR111, vimentina, VEGF, vitronectina, VEGF-B, VLDLR, VEGF-C, vWF-A2, VEGF-D, alfa sinucleína, Ku70, WASP, Wnt-7b, WIF-I, Wnt-8a WISP-1/CCN4, Wnt-8b, WNK1, Wnt-9a, Wnt-1, Wnt-9b, Wnt-3a, Wnt-10a, Wnt-10b, Wnt-5a, Wnt-11, Wnt-5b, wvNS3, Wnt7a, XCR1, XPE/DBB1, XEDAR, XPE/DBB2, Xg, XPF, XIAP, XPG, XPA, XPV, XPD, XRCC1, Yes, YY1, EphA4.
- 40 Numerosos canales iónicos humanos son dianas de particular interés. Los ejemplos no limitantes incluyen la subunidad B del receptor 3 de hidroxitriptamina 5, precursor del receptor 3 de hidroxitriptamina 5, subunidad C del receptor 3 de hidroxitriptamina 5, proteína AAD 14, proteína receptora de acetilcolina, precursor de la subunidad alfa, proteína receptora de acetilcolina, precursor de la subunidad beta, proteína receptora de acetilcolina, precursor de la subunidad delta, proteína receptora de acetilcolina, precursor de la subunidad epsilon, proteína receptora de acetilcolina, precursor de la subunidad gamma, variante b de corte y empalme del canal iónico 3 detector de ácido, variante c de corte y empalme del canal iónico 3 detector de ácido, canal iónico 4 detector de ácido, ADP-ribosa pirofosfatasa, precursor mitocondrial, canal de calcio alfa1 A dependiente de voltaje, canal catiónico 1 sensible a amilorida, neuronal, canal catiónico 2 sensible a amilorida, neuronal, canal catiónico 4 sensible a amilorida, isoforma 2, canal de sodio sensible a amilorida, subunidad alfa del canal de sodio sensible a amilorida, subunidad beta del canal de sodio sensible a amilorida, subunidad delta del canal de sodio sensible a amilorida, subunidad gamma del canal de sodio sensible a amilorida, anexina A7, proteína de tipo apical, canal 1 de potasio rectificador interno sensible a ATP, canal 10 de potasio rectificador interno sensible a ATP, canal 11 de potasio rectificador interno sensible a ATP, canal 14 de potasio rectificador interno sensible a ATP, canal 15 de potasio rectificador interno sensible a ATP, canal 8 de potasio rectificador interno sensible a ATP, subunidad alfa12.2 del canal de calcio, subunidad alfa12.2 del canal de calcio, subunidad alfaE del canal de calcio, variante de corte y empalme delta19 delta40 delta46, subunidad alfa 1 del canal de potasio activado por calcio, subunidad beta 1 del canal de potasio activado por calcio, subunidad beta 2 del canal de potasio activado por calcio, subunidad beta 3 del canal de potasio activado por calcio, canal 1 de cloruro dependiente de calcio, canal de cationes TRPM4B, CDNA FLJ90453 fis, clon NT2RP3001542, muy similar a la proteína 6 que contiene el dominio de tetramerización del canal de potasio, CDNA FLJ90663 fis, clon PLACE 1005031, muy similar a la proteína 5 del canal intracelular de cloruro, subunidad beta del canal catiónico abierto por CGMP, proteína de canal de cloruro, proteína 2 de canal de cloruro, proteína 3 de canal de cloruro, proteína 4 de canal de cloruro, proteína 5 de canal de cloruro, proteína 6 de canal de cloruro, proteína C1C-Ka de canal de cloruro, proteína C1C-Kb de canal de cloruro, proteína de canal de cloruro, músculo esquelética, canal intracelular de cloruro 6, proteína 3 de canal intracelular de cloruro, proteína 4 de canal intracelular de cloruro, proteína 5 de canal intracelular de cloruro, proteína CHRNA3, proteína Clcn3e, proteína CLCNKB, proteína CNGA4, cullina-5, canal de potasio abierto por GMP cíclico, canal catiónico 4 abierto por

nucleótidos cíclicos, canal catiónico alfa 3 abierto por nucleótidos cíclicos, canal catiónico beta 3 abierto por nucleótidos cíclicos, canal olfativo abierto por nucleótidos cíclicos, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, cadena pesada del citocromo B-245, tipo L sensible a dihidropiridina, precursor de las subunidades alfa-2/delta del canal de calcio, precursor del regulador 3 de transporte de iones que contiene el dominio FXYD, precursor del regulador 5 de transporte de iones que contiene el dominio FXYD, precursor del regulador 6 de transporte de iones que contiene el dominio FXYD, regulador de transporte 7 de iones que contiene el dominio FXYD, precursor del regulador 8 de transporte de iones que contiene el dominio FXYD, canal 1 de potasio rectificador interno activado por proteína G, canal 2 de potasio rectificador interno activado por proteína G, canal 3 de potasio rectificador interno activado por proteína G, canal 4 de potasio rectificador interno activado por proteína G, precursor de la subunidad alfa-1 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, precursor de la subunidad alfa-2 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, precursor de la subunidad alfa-3 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, precursor de la subunidad alfa-4 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, precursor de la subunidad alfa-5 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, precursor de la subunidad alfa-6 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, precursor de la subunidad beta-1 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, precursor de la subunidad beta-2 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, precursor de la subunidad beta-3 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, precursor de la subunidad delta del receptor del ácido gamma-aminobutírico, precursor de la subunidad épsilon del receptor de ácido gamma-aminobutírico, precursor de la subunidad gamma-1 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, precursor de la subunidad gamma-3 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, precursor de la subunidad pi del receptor de ácido gamma-aminobutírico, precursor de la subunidad rho-1 del receptor de ácido gamma-aminobutírico, precursor de la subunidad del receptor de ácido gamma-aminobutírico rho-2, receptor de la subunidad theta del receptor de ácido gamma-aminobutírico, receptor de kainato GluR6, precursor del receptor 1 de glutamato, precursor del receptor 2 de glutamato, precursor del receptor 3 de glutamato, precursor del receptor 4 de glutamato, receptor 7 de glutamato, receptor de glutamato B, precursor de la subunidad delta-1 del receptor de glutamato, receptor de glutamato, precursor de kainato ionotrópico 1, receptor de glutamato, precursor de kainato ionotrópico 2, receptor de glutamato, precursor de kainato ionotrópico 3, receptor de glutamato, precursor de kainato ionotrópico 4, receptor de glutamato, precursor de kainato ionotrópico 5, precursor de la subunidad 3A del receptor de glutamato [NMDA], precursor de la subunidad 3B del receptor de glutamato [NMDA], precursor de la subunidad épsilon 1 del receptor de glutamato [NMDA], precursor de la subunidad épsilon 2 del receptor de glutamato [NMDA], precursor de la subunidad épsilon 4 del receptor de glutamato [NMDA], precursor de la subunidad zeta 1 del receptor de glutamato [NMDA], precursor de la cadena alfa-1 del receptor de glicina, precursor de la cadena alfa-2 del receptor de glicina, precursor de la cadena alfa-3 del receptor de glicina, precursor de la cadena beta del receptor de glicina, subunidad 1 del complejo ribonucleoproteico H/ACA, subunidad beta del receptor épsilon de inmunoglobulina de alta afinidad, proteína hipotética DKFZp31310334, proteína hipotética DKFZp761M1724, proteína hipotética FLJ12242, proteína hipotética FLJ14389, proteína hipotética FLJ14798, proteína hipotética FLJ14995, proteína hipotética FLJ16180, proteína hipotética FLJ16802, proteína hipotética FLJ32069, proteína hipotética FLJ37401, proteína hipotética FLJ38750, proteína hipotética FLJ40162, proteína hipotética FLJ41415, proteína hipotética FLJ90576, proteína hipotética FLJ90590, proteína hipotética FLJ90622, proteína hipotética KCTD15, proteína hipotética MGC15619, receptor tipo 1 de inositol 1,4,5-trisfosfato, receptor tipo 2 de inositol 1,4,5-trisfosfato, receptor tipo 3 de inositol 1,4,5-trisfosfato, proteína 4 del canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia, canal de potasio 13 rectificador interno, canal de potasio 16 rectificador interno, canal de potasio 4 rectificador interno, regulador negativo Kir2.2v del canal K(+) rectificador interno, subunidad Ka2a del receptor de kainato, proteína KCNH5, proteína KCTD 17, proteína KCTD2, proteína transmembrana 1 asociada a queratinocitos, proteína 4 de interacción con el canal Kv, melastatina 1, proteína de membrana MLC1, proteína MGC 15619, mucolipina-1, mucolipina-2, mucolipina-3, proteína 4 asociada a resistencia a múltiples fármacos, precursor de la subunidad 2C del receptor de N-metil-D-aspartato, homólogo 1 de NADPH oxidasa, Nav1.5, proteína del receptor de acetilcolina neuronal, precursor de la subunidad alfa-10, proteína del receptor de acetilcolina neuronal, precursor de la subunidad alfa-2, proteína del receptor de acetilcolina neuronal, precursor de la subunidad alfa-3, proteína del receptor de acetilcolina neuronal, precursor de la subunidad alfa-4, proteína del receptor de acetilcolina neuronal, precursor de la subunidad alfa-5, proteína del receptor de acetilcolina neuronal, precursor de la subunidad alfa-6, proteína del receptor de acetilcolina neuronal, precursor de la subunidad alfa-7, proteína del receptor de acetilcolina neuronal, precursor de la subunidad alfa-9, proteína del receptor de acetilcolina neuronal, precursor de la subunidad beta-2, proteína del receptor de acetilcolina neuronal, precursor de la subunidad beta-3, proteína del receptor de acetilcolina neuronal, precursor de la subunidad beta-4, subunidad alfa 2D del canal de calcio dependiente de voltaje neuronal, P2X purinoceptor 1, P2X purinoceptor 2, P2X purinoceptor 3, P2X purinoceptor 4, P2X purinoceptor 5, P2X purinoceptor 6, P2X purinoceptor 7, canal de potasio pancreático TALK-Ib, canal de potasio pancreático TALK-Ic, canal de potasio pancreático TALK-Id, precursor de fosfolemman, plasmolipina, proteína relacionada con la enfermedad poliquística renal 2, proteína 1 similar a la de la enfermedad poliquística renal 2, proteína 2 similar a la de la enfermedad poliquística renal 2, enfermedad poliquística renal y receptor del precursor proteico relacionado con la gelatina de huevo, policistina-2, regulador de canales de potasio, subfamilia K del canal de potasio miembro 1, subfamilia K del canal de potasio miembro 10, subfamilia K del canal de potasio miembro 12, subfamilia K del canal de potasio miembro 13, subfamilia K del canal de potasio miembro 15, subfamilia K del canal de potasio miembro 16, subfamilia K del canal de potasio miembro 17, subfamilia K del canal de potasio miembro 2, subfamilia K del canal de potasio miembro 3, subfamilia K del canal de potasio miembro 4, subfamilia K del canal de potasio miembro 5, subfamilia K del canal de potasio miembro 6, subfamilia K del canal de potasio miembro 7, subfamilia K del canal de potasio miembro 9, dominio de tetramerización del canal de potasio que contiene la proteína 3, dominio de tetramerización del canal de potasio que contiene la proteína 12, dominio de tetramerización

del canal de potasio que contiene la proteína 14, dominio de tetramerización del canal de potasio que contiene la proteína 2, dominio de tetramerización del canal de potasio que contiene la proteína 4, dominio de tetramerización del canal de potasio que contiene la proteína 5, dominio de tetramerización del canal de potasio que contiene la proteína 10, dominio de tetramerización del canal de potasio que contiene la proteína 13, dominio de tetramerización del canal de potasio que contiene la proteína 1, miembro 1 de la subfamilia A del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 2 de la subfamilia A del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 4 de la subfamilia A del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 5 de la subfamilia A del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 6 de la subfamilia A del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 1 de la subfamilia B del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 2 de la subfamilia B del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 1 de la subfamilia C del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 3 de la subfamilia C del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 4 de la subfamilia C del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 1 de la subfamilia D del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 2 de la subfamilia D del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 3 de la subfamilia D del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 1 de la subfamilia E del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 2 de la subfamilia E del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 3 de la subfamilia E del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 4 de la subfamilia D del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 1 de la subfamilia F del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 1 de la subfamilia G del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 2 de la subfamilia G del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 3 de la subfamilia G del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 4 de la subfamilia G del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 1 de la subfamilia H del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 2 de la subfamilia H del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 3 de la subfamilia H del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 4 de la subfamilia H del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 5 de la subfamilia H del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 6 de la subfamilia H del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 7 de la subfamilia H del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 8 de la subfamilia H del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 1 de la subfamilia KQT del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 2 de la subfamilia KQT del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 3 de la subfamilia KQT del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 4 de la subfamilia KQT del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 5 de la subfamilia KQT del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 1 de la subfamilia del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 2 de la subfamilia del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 3 de la subfamilia del canal de potasio abierto por voltaje, miembro 2 de la subfamilia V del canal de potasio abierto por voltaje, canal de potasio abierto por voltaje, subfamilia H, miembro 7, isoforma 2, canal 1 activado por hiperpolarización de potasio/sodio abierto por nucleótidos cíclicos, canal 2 activado por hiperpolarización de potasio/sodio abierto por nucleótidos cíclicos, canal 3 activado por hiperpolarización de potasio/sodio abierto por nucleótidos cíclicos, canal 4 activado por hiperpolarización de potasio/sodio abierto por nucleótidos cíclicos, probable homólogo de la subunidad del receptor de importación mitocondrial TOM40, receptor P2X5 purinérgico, isoforma A, supuesto canal iónico 4 repetido abierto por voltaje, supuesta proteína 7 del canal de cloruro, supuesto receptor de kainato GluR6, supuesta variante 1 CATSPER2 de la proteína del canal iónico, supuesta variante 2 CATSPER2 de la proteína del canal iónico, supuesta variante 3 CATSPER2 de la proteína del canal iónico, supuesto regulador de la variante 1 de la proteína de los canales de potasio, supuesta tirosina-proteína fosfatasa TPTE, receptor 1 de rianodina, receptor 2 de rianodina, receptor 3 de rianodina, proteína 1 de unión a SH3 KBP1, canal 1 de potencial de receptor transitorio corto, canal 4 de potencial de receptor transitorio corto, canal 5 de potencial de receptor transitorio corto, canal 6 de potencial de receptor transitorio corto, canal 7 de potencial de receptor transitorio corto, proteína 1 del canal de potasio activado por calcio de pequeña conductancia, proteína 2 del canal de potasio activado por calcio de pequeña conductancia, isoforma b, proteína 3 del canal de potasio activado por calcio de pequeña conductancia, canal SK3 de potasio activado por calcio de pequeña conductancia, canal de sodio, precursor de la subunidad beta-1 del canal de sodio, subunidad alfa de la proteína del canal de sodio tipo II, subunidad alfa de la proteína del canal de sodio tipo III, subunidad alfa de la proteína del canal de sodio tipo IV, subunidad alfa de la proteína del canal de sodio tipo IX, subunidad alfa de la proteína del canal de sodio tipo V, subunidad alfa de la proteína del canal de sodio tipo VII, subunidad alfa de la proteína del canal de sodio tipo VIII, subunidad alfa de la proteína del canal de sodio tipo X, subunidad alfa de la proteína del canal de sodio tipo XI, canal de potasio sensible a ATP activado por sodio y cloruro, cadena gamma ATPasa transportadora de sodio/potasio, canal 1 catiónico asociado a esperma, canal 2 catiónico asociado a esperma, isoforma 4, syntaxina-1B1, miembro 1 de la subfamilia A del canal catiónico de potencial receptor transitorio, miembro 2 de la subfamilia M del canal catiónico de potencial receptor transitorio, miembro 3 de la subfamilia M del canal catiónico de potencial receptor transitorio, miembro 6 de la subfamilia M del canal catiónico de potencial receptor transitorio, miembro 7 de la subfamilia M del canal catiónico de potencial receptor transitorio, miembro 1 de la subfamilia V del canal catiónico de potencial receptor transitorio, miembro 2 de la subfamilia V del canal catiónico de potencial receptor transitorio, miembro 3 de la subfamilia V del canal catiónico de potencial receptor transitorio, miembro 4 de la subfamilia V del canal catiónico de potencial receptor transitorio, miembro 5 de la subfamilia V del canal catiónico de potencial receptor transitorio, miembro 6 de la subfamilia V del canal catiónico de potencial receptor transitorio, variante de corte y empalme epsilon 4 del canal de potencial receptor transitorio, variante de corte y empalme zeta 4 del canal de potencial receptor transitorio, variante de corte y empalme gamma 7 del canal de potencial receptor transitorio, factor de necrosis tumoral, proteína 1 inducida por alfa, endotelial, proteína 2 del canal de calcio de dos poros, proteína VDAC4, canal de potasio Kv3.2b abierto por voltaje, subunidad beta1B del canal de sodio abierto por voltaje, canal aniónico dependiente de voltaje, canal aniónico 2 dependiente de voltaje, proteína 1 del canal selectivo de aniones dependiente de voltaje, proteína 2 del canal selectivo de aniones dependiente de voltaje, proteína 3 del canal selectivo de aniones dependiente de voltaje, subunidad gamma-1 del canal de calcio dependiente del voltaje, subunidad gamma-2 del canal de calcio dependiente del voltaje, subunidad

gamma-3 del canal de calcio dependiente del voltaje, subunidad gamma-4 del canal de calcio dependiente del voltaje, subunidad gamma-5 del canal de calcio dependiente del voltaje, subunidad gamma-6 del canal de calcio dependiente del voltaje, subunidad gamma-7 del canal de calcio dependiente del voltaje, subunidad gamma-8 del canal de calcio dependiente del voltaje, subunidad alfa-1C de canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, subunidad alfa-1D de canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, subunidad alfa-IS de canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, subunidad beta-1 de canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, subunidad beta-2 de canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, subunidad beta-3 de canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, subunidad beta-4 de canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, subunidad alfa-1B de canal de calcio tipo N dependiente de voltaje, subunidad alfa-1A de canal de calcio tipo P/Q dependiente de voltaje, subunidad alfa-IE de canal de calcio tipo R dependiente de voltaje, subunidad alfa-1G de canal de calcio tipo T dependiente de voltaje, subunidad alfa-1H de canal de calcio tipo T dependiente de voltaje, subunidad alfa-1I de canal de calcio tipo T dependiente de voltaje, subunidad alfa-1 del canal de calcio tipo L abierto por voltaje, subunidad beta-1 del canal de potasio abierto por voltaje, subunidad beta-2 del canal de potasio abierto por voltaje, subunidad beta-3 del canal de potasio abierto por voltaje, canal de potasio KCNA7 abierto por voltaje. La familia Nav1.x de canales de sodio humanos abiertos por voltaje también es una diana particularmente prometedora. Esta familia incluye, por ejemplo, los canales Nav1.6 y Nav1.8.

En determinadas realizaciones, la proteína terapéutica puede ser un receptor acoplado a proteína G (GPCR). Los ejemplos de GPCR incluyen, aunque sin limitación, receptores similares a la rodopsina de clase A tales como acetilcolina Muscatinic (Muse.) de vertebrados tipo 1, Muse, acetilcolina de vertebrados tipo 2, Muse, acetilcolina de vertebrados tipo 3, Muse, acetilcolina de vertebrados tipo 4, adrenoceptores (alfa adrenoceptores tipo 1, alfa adrenoceptores tipo 2, beta adrenoceptores tipo 1, beta adrenoceptores tipo 2, beta adrenoceptores tipo 3, dopamina de vertebrados tipo 1, dopamina de vertebrados tipo 2, dopamina de vertebrados tipo 3, dopamina de vertebrados tipo 4, histamina tipo 1, histamina tipo 2, histamina tipo 3, histamina tipo 4, serotonina tipo 1, serotonina tipo 2, serotonina tipo 3, serotonina tipo 4, serotonina tipo 5, serotonina tipo 6, serotonina tipo 7, serotonina tipo 8, otros tipos de serotonina, amina vestigial, angiotensina tipo 1, angiotensina tipo 2, bombesina, bradiquinina, anafilatoxina C5a, Fmet-leu-phe, similar a APJ, interleucina-8 tipo A, interleucina-8 tipo B, otros tipos de interleucina-8, quimiocina C--C de tipo 1 a tipo 11 y otros tipos, quimiocina C--X--C (tipos 2 a 6 y otros), quimiocina C--X3-C, colecistoquinina CCK, CCK tipo A, CCK tipo B, CCK otros, endotelina, melanocortina (hormona estimulante de melanocitos, hormona adrenocorticotrópica, hormona melanocortina), antígeno Duffy, péptido liberador de prolactina (GPR10), neuropéptido Y (tipo 1 a 7), neuropéptido Y, otro neuropéptido Y, neurotensina, opioide (tipo D, K, M, X), somatostatina (tipo 1 a 5), taquicinina (sustancia P (NK1), sustancia K (NK2), neuromedin K (NK3), taquicinina tipo 1, taquicinina tipo 2, vasopresina/vasotocina (tipo 1 a 2), vasotocina, oxitocina/mesotocina, conopresina, similar a galanina, similar a proteinasa activada, orexina y neuropéptidos FF.QRFP, similar al receptor de quimiocina, neuromedina tipo U (neuromedina U, PRXamida), proteína hormonal (hormona estimulante de folículo, hormona luteinizante, gonadotropina tipo I, gonadotropina tipo II), rodopsina, rodopsina de vertebrados (tipos 1-5), rodopsina de vertebrados tipo 5, rodopsina de artrópodos, rodopsina de artrópodos tipo 1, rodopsina de artrópodos tipo 2, rodopsina de artrópodos tipo 3, rodopsina de moluscos, rodopsina olfatoria (fam 1 olfatoria II de 1 a 13), prostaglandina (prostaglandina E2 subtipo EP1, prostaglandina E2/D2 subtipo EP2, prostaglandina E2 subtipo EP3, prostaglandina E2 subtipo EP4, prostaglandina F2-alfa, prostaciclina, tromboxano, adenosina tipo 1 a 3, purinoceptores, purinoceptor P2RY1-4,6,1 1 GPR91, purinoceptor P2RY5,8,9,10 GPR35,92,174, purinoceptor P2RY12-14 GPR87 (UDP-Glucosa), cannabinoides, factor activador de plaquetas, hormona liberadora de gonadotropina, hormona liberadora de gonadotropina tipo I, hormona liberadora de gonadotropina tipo II, similar a hormona adipocinética, corazonina, hormona liberadora de tirotropina y secretagogo, hormona liberadora de tirotropina, secretagogo de la hormona de crecimiento, similar a secretagogo de la hormona del crecimiento, hormona desencadenante de la ecdisis (ETHR), melatonina, lisoesfingolípidos y LPA (EDG), esfingosina 1-fosfato Edg-1, ácido lisofosfatídico Edg-2, esfingosina 1-fosfato Edg-3, ácido lisofosfatídico Edg-4, esfingosina 1-fosfato Edg-5, esfingosina 1-fosfato Edg-6, ácido lisofosfatídico Edg-7, esfingosina 1-fosfato Edg-8, receptor B4 de leucotrienos distinto de Edg, receptor de leucotrieno B4 BLT1, receptor de leucotrieno B4 BLT2, huérfano de clase A/otro, supuestos neurotransmisores, SREB, protooncogén Mas y relacionado con Mas (MRG), similar a GPR45, cisteinil leucotrieno, receptor de ácido biliar acoplado a proteína G, receptor de ácidos grasos libres (GP40, GP41, GP43), similar a secretina de clase B, calcitonina, factor liberador de corticotropina, péptido inhibidor gástrico, glucagón, hormona liberadora de la hormona de crecimiento, hormona paratiroidea, PACAP, secretina, polipéptido intestinal vasoactivo, latrofilina, latrofilina tipo 1, latrofilina tipo 2, latrofilina tipo 3, receptores ETL, inhibidor de la angiogénesis específica del cerebro (BAI), proteínas similares a Matusalén (MTH), cadherina EGF LAG (CELSR), receptor acoplado a proteína G muy grande, glutamato metabotrópico/feromona de clase C, glutamato metabotrópico grupo I a III, similar de detección de calcio, detección extracelular de calcio, feromonas, otras de tipo detección de calcio, supuestos receptores de feromonas, GABA-B, GABA-B subtipo 1, GABA-B subtipo 2, de tipo GABA-B, GPRC5 huérfana, GPCR6 huérfana, novia de siete proteínas (BOSS), receptores gustativos (T1R), feromona fúngica clase D, similar al factor A de feromona fúngica (STE2.STE3), similar a la feromona B fúngica (BAR, BBR, RCB, PRA), receptores de AMPc clase E, proteínas de albinismo ocular, familia Frizzled/Smoothened, frizzled grupo A (Fz 1, 2, 4, 5, 7-9), frizzled grupo B (Fz 3 y 6), frizzled grupo C (otro), receptores vomeronasales, quimiorreceptores de nematodos, receptores odoríferos de insectos y opsinas de arqueas/bacterias/hongos de clase Z.

En determinadas realizaciones, los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA descritos en el presente documento pueden

comprender cualquiera de los siguientes polipéptidos activos: BOTOX, Myobloc, Neurobloc, Disport (u otros serotipos de neurotoxinas botulínicas), alglucosidasa alfa, daptomicina, YH-16, coriogonadotropina alfa, filgrastim, cetorelix, interleucina-2, aldesleucina, teceleucina, denileucina difitox, interferón alfa-n3 (inyección), interferón alfa-n1, DL-8234, interferón, Suntory (gamma-la), interferón gamma, timosina alfa 1, tasonermina, DigiFab, ViperaTAb, EchiTAb, CroFab, nesiritida, abatacept, alefacept, Rebif, eptoterminalfa, teriparatida (osteoporosis), calcitonina inyectable (enfermedad ósea), calcitonina (nasal, osteoporosis), etanorcept, glutamero de hemoglobina 250 (bovino), drotrecogina alfa, colagenasa, carperitida, factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (gel tópico, cicatrización de heridas), DWP-401, darbepoetina alfa, epoetina omega, epoetina beta, epoetina alfa, desirudina, lepirudina, bivalirudina, nonacog alfa, mononina, eptacog alfa (activado), factor VIII recombinante+VWF recombinante, ractor VIII recombinante, factor VIII (recombinante), alfanato, octocog alfa, factor VIII, palifermina, indiquinasa, tenecteplasa, alteplasa, pamiteplasa, reteplasa, nateplasa, monteplasa, folitropina alfa, rFSH, hpFSH, micafungina, pegfilgrastim, lenograstim, nartograstim, sermorelina, glucagón, exenatida, pramlintida, imiglucerasa, galsulfasa, leucotropina, molgramostim, acetato de triptorelina, histrelina (implante subcutáneo, Hydron), deslorelina, histrelina, nafarelina, depósito de liberación sostenida de leuprolida (ATRIGEL), implante de leuprolida (DUROS), goserelina, somatropina, eutropina, programa KP-102, somatropina, somatropina, mecasermina (retaso del crecimiento), enfuvirtida, Org-33408, insulina glargina, insulina glulisina, insulina (inhalada), insulina lispro, insulina detemir, insulina (bucal, RapidMist), rinfabato de mecasermina, anakinra, celmoleucina, inyección de 99 mTc-apcitida, mielopid, betaserón, acetato de glatiramer, gepón, sargramostim, oprelvekina, alfa interferones derivados de leucocitos humanos, Bilive, insulina (recombinante), insulina humana recombinante, insulina aspart, mecasermina, Roferon-A, interferón alfa 2, Alfaferona, interferón alfacón-1, interferón alfa, hormona luteinizante humana recombinante Avonex, alfa dornasa, trafermin, ziconotida, taltirelina, diboterminalfa, atosiban, becapermina, eptifibatida, Zemaira, CTC-111, Shanvac-B, Vacuna contra el VPH (cuadrivalente), NOV-002, octreótido, lanreotida, aneastim, beta agalsidasa, alfa agalsidasa, laronidasa, acetato cúprico de prezatida (gel tópico), rasburicasa, ranibizumab, Actimmune, PEG-Intrón, Tricomín, inyección de desensibilización por alergia a los ácaros del polvo recombinante, hormona paratiroidea humana recombinante (PTH) 1-84 (sc, osteoporosis), delta de epoetina, antitrombina transgénica III, Granditropina, Vitrasa, insulina recombinante, interferón alfa (pastilla oral), GEM-2 IS, vapreotida, idursulfasa, omapatrilat, seroalbúmina recombinante, certolizumab pegol, glucarpidasa, inhibidor recombinante humano de C1 esterasa (angioedema), lanoteplasa, hormona de crecimiento humano recombinante, enfuvirtida (inyección sin aguja, Biojector 2000), VGV-I, interferón (alfa), lucinactante, aviptadil (inhalado, enfermedad pulmonar), icatibant, ecallantida, omiganan, Aurograb, acetato de pexiganano, ADI-PEG-20, LDI-200, degarelix, cintredequina besudotox, FavId, MDX-1379, ISAtx-247, liraglutida, teriparatida (osteoporosis), tifacogina, AA-4500, loción de liposoma T4N5, catumaxomab, DWP-413, ART-123, crisalina, desmoteplasa, amediplasa, corifolitropina alfa, TH-9507, teduglutida, Diamyd, DWP-412, hormona de crecimiento (inyección de liberación sostenida), G-CSF recombinante, insulina (inhalada, AIR), insulina (inhalada, Technosphere), insulina (inhalada, AERx), RGN-303, DiaPep277, interferón beta (infección viral de hepatitis C (VHC)), interferón alfa-n3 (oral), belatacept, parches transdérmicos de insulina, AMG-531, MBP-8298, Xerecept, opebacan, AIDSvax, GV-1001, LymphoScan, ranpirnasa, lipoxisan, lusupultida, MP52 (portador de beta tricalciofosfato, regeneración ósea), vacuna contra el melanoma, sipuleucel-T, CTP-37, Insegia, vitespen, trombina humana (congelación, sangrado quirúrgico), trombina, TransMID, alfimeprasa, Puricasa, terlipresina (intravenosa, síndrome hepatorenal), EUR-1008M, FGF-I recombinante (inyectable, enfermedad vascular), BDM-E, rotigaptido, ETC-216, P-113, MBI-594AN, duramicina (inhalada, fibrosis quística), SCV-07, OPI-45, endostatina, angiostatina, ABT-510, concentrado de inhibidor de Bowman Birk, XMP-629, 99 mTc-Hynic-Annexin V, kahalalida F, CTCE-9908, teverelix (liberación prolongada), ozarelix, romidepsina, BAY-50-4798, interleucina-4, PRX-321, Pepscan, iboctadekin, rh lactoferrina, TRU-015, IL-21, ATN-161, cilengtida, albuferón, Biphasix, IRX-2, interferón omega, PCK-3145, CAP-232, pasireotida, huN901-DM1, vacuna inmunoterapéutica contra el cáncer de ovario, SB-249553, Oncovax-CL, OncoVax-P, BLP-25, CerVax-16, vacuna contra el melanoma de péptido con múltiples epítomos (MART-I, gp100, tirosinasa), nemifitida, rAAT (inhalado), rAAT (dermatológico), CGRP (inhalado, asma), pegsunercept, timosina beta-4, plitidepsina, GTP-200, ramoplanina, GRASPA, OBI-I, AC-100, calcitonina de salmón (oral, eligen), calcitonina (oral, osteoporosis), examorelina, capromorelina, Cardeva, velafermin, 131I-TM-601, KK-220, TP-10, ularitida, depelestat, hematida, crisalina (tópica), rNAPc2, factor VIII recombinante (liposomal PEGilado), bFGF, variante de estafilocinasa recombinante PEGilada, V-10153, SonoLysis Prolyse, NeuroVax, CZEN-002, terapia de neogénesis de células de los islotes, rGLP-1, BIM-51077, LY-548806, exenatida (liberación controlada, Medisorb), AVE-0010, GA-GCB, avorelin, AOD-9604, acetato de linaclotida, CETi-I, Hemospan, VAL (inyectable), insulina de acción rápida (inyectable, Viadel), insulina intranasal, insulina (inhalada), insulina (oral, eligen), leptina humana metionil recombinante, inyección subcutánea de pitrakinra, eccema), pitrakinra (polvo seco inhalado, asma), Multikine, RG-1068, MM-093, NBI-6024, AT-001, PI-0824, Org-39141, Cpn10 (enfermedades autoinmunitarias/inflamación), talactoferrina (tópica), rEV-131 (oftálmico), rEV-131 (enfermedad respiratoria), insulina humana recombinante oral (diabetes), RPI-78M, oprelvekin (oral), CYT-99007 CTLA4-Ig, DTY-001, valategrast, interferón alfa-n3 (tópico), IRX-3, RDP-58, Tauferón, lipasa estimulada por sales biliares, Merispasa, fosfatasa alcalina, EP-2104R, Melanotan-II, bremelanotida, ATL-104, microplasma humana recombinante, AX-200, SEMAX, ACV-I, Xen-2174, CJC-1008, dinorfina A, SI-6603, LAB GHRH, AER-002, BGC-728, vacuna antipalúdica (viroomas, PeviPRO), ALTU-135, vacuna contra el parvovirus B 19, vacuna antigripal (neuraminidasa recombinante), vacuna antipalúdica/VHB, vacuna contra el ántrax, Vacc-5q, Vacc-4x, Vacuna contra el VIH (oral), Vacuna contra el VPH, Toxoide Tat, YSPSL, CHS-13340, PTH (1-34) crema liposomal (Novasome), Ostabolina-C, análogo de PTH (tópico, psoriasis), MBRI-93.02, Vacuna MTB72F (tuberculosis), Vacuna MVA-Ag85 A (tuberculosis), FAR-404, BA-210, vacuna recombinante contra la peste F1V, AG-702, OxSODro1, rBetV1, Vacuna dirigida a alérgenos Der-p1/Der-p2/Der-p7 (alergia a los

ácaros del polvo), antígeno peptídico PR1 (leucemia), vacuna ras mutante, Vacuna contra el lipopéptido HPV-16 E7, vacuna labyrinthine (adenocarcinoma), Vacuna CML, Vacuna de péptido WT1 (cáncer), IDD-5, CDX-110, Pentrys, Norelin, CytoFab, P-9808, VT-111, icrocaptido, telbermina (dermatológica, úlcera de pie diabético), rupintrivir, reticulosa, rGRF, P1A, alfgalactosidasa A, ACE-011, ALTU-140, CGX-1160, vacuna terapéutica de angiotensina, D-4F, ETC-642, APP-018, rhMBL, SCV-07 (oral, tuberculosis), DRF-7295, ABT-828, Inmunotoxina específica de ErbB2 (anticancerígena), DT388IL-3, TST-10088, PRO-1762, Combotox, péptidos de unión al receptor de colecistoquinina-B / gastrina, 1 1 1In-hEGF, AE-37, trastuzumab-DM1, antagonista G, IL-12 (recombinante), PM-02734, IMP-321, rhIGF-BP3, BLX-883, CUV-1647 (tópico), radioinmunotratamiento (cáncer) basado en IL-19, Re-188-P-2045, AMG-386, vacuna DC/I540/KLH (cáncer), VX-001, AVE-9633, AC-9301, vacuna NY-ESO-I (péptidos), péptidos NA17.A2,

10 vacuna contra el melanoma (antígeno terapéutico pulsado), vacuna contra el cáncer de próstata, CBP-501, lactoferrina humana recombinante (xeroftalmia), FX-06, AP-214, WAP-8294A2 (inyectable), ACP-HIP, SUN-11031, péptido YY [3-36] (obesidad, intranasal), FGLL, ataccept, BR3-Fc, BN-003, BA-058, hormona paratiroidea humana 1-34 (nasal, osteoporosis), F-18-CCR1, AT-1001 (celiaquía/diabetes), JPD-003, PTH (7-34) crema liposómica (Novasome), duramicina (oftálmica, xeroftalmia), CAB-2, CTCE-0214, eritropoyetina glucopegilada, EPO-Fc, CNTO-528, AMG-114, JR-013, Factor XIII, aminocandina, PN-951, 716155, SUN-E7001, TH-0318, BAY-73-7977, teverelix (liberación inmediata), EP-51216, hGH (liberación controlada, bioesfera), OGP-I, sifuvirtida, TV-4710, ALG-889, Org-41259, rh-CCIO, F-991, timpentina (enfermedades pulmonares), r(m)CRP, insulina hepatoselectiva, subalina, proteína de fusión L 19-IL-2, elafina, NMK-150, ALTU-139, EN-122004, rhTPO, agonista del receptor de trombotopoyetina (trastornos trombocitopénicos), AL-108, AL-208, antagonistas del factor de crecimiento nervioso (dolor), SLV-317, CGX-1007, INNO-105, teriparatida oral (eligen), GEM-OS1, AC-162352, PRX-302, vacuna de fusión LFn-p24 (Therapore), EP-1043, vacuna infantil contra *S. pneumoniae*, vacuna contra el paludismo, vacuna contra *Neisseria meningitidis* del grupo B, vacuna estreptocócica neonatal del grupo B, vacuna contra el ántrax, vacuna contra el VHC (gpE1 + gpE2 + MF-59), terapia para la otitis media, vacuna contra el VHC (antígeno núcleo+ISCOMATRIX), hPTH (1-34) (transdérmica, Via-Derm), 768974, SYN-101, PGN-0052, aviscumina, BIM-23190, vacuna contra la tuberculosis, péptido de tirosinasa de múltiples epítomos, vacuna contra el cáncer, enkastim, APC-8024, G1-5005, ACC-OO1, TTS-CD3, TNF vascular dirigido (tumores sólidos), desmopresina (liberación controlada bucal), onercept, TP-9201.

Modificaciones adicionales

30 En determinadas realizaciones, los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA y sus fusiones, pueden comprender además modificaciones postraduccionales. Los ejemplos de modificaciones proteicas postraduccionales incluyen fosforilación, acetilación, metilación, ADP-ribosilación, ubiquitinación, glucosilación, carbonilación, sumoilación, biotilación o adición de una cadena lateral polipeptídica o de un grupo hidrófobo. Como resultado, los dominios

35 ¹⁰F_n3 de unión a HSA y sus fusiones, pueden contener elementos no aminoacídicos, tales como lípidos, poli- o monosacárido y fosfatos. Una forma preferida de glucosilación es la sialilación, que conjuga uno o más residuos de ácido siálico con el polipéptido. Los residuos de ácido siálico mejoran la solubilidad y la semivida en suero al tiempo que también reducen la posible inmunogenicidad de la proteína. Véase, por ejemplo, Raju et al. *Biochemistry* 2001;40:8868-76. Los efectos de dichos elementos no aminoacídicos sobre la funcionalidad de los dominios ¹⁰F_n3

40 de unión a HSA y sus fusiones pueden analizarse con respecto a su capacidad para unirse a dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA particulares y/o el rol funcional conferido por un residuo ¹⁰F_n3 inespecífico en el contexto de una fusión.

E. Realizaciones de vectores y polinucleótidos

45 También se proporcionan en el presente documento ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos que comprenden dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA y fusiones de los mismos) descritos en el presente documento. En consecuencia, en determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento ácidos nucleicos que codifican una cualquiera de las SEQ ID NO: 30-34, 36-40, 42-46, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 65-68, 70, 71, 73-76, 78, 79, 81-84, 86, 87, 89-98, 100-109 y 111-118, cuyas secuencias de ácido nucleico

50 pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la materia a partir de la secuencia de ácido nucleico de 7016_A01 original (SEQ ID NO: 173). También se desvelan en el presente documento ácidos nucleicos que codifican una cualquiera de las SEQ ID NO: 48, 49, 51, 52, 54 y 55.

55 Como aprecian los expertos en la materia, debido a la degradación de la tercera base, casi todos los aminoácidos pueden estar representados por más de un codón triplete en una secuencia de nucleótidos codificante. Además, cambios menores en los pares de bases pueden dar como resultado una sustitución conservativa en la secuencia de aminoácidos codificada, pero no se espera que alteren sustancialmente la actividad biológica del producto génico. Por lo tanto, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido descrito en el presente documento puede modificarse ligeramente en secuencia y aún codificar su producto génico respectivo. En algunas realizaciones, se

60 introducen sustituciones de nucleótidos para no alterar la secuencia de aminoácidos traducida resultante. En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA y fusiones de los mismos tienen secuencias de ácido nucleico que codifican las sustituciones de aminoácidos (en relación con la SEQ ID NO: 23) descritas en el presente documento.

65 Pueden sintetizarse químicamente ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las diversas proteínas o polipéptidos desvelados en el presente documento. El uso codónico se puede seleccionar para mejorar la expresión en una

célula. Dicho uso codónico dependerá del tipo de célula seleccionada. Se han desarrollado patrones de uso codónico especializados para *E. coli* y otras bacterias, así como células de mamíferos, células vegetales, células de levadura o células de insectos. Véanse, por ejemplo: Mayfield *et al.*, PNAS 2003; 100: 438-42; Sinclair *et al.* Protein Expr Purif 2002; 26::96-105; Connell., Curr Opin Biotechnol 2001; 12: 446-9; Makrides *et al.* Microbiol Rev 1996; 60: 512-38; y Sharp *et al.* Yeast 1991; 7: 657-78.

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

Los polipéptidos y las fusiones de los mismos descritos en el presente documento pueden producirse como una proteína 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 el polipéptido maduro. La secuencia de señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa de señal) por la célula hospedadora. Para las células hospedadoras 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, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, 1 pp o líderes de la enterotoxina II termoestables. Para la secreción de levadura, la secuencia señal nativa puede estar sustituida por, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, un líder de factor (incluyendo líderes de factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans* o la señalización descrita en la publicación PCT n.º WO 90/13646. En la expresión en células de mamífero, están disponibles secuencias de señales de mamíferos, así como líderes secretores víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN de dichas regiones precursoras puede ligarse en un marco de lectura con el ADN que codifica la proteína.

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (por ejemplo, levadura, hongos, insecto, planta, animal, ser humano o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están habitualmente disponibles a partir de las regiones 5' y, ocasionalmente, 3' no traducidas de ADN o ADNc eucariota o vírico. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo multivalente. Un componente útil de terminación de la transcripción es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase la publicación PCT n.º WO 94/11026 y el vector de expresión desvelado en la misma.

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

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

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

F. Producción de proteínas

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos en el presente documento para la producción de proteínas y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células hospedadoras utilizadas para producir los dominios ¹⁰F_{n3} de unión a HSA y moléculas de fusión que los comprenden, como se describe en el presente documento, pueden cultivarse en diversos medios. Medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma), medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), (Sigma)) son adecuados para el cultivo de las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth Enz 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal Biochem 102: 255 (1980), patentes de los Estados Unidos n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documento WO90/03430; documento WO87/00195; o patente de los Estados Unidos n.º Re. 30.985 puede usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se pueden incluir cualesquiera otros complementos necesarios a concentraciones adecuadas que conocerán los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión y serán evidentes para el experto habitual en la materia.

También se pueden producir dominios ¹⁰F_{n3} de unión a HSA y moléculas de fusión que los comprenden, como se describe en el presente documento, utilizando sistemas de traducción sin células. Con dicho fin, los ácidos nucleicos que codifican la proteína de armazón basada en fibronectina deben modificarse para permitir la transcripción *in vitro* para producir ARNm y para permitir la traducción sin células del ARNm en el sistema sin células particular que se utiliza (eucariótico, tal como un sistema de traducción de mamíferos o levaduras sin células, o procariótico, tal como un sistema de traducción bacteriano sin células).

También se pueden producir dominios ¹⁰F_{n3} de unión a HSA y moléculas de fusión que los comprenden, como se describe en el presente documento, mediante síntesis química (por ejemplo, mediante los métodos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL). También se pueden producir modificaciones de la proteína de armazón basada en fibronectina mediante síntesis química.

Los dominios ¹⁰F_{n3} de unión a HSA y moléculas de fusión que los comprenden, como se describe en el presente documento, pueden purificarse mediante métodos de aislamiento/purificación de proteínas conocidos en general en el campo de la química de proteínas. Los ejemplos no limitantes incluyen extracción, recristalización, precipitación por adición de sales (por ejemplo, con sulfato de amonio o sulfato de sodio), centrifugación, diálisis, ultrafiltración, cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de fase normal, cromatografía de fase inversa, filtración en gel, cromatografía de permeación en gel, cromatografía de afinidad, electroforesis, distribución a contracorriente o cualquier combinación de estas. Después de la purificación, los aglutinantes de seroalbúmina y las moléculas de fusión descritas en el presente documento pueden intercambiarse en diferentes tampones y/o concentrarse mediante cualquiera de diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, filtración y diálisis.

Los dominios ¹⁰F_{n3} de unión a HSA purificados y moléculas de fusión que los comprenden, como se describe en el presente documento, son preferentemente al menos 85 % puros, más preferentemente al menos 95 % puros y lo más preferentemente al menos 98 % puros. Independientemente del valor numérico exacto de la pureza, los dominios ¹⁰F_{n3} de unión a HSA y moléculas de fusión que los comprenden, como se describe en el presente documento, son suficientemente puros para su uso como producto farmacéutico.

Los dominios ¹⁰F_{n3} de unión a HSA y moléculas de fusión que los comprenden, como se describe en el presente documento, también se pueden producir utilizando los siguientes protocolos.

Se puede clonar una adnectina en el vector PET9d cadena arriba de un marcador HIS₆ y transformarse en células *E. coli* BL21 DE3 plysS inoculadas en 5 ml de medio LB que contiene kanamicina 50 µg/ml en un formato de 24 pocillos y cultivadas a 37 °C durante una noche. Se preparan cultivos nuevos de 5 ml de medio LB (kanamicina 50 µg/ml) para expresión inducible mediante aspiración de 200 µl del cultivo de una noche y se distribuye en el pocillo adecuado. Los cultivos se cultivan a 37 °C hasta A₆₀₀ 0,6-0,9. Después de la inducción con isopropil-β-tiogalactósido (IPTG) 1 mM, el cultivo se expresa durante 6 horas a 30 °C y se recoge mediante centrifugación durante 10 minutos a 2750 g a 4 °C.

Los sedimentos celulares (en formato de 24 pocillos) se lisan mediante resuspensión en 450 µl de tampón de lisis

(NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 0,5 M, cóctel de inhibidor de proteasa Complete™ 1x sin EDTA (Roche), PMSF 1 mM, CHAPS 10 mM, imidazol 40 mM, lisozima 1 mg/ml, DNasa 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, aprotonina 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pH 8,0) y se agitan a temperatura ambiente durante 1-3 horas. Los lisados se clarifican y se vuelven a colocar en un formato de 96 pocillos mediante transferencia a un Whatman GF/D Unifilter de 96 pocillos equipado con una placa de recogida de 96 pocillos, de 1,2 ml, y se filtran por presión positiva. Los lisados eliminados se transfieren a una placa quelante de níquel o cobalto de 96 pocillos que se había equilibrado con tampón de equilibrado (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 40 mM, pH 8,0) y se incuban durante 5 min. El material no unido se elimina por presión positiva. La resina se lava dos veces con 0,3 ml/pocillo con tampón de lavado n.º 1 (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 0,5 M, CHAPS 5 mM, imidazol 40 mM, pH 8,0). Cada lavado se elimina por presión positiva. Antes de la elución, cada pocillo se lava con 50 μl de tampón de elución (PBS + EDTA 20 mM), se incuba durante 5 min y este lavado se descarta por presión positiva. La proteína se eluye aplicando 100 μl adicionales de tampón de elución a cada pocillo. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, la(s) placa(s) se centrifuga(n) durante 5 minutos a 200 g y la proteína eluida se recoge en placas de captura de 96 pocillos que contienen 5 μl de MgCl_2 0,5 M añadido al fondo de la placa de captura de elución antes de la elución. La proteína eluida se cuantifica usando un ensayo de proteína total con dominio $^{10}\text{Fn3}$ natural como el patrón de proteína.

Para la expresión de adnectinas insolubles, el ácido nucleico que codifica la(s) adnectina(s), seguido del marcador HIS₆, se clona en un vector pET9d (EMD Bioscience, San Diego, CA) y se expresa en células *E. coli* HMS 174. Se usan veinte ml de un cultivo de inóculo (generado a partir de una sola colonia sembrada en placa) para inocular 1 litro de medio LB que contiene carbenicilina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y cloranfenicol 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El cultivo se deja crecer a 37 °C hasta A₆₀₀ 0,6-1,0. Después de la inducción con isopropil- β -tiogalactósido (IPTG) 1 mM, el cultivo se cultiva durante 4 horas a 30 °C y se recoge mediante centrifugación durante 30 minutos a > 10.000 g a 4 °C. Los sedimentos celulares se congelan a -80 °C. El sedimento celular se resuspende en 25 ml de tampón de lisis (aH_2P_4 20 mM, NaCl 0,5 M, cóctel de inhibidor de proteasa Complete 1x sin EDTA (Roche), PMSF 1 mM, pH 7,4) usando un homogeneizador ULTRA-TURRAX® (IKA works) en hielo. Se logra lisis celular mediante homogeneización a alta presión (>124,07 Mpa (18.000 psi)) utilizando un MICROFLUIDIZER® Modelo M-1 10S (Microfluidics). La fracción insoluble se separa mediante centrifugación durante 30 minutos a 23.300 g a 4 °C. El sedimento insoluble recuperado de la centrifugación del lisado se lava con fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 mM, pH7.4. El sedimento se resolubiliza en clorhidrato de guanidina 6,0 M en fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 M pH 7,4 con sonicación seguido de incubación a 37 °C durante 1-2 horas. El sedimento resolubilizado se filtra a 0,45 μm y se carga en una columna Histrap equilibrada con el tampón de fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 M/guanidina 6,0 M pH 7,4. Tras la carga, la columna se lava durante 25 VC adicionales con el mismo tampón. La proteína unida se eluye con imidazol 50 mM en fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 mM/guan-HC1 6,0 M pH 7,4. La proteína purificada se repliega mediante diálisis frente a acetato de sodio 50 mM/NaCl 150 mM pH 4,5.

Para la expresión de adnectinas solubles, el ácido nucleico que codifica la(s) adnectina(s), seguido del marcador HIS₆, se clona en un pET9d (EMD Bioscience, San Diego, CA) y se expresan en células *E. coli* HMS174. Se usan veinte ml de un cultivo de inóculo (generado a partir de una sola colonia sembrada en placa) para inocular 1 litro de medio LB que contiene carbenicilina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y cloranfenicol 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El cultivo se deja crecer a 37 °C hasta A₆₀₀ 0,6-1,0. Después de la inducción con isopropil- β -tiogalactósido (IPTG) 1 mM, el cultivo se cultiva durante 4 horas a 30 °C y se recoge mediante centrifugación durante 30 minutos a >10.000 g a 4 °C. Los sedimentos celulares se congelan a -80 °C. El sedimento celular se resuspende en 25 ml de tampón de lisis (NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 0,5 M, cóctel de inhibidor de proteasa Complete 1x sin EDTA (Roche), PMSF 1 mM, pH 7,4) usando un homogeneizador ULTRA-TURRAX® (IKA works) en hielo. Se logra lisis celular mediante homogeneización a alta presión (>124,07 Mpa (18.000 psi)) utilizando un MICROFLUIDIZER® Modelo M-1 10S (Microfluidics). La fracción soluble se separa por centrifugación durante 30 minutos a 23.300 g 4 °C. El sobrenadante se clarifica mediante un filtro de 0,45 μm . El lisado clarificado se carga en una columna Histrap (GE) preequilibrada con fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 M pH 7,4. Después se lavó la columna con 25 volúmenes de columna del mismo tampón, seguido de 20 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 M/imidazol 25 mM, pH 7,4 y después 35 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 M/imidazol 40 mM, pH 7,4. La proteína se eluye con 15 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 M/imidazol 500 mM, pH 7,4, las fracciones se agrupan en función de la absorbancia a A₂₈₀ y se dializan frente a PBS 1x, Tris 50 mM, NaCl 150 mM; pH 8,5 o NaOAc 50 mM; NaCl 150 mM; pH4.5. Cualquier precipitado se elimina mediante filtración a 0,22 μm .

55 **G. Captura de imágenes, diagnóstico y otras aplicaciones**

Las fusiones de $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA proporcionadas en este documento pueden usarse para tratar diversas enfermedades y trastornos, en función de la identidad de la molécula heteróloga fusionada con el dominio $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA. Las aplicaciones para las fusiones de $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA pueden ser determinadas por el experto en la materia basándose en el conocimiento de la técnica y la información proporcionada en el presente documento. Se describen usos para diversas proteínas de fusión de $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA en detalle en el presente documento. Pueden administrarse fusiones de $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA a cualquier sujeto o paciente mamífero, incluyendo organismos tanto humanos como no humanos.

65 Los dominios $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA y moléculas de fusión descritas en el presente documento pueden marcarse de manera detectable y usarse para entrar en contacto con células que expresen, por ejemplo, una proteína que se une

con la molécula de fusión para aplicaciones de captura de imágenes o diagnóstico. Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugar una proteína con el residuo detectable, incluyendo los métodos descritos por Hunter *et al.*, Nature 1962; 144: 945; David *et al.*, Biochemistry 1974; 13: 1014; Pain *et al.*, J Immunol Meth 1981; 40: 219; y Nygren, Histochem and Cytochem 1982; 30: 407.

5 En determinadas realizaciones, los dominios $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA y moléculas de fusión que los comprenden, como se describe en el presente documento, se unen además a un marcador que se puede detectar (por ejemplo, el marcador puede ser un radioisótopo, compuesto fluorescente, enzima o cofactor enzimático). El marcador puede ser un agente radioactivo, tal como: metales pesados radioactivos tales como quelatos de hierro, quelatos radioactivos de gadolinio o manganeso, emisores de positrones de oxígeno, nitrógeno, hierro, carbono o galio, ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{132}I o ^{99}Tc . En determinadas realizaciones, el marcador puede ser un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. El dominio $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA o la molécula de fusión fijada a dicho residuo se puede usar como un agente de captura de imágenes y se administra en una cantidad eficaz para uso de diagnóstico en un mamífero tal como un ser humano y después se detecta la localización y acumulación del agente de captura imágenes. La localización y acumulación del agente de captura de imágenes puede detectarse mediante radioescintigrafía, captura de imágenes por resonancia magnética nuclear, tomografía computarizada o tomografía de emisión de positrones. Como será evidente para el experto en la materia, la cantidad de radioisótopo para administrar depende del radioisótopo. Los expertos habituales en la técnica pueden formular fácilmente la cantidad del agente de captura de imágenes para administrar basándose en la actividad específica y la energía de un radionúclido dado usado como el residuo activo.

Los dominios $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA y moléculas de fusión que los comprenden, como se describe en el presente documento, también son útiles como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, las proteínas se inmovilizan en un soporte adecuado, tal como una resina Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. Las proteínas pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, págs. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)).

30 **H. Caracterización biofísica y bioquímica**

Ensayos in vitro para afinidad de unión

Las adnectinas que se unen a HSA se pueden identificar usando diversos ensayos *in vitro*. En determinadas realizaciones, los ensayos son ensayos de alto rendimiento que permiten la exploración de múltiples adnectinas candidatas simultáneamente.

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

45 En determinadas realizaciones, las interacciones biomoleculares se pueden supervisar en tiempo real con el sistema Biacore®, que usa RPS para detectar cambios en el ángulo de resonancia de la luz en la superficie de una película delgada de oro sobre un soporte de vidrio debido a cambios en el índice de refracción de la superficie a una distancia de hasta 300 nm. El análisis de Biacore genera constantes de velocidad de asociación, constantes de velocidad de disociación, constantes de disociación de equilibrio y constantes de afinidad. La afinidad de unión se obtiene evaluando las constantes de velocidad de asociación y disociación usando un sistema de resonancia de plasmón superficial Biacore (Biacore, Inc.). Se activa un chip biosensor para acoplamiento covalente de la diana. La diana se diluye e inyecta después sobre el chip para obtener una señal en unidades de respuesta de material inmovilizado. Ya que la señal en unidades de resonancia (UR) es proporcional a la masa de material inmovilizado, esto representa un intervalo de densidades diana inmovilizadas en la matriz. Los datos de asociación y disociación se ajustan simultáneamente en un análisis global para resolver la expresión de velocidad neta para una interacción bimolecular 1:1, produciendo los mejores valores de ajuste de k_{on} , k_{off} y $R_{\text{máx}}$ (respuesta máxima a la saturación). Las constantes de disociación de equilibrio para la unión, K_{D} , se calculan a partir de mediciones RPS como $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$.

60 Las velocidades de disociación (k_{d}), velocidades de asociación (k_{a}) y constantes de equilibrio de disociación (K_{D}) de los dominios $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA descritos en el presente documento para unirse a seroalbúmina de ser humano, mono cinomolgo, rata, de ratón, pueden determinarse utilizando análisis de RPS de Biacore. En determinadas realizaciones, las seroalbúminas respectivas se movilizan en un chip Biacore CM5 a una densidad superficial de ~1200 UR usando acoplamiento convencional de NHS/EDC. Un intervalo de concentración (0,25 nM - 5 μM) del dominio $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA para probar se aplica en tampones de ejecución de HBS-P+ (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, tensioactivo P20 0,05 % v/v) o acetato (acetato de sodio 0,02 mM pH 5,5, NaCl 0,15 M, tensioactivo P20 0,05 % v/v) a las albúminas inmovilizadas. Las mediciones cinéticas se llevan a cabo utilizando una asociación

de 3 minutos y una fase de disociación de 6-10 minutos. Las trazas cinéticas de sensogramas con referencia restada se ajustan a un modelo de unión 1:1 utilizando software Biaevaluation.

5 Debe entenderse que los ensayos descritos anteriormente en el presente documento son ilustrativos y que cualquier método conocido en la técnica para determinar la afinidad de unión entre proteínas (por ejemplo, transferencia basada en fluorescencia (TERF), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y ensayos de unión competitiva (por ejemplo, radioinmunoensayos)) puede usarse para evaluar las afinidades de unión de los Dominios ¹⁰F_n3 de unión a seroalbúmina descritos en el presente documento.

10 En determinadas realizaciones, la temperatura de fusión (T_m) de dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA descritos en el presente documento, de proteínas de fusión que los comprenden, es al menos 50 °C, tal como al menos 51 °C, al menos 52 °C, al menos 53 °C, al menos 54 °C, al menos 55 °C, al menos 56 °C, al menos 57 °C, al menos 58 °C, al menos 59 °C, al menos 60 °C, al menos 61 °C, al menos 62 °C, al menos 63 °C, al menos 64 °C, al menos 65 °C, al menos 66 °C, al menos 67 °C, al menos 68 °C, al menos 69 °C, al menos 70 °C, al menos 71 °C, al menos 72 °C, al menos 73 °C, al menos 74 °C o al menos 75 °C, cuando se mide usando calorimetría de barrido diferencial (CBD) o fluorescencia de barrido térmico (FBT).

20 En determinadas realizaciones, la temperatura de fusión (T_m) de dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA descritos en el presente documento, o proteínas de fusión que los comprenden, es 50-75 °C, tal como 51-75 °C, 52-75 °C, 53-75 °C, 54-75 °C, 55-75 °C, 56-75 °C, 57-75 °C, 58-75 °C, 59-75 °C, 60-75 °C, 61-75 °C, 62-75 °C, 63-75 °C, 64-75 °C, 65-75 °C, 66-75 °C, 67-75 °C, 68-75 °C, 69-75 °C, 70-75 °C, 50-74 °C, 50-73 °C, 50-72 °C, 50-71 °C, 50-70 °C, 50-69 °C, 50-68 °C, 50-67 °C, 50-66 °C, 50-65 °C, 50-64 °C, 50-63 °C, 50-62 °C, 50-61 °C, 50-60 °C, 50-59 °C, 50-58 °C, 50-57 °C, 50-56 °C, 50-55 °C, 51-74 °C, 52-73 °C, 53-71 °C, 54-70 °C o 55-65 °C, cuando se mide usando calorimetría de barrido diferencial (CBD) o fluorescencia de barrido térmico (FBT).

25

I. Usos terapéuticos *in vivo*

30 En el presente documento se proporcionan dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA y moléculas de fusión que los comprenden de modo que sean útiles en el tratamiento de trastornos. En el caso de proteínas de fusión que comprenden un dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA, las enfermedades o trastornos que se pueden tratar estarán determinados por la especificidad de unión del residuo, por ejemplo, un segundo dominio ¹⁰F_n3 que está ligado a la adnectina. Como se describe en el presente documento, las proteínas de armazón basadas en fibronectina pueden diseñarse para unirse a cualquier diana de interés. En una realización, la diana es PCSK9. Las proteínas de armazón basadas en fibronectina que se unen a PCSK9 y las proteínas de fusión que las comprenden pueden utilizarse para tratar la aterosclerosis, hipercolesterolemia y otras enfermedades relacionadas con el colesterol.

35

40 La solicitud también proporciona métodos para administrar proteínas de armazón basadas en fibronectina a un sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En determinadas realizaciones, las proteínas de armazón basadas en fibronectina son farmacéuticamente aceptables para un mamífero, en particular, un ser humano. Una composición "farmacéuticamente aceptable" se refiere a una composición que se administra a un animal sin consecuencias médicas adversas significativas. Los ejemplos de composiciones farmacéuticamente aceptables incluyen composiciones que comprenden polipéptidos que comprenden dominios ¹⁰F_n3 que carecen del dominio de unión a integrina (RGD) y composiciones que esencialmente carecen de endotoxinas o pirógenos o tienen niveles muy bajos de endotoxinas o pirógenos.

45

J. Formulaciones y administración

50 En el presente documento se proporcionan métodos para administrar un residuo (por ejemplo, un residuo terapéutico) fusionado con un dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA, en donde la semivida del residuo se extiende cuando se fusiona con el dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA. Las técnicas y las dosis para administración de las construcciones de fusión variarán dependiendo del tipo de residuo terapéutico fusionado con el dominio ¹⁰F_n3 de unión a HSA y la afección específica que se está tratando, pero pueden ser determinadas fácilmente por el experto en la materia. En general, las agencias reguladoras requieren que un reactivo proteico que se va a usar como producto terapéutico se formule para tener niveles aceptablemente bajos de pirógenos. En consecuencia, las formulaciones terapéuticas se distinguirán en general de otras formulaciones en que sustancialmente carecen de pirógenos o al menos no contienen más que niveles aceptables de pirógenos según lo determinado por la agencia reguladora apropiada (por ejemplo, FDA).

55

60 En determinadas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas de dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA y moléculas de fusión que los comprenden, como se describe en el presente documento, comprenden, por ejemplo, ácido succínico 1-20 mM, sorbitol al 2-10 % y glicina al 1-10 % a pH 4,0-7,0. En una realización ilustrativa, las formulaciones farmacéuticas de dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA y sus moléculas de fusión comprenden, por ejemplo, ácido succínico 10 mM, sorbitol al 8 % y glicina al 5 % a pH 6,0.

65 En determinadas realizaciones, los dominios ¹⁰F_n3 de unión a HSA y fusiones que los comprenden, como se describe en el presente documento, son farmacéuticamente aceptables para un mamífero, en particular, un ser

humano. Un polipéptido "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un polipéptido que se administra a un animal sin consecuencias médicas adversas significativas. Los ejemplos de dominio $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA farmacéuticamente aceptable y fusiones que los comprenden, como se describe en el presente documento, incluyen dominios $^{10}\text{Fn3}$ que carecen del dominio de unión a integrina (RGD) y composiciones de dominios $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA o fusiones de dominios $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA que esencialmente carecen de endotoxinas o tienen niveles muy bajos de endotoxinas.

Las composiciones (por ejemplo, composiciones terapéuticas) pueden administrarse con un vehículo (por ejemplo, un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable), en forma de dosificación unitaria. La administración puede ser parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo), oral o tópica, como ejemplos no limitantes. La composición puede estar en forma de una píldora, comprimido, cápsula, líquido o comprimido de liberación sostenida para administración oral; un líquido para vía administración intravenosa, subcutánea o parenteral; o un gel, loción, pomada, crema, o un polímero u otro vehículo de liberación sostenida para administración local.

Se encuentran métodos bien conocidos en la técnica para preparar formulaciones, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20^a ed., ed. A. R. Gennaro A R., 2000, Lippincott Williams y Wilkins, Filadelfia, Pa.). Las formulaciones para administración parenteral pueden, por ejemplo, contener excipientes, agua estéril, solución salina, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal o naftalenos hidrogenados. Pueden usarse polímero de lactida biocompatible, biodegradable, copolímero de lactida/glicólido o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno para controlar la liberación de los compuestos. Pueden usarse formulaciones de nanopartículas (por ejemplo, nanopartículas biodegradables, nanopartículas lipídicas sólidas, liposomas) para controlar la biodistribución de los compuestos. Otros sistemas de suministro parenteral potencialmente útiles incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas. La concentración del compuesto en la formulación varía dependiendo de varios factores, incluyendo la dosis del fármaco para administrar y la vía de administración.

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

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

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

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a una dosis que produce los efectos terapéuticos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del trastorno a tratar, y un experto en la materia puede determinarla utilizando técnicas conocidas. En general, el dominio $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA o fusión de dominio $^{10}\text{Fn3}$ de unión a HSA se administra a aproximadamente 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente 50 mg/kg al día, preferentemente de 0,01 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg al día, más preferentemente de 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg al día. El polipéptido se puede administrar diariamente (por ejemplo, una vez, dos veces, tres veces o cuatro veces al día) o con menos frecuencia (por ejemplo, una vez cada dos días, una o dos veces a la semana, una vez cada dos semanas o mensualmente). Además, como se sabe en la materia, puede ser necesario realizar ajustes en función de la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el género, la alimentación, el tiempo de administración, la interacción con fármacos y la gravedad de la enfermedad y los expertos en la materia podrán determinarlos con experimentación habitual.

La divulgación anterior describe en general la presente divulgación, que se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos. Estos ejemplos específicos se describen únicamente con fines ilustrativos. Aunque se han empleado en el presente documento dianas, términos y valores específicos, dichas dianas, términos y valores se entenderán de manera similar como ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de seroalbúmina humana de unión a dominios $^{10}\text{Fn3}$ de variantes basados en ADX_2629_E06

La Adnectina ADX_7016_A01 (también denominada Adnectina PKE2 en este documento) se aisló como un polipéptido que se une al dominio I-II de HSA con la siguiente secuencia núcleo:

EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYIT
 5 VYAVTGSGESPASSKPI SINYRT (SEQ ID NO: 23; los bucles CD y FG están subrayados)

La ADX_7016_A01 tiene baja inmunogenicidad y se une a HSA con una K_D de aproximadamente 3-6 nM. Un polipéptido que comprende una adnectina de unión a PCSK9 fusionada a ADX_7016_A01 tiene una semivida de aproximadamente 82 horas en ratones. Para aumentar la versatilidad de los intervalos de semivida de los
 10 compañeros de fusión (por ejemplo, en determinadas situaciones, puede preferirse una semivida más corta que la conferida por ADX_7016_A01), el bucle CD y/o FG de ADX_7016_A01 se sometió a mutagénesis (sustituciones individuales o dobles) y se identificaron adnectinas que presentaban una tasa de desactivación (kd) menor que ADX_7016_A01. Estas adnectinas se denominan en el presente documento adnectinas "PKE3".

15 Se generaron sustituciones de aminoácidos individuales en el bucle CD o FG (en relación con el bucle CD o FG de ADX_7016_A01) que conservan la baja inmunogenicidad del polipéptido para identificar una serie de moléculas con un intervalo de afinidades diferentes para HSA (K_D esperado en el intervalo de bajo nM a μ M).

Se produjo un modelo de homología para ADX_7016_A01 (basado en su adnectina original) utilizando herramientas de modelado de homología convencional dentro del Molecular Operating Environment (MOE), Chemical Computing Group Inc., Montreal, QC, Canadá). El sitio de unión modelado de ADX_7016_A01 en complejo con HSA mostró que
 20 había dos regiones de la adnectina en contacto. Los restos seleccionados del bucle FG forman interacciones débiles con HSA, mientras que los principales restos de contacto se encuentran en el bucle CD (ubicado en el "polo sur"). Usando el protocolo CalculateInteractionEnergy de DISCOVERY STUDIO (Dassault Systemes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, San Diego), se calcularon las energías de interacción para adnectina unida a HSA. Todos los restos que se prevé que contribuyan más a la unión a HSA se encuentran en el bucle de CD. Se generó una tabla que muestra las interacciones explícitas de restos utilizando el protocolo de análisis de interacción de proteínas de BIOLUMINATE. Al combinar las energías de interacción con el tipo y la cantidad de interacción, los
 25 restos en los bucles CD y FG de la adnectina se clasificaron para estudios mutacionales.

En función de los resultados del análisis del sitio de unión, las posiciones se seleccionaron para mutagénesis. Estos aminoácidos se seleccionaron para ser pequeños y polares y se predeciría que disminuirían el contacto superficial con aminoácidos en HSA cuando se usaran en el estudio mutacional. Se realizaron estudios de mutación
 30 computacional en los que se sustituyó cada una de las posiciones y se calcularon las energías de interacción para adnectina unida a HSA. Se identificaron posiciones específicas donde las interacciones calculadas predecirían una disminución de la afinidad de adnectina-HSA. Los mutantes también se diseñaron para no aumentar el riesgo previsto de epítopos de linfocitos T. Los mutantes se seleccionaron en función de que no aumentarían el riesgo previsto de epítopos de linfocitos T y tenían las puntuaciones de inmunogenicidad más bajas posibles (puntuaciones de iDAB).
 35

La puntuación de inmunogenicidad de iDAB se basa en IEDB (como se describe en Vita *et al.*, Nucleic Acids Res 2015; 43 (número de bases de datos): D405-12) y es proporcional a la fracción de 15 unidades en la secuencia proteica que se predice que muestran alta afinidad de unión con al menos 4 de los 8 alelos encontrados habitualmente en la población mundial. La puntuación se obtiene mediante un ajuste de regresión lineal de la
 40 fracción de 15 unidades de unión fuerte a las afinidades de unión experimentales. Para las posiciones identificadas en el análisis del sitio de unión, se identificaron mutantes individuales que se predijo que tenían puntuaciones bajas de inmunogenicidad y se combinaron en mutantes dobles.

Los mutantes simples y dobles resultantes se resumen en las Tablas 1-3 (las sustituciones enumeradas están en
 50 relación con las posiciones en la secuencia de núcleo 7016_A01 expuesta en la SEQ ID NO: 23).

Tabla 1.

ID de adnectina	Posición en la secuencia de núcleo 7016_A01 (SEQ ID NO: 23)	Resto en 7016_A01	Resto en variante	Bucle con sustitución	Puntuación de inmunogenicidad de iDAB
¹⁰ F _n 3 ts					-37,8
SGE					-37,8
ADX_7016_A01					-0,3
1	44	Y	Q	CD	-23,2
2	44	Y	E	CD	-30,8
3	44	Y	S	CD	-23,2
4	44	Y	A	CD	-27,0
5	41	L	D	CD	-11,7
6	41	L	S	CD	-11,7

(continuación)

ID de adnectina	Posición en la secuencia de núcleo 7016_A01 (SEQ ID NO: 23)	Resto en 7016_A01	Resto en variante	Bucle con sustitución	Puntuación de inmunogenicidad de iDAB
7	41	L	A	CD	-11,7
8	38	L	S	CD	-0,3
9	38	L	T	CD	-0,3
10	38	L	A	CD	-0,3
11	33	Q	D	CD	-0,3
12	30	R	D	CD	-23,2
13	30	R	E	CD	-11,7
14	30	R	A	CD	-0,3
15	30	R	Q	CD	-11,7
16	30	R	N	CD	-4,1
17	42	Y	A	CD	-0,3
18	42	Y	T	CD	-0,3
19	43	I	D	CD	-15,5
20	43	I	S	CD	-7,9
21	43	I	A	CD	-7,9
22	35	Y	S	CD	-0,3
23	35	Y	A	CD	-0,3
24	85	K	A	FG	-0,3
25	85	K	T	FG	-0,3
26	85	K	S	FG	-0,3

Se realizaron sustituciones dobles de aminoácidos en el bucle CD (es decir, mutaciones CD/CD), en relación con el bucle CD de ADX_7016_A01, como se muestra en la tabla 2.

5

Tabla 2.

Posición de sustitución	Y44E	Y44A	Y44S	Y44Q	L41A	L41S	L41D
L41A	L41A/Y44E	L41A/Y44A	L41A/Y44S	L41A/Y44Q			
L41S	L41S/Y44E	L41S/Y44A	L41S/Y44S	L41S/Y44Q			
L41D	L41D/Y44E	L41D/Y44A	L41D/Y44S	L41D/Y44Q			
I43A	143A/Y44E	143A/Y44A	143A/Y44S	143A/Y44Q	143A/I41A	I43A/I41S	143A/I41D
I43S	143S/Y44E	I43S/Y44A	143S/Y44S	143S/Y44Q	143S/I41A	143S/I41S	143S/I41D
L38A	L38A/Y44E	L38A/Y44A	L38A/Y44S	L38A/Y44Q	L38A/I41A	L38A/I41S	L38A/I41D
L38S	L38S/Y44E	L38S/Y44A	L38S/Y44S	L38S/Y44Q	L38S/I41A	L38S/I41S	L38S/I41D
L38T	L38T/Y44E	L38T/Y44A	L38T/Y44S	L38T/Y44Q	L38T/I41A	L38T/I41S	L38T/I41D
Q33D	Q33D/Y44E	Q33D/Y44A	Q33D/Y44S	Q33D/Y44Q			
R30E	R30E/Y44E	R30E/Y44A	R30E/Y44S	R30E/Y44Q	R30E/I41A	R30E/I41S	R30E/I41D
R30D	R30D/Y44E	R30D/Y44A	R30D/Y44S	R30D/Y44Q	R30D/I41A	R30D/I41S	R30D/I41D
R30A							
R30Q					R30Q/I41A	R30Q/I41S	R30Q/I41D
R30N					R30N/I41A	R30N/I41S	R30N/I41D
Y35A	Y35A/Y44E	Y35A/Y44A	Y35A/Y44S	Y35A/Y44Q	Y35A/I41A	Y35A/I41S	Y35A/I41D
Y35S	Y35S/Y44E	Y35S/Y44A	Y35S/Y44S	Y35S/Y44Q	Y35S/I41A	Y35S/I41S	Y35S/I41D

Se realizaron sustituciones dobles de aminoácidos en los bucles CD y FG (mutaciones CD/FG), en relación con los bucles CD y FG de ADX_7016_A01, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3.

Posición de sustitución	K85A	K85T	K85S
Y44Q	Y44Q/K85A	Y44Q/K85T	Y44Q/K85S
Y44E	Y44E/K85A	Y44E/K85T	Y44E/K85S
Y44S	Y44S/K85A	Y44S/K85T	Y44S/K85S
Y44A	Y44A/K85A	Y44A/K85T	Y44A/K85S
L41D	L41D/K85A	L41D/K85T	L41D/K85S
L41S	L41S/K85A	L41S/K85T	L41S/K85S
L41A	L41A/K85A	L41A/K85T	L41A/K85S
L38S	L38S/K85A	L38S/K85T	L38S/K85S
L38T	L38T/K85A	L38T/K85T	L38T/K85S
L38A	L38A/K85A	L38A/K85T	L38A/K85S
Q33D	Q33D/K85A	Q33D/K85T	Q33D/K85S
R30D	R30D/K85A	R30D/K85T	R30D/K85S
R30E	R30E/K85A	R30E/K85T	R30E/K85S
R30A	R30A/K85A	R30A/K85T	R30A/K85S
R30Q	R30Q/K85A	R30Q/K85T	R30Q/K85S
R30N	R30N/K85A	R30N/K85T	R30N/K85S
Y42A	Y42A/K85A	Y42A/K85T	Y42A/K85S
Y42T	Y42T/K85A	Y42T/K85T	Y42T/K85S
I43D	I43D/K85A	I43D/K85T	I43D/K85S
I43A	I43A/K85A	I43A/K85T	I43A/K85S
Y35S	Y35S/K85A	Y35S/K85T	Y35S/K85S
Y35A	Y35A/K85A	Y35A/K85T	Y35A/K85S

5 Los mutantes presentaron propiedades biofísicas favorables, con solo dos mutantes que tienen un SEC de 2. Los mutantes restantes tenían una SEC de 1. Todos los mutantes también tuvieron alta expresión, a ≥ 1 mg/ml.

Ejemplo 2: Exploración de adnectinas de unión a seroalbúmina humana de velocidad de disociación rápida

10 Las adnectinas de unión a HSA mutantes se exploraron para determinar la afinidad de unión a HSA con el fin de identificar las adnectinas que tenían una velocidad de disociación más alta que la adnectina original natural (es decir, ADX_7016_A01).

15 La exploración de las adnectinas mutantes generadas en el ejemplo 1 identificó cuatro clases de adnectinas: las que se unieron con afinidad similar a la adnectina original, las que tenían alta afinidad de unión (alcanza 100 % de unión), las que tenían afinidad de unión media (<100 % de unión con respecto a la adnectina original) y las que tenían baja afinidad de unión (<50 % de unión con respecto a la adnectina original).

20 Se realizaron mediciones mediante RPS y ELISA. RPS se realizó de la siguiente manera. Se inmovilizó HSA de longitud completa o albúmina de ratón en un chip CM5 de la serie Biacore T a 15 ug/ml en tampón de acetato 10 mM (pH 5,0) usando acoplamiento convencional NHS/EDC, a una densidad superficial de aproximadamente 1000-1100 UR. Para mediciones de velocidad de disociación a 25 °C, se aplicaron adnectinas PKE como analitos a 500 nM en tampón de ejecución HBS-P+ (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, tensioactivo P20 0,005 % v/v) a un caudal de 20 ul/min durante 120 s sobre las albúminas inmovilizadas, seguido de 800 s para disociación. Para mediciones de afinidad cinética llevadas a cabo a 37 °C, se aplicó una serie de concentraciones de las adnectinas PKE (0,05 - 333 nM) en tampón de ejecución HBS-P+ a un caudal de 40 ul/min durante 180 s seguido de disociación durante 240 s o 600 s. Se realizó regeneración de la superficie del chip entre ciclos con dos pulsos de 30 segundos de glicina 10 mM, pH 2,0. Las trazas cinéticas de los sensogramas con resta de referencia se ajustaron a un modelo de unión 1:1 para afinidad utilizando el software Biaevaluation. Solo la fase de disociación fue adecuada para la determinación de las velocidades de disociación.

35 Se realizaron ensayos ELISA de unión directa de la siguiente manera. Se revistieron placas Nunc Maxisorp durante una noche a 4 °C con seroalbúmina humana y murina de longitud completa a 10 ug/ml en PBS. Las placas se bloquearon en tampón de caseína/PBS. Se permitió que las adnectinas PKE se unieran en un intervalo de concentración de 4 puntos de 0,032 - 4 uM para HSA y 0,008 - 1 uM para MSA. La adnectina unida se detectó mediante anticuerpo anti-His conjugado con HRP (peroxidasa de rábano picante) diluido 1:1500 en caseína/PBS. Las placas se desarrollaron con sustrato TMB y se leyó la absorbancia a 450 nm. Las adnectinas se agruparon como agentes de unión de alta, media y baja afinidad en función de la Y_{máx} observada de las curvas de respuesta a concentración.

Los resultados para un subconjunto de las adnectinas variantes, incluyendo análisis por RPS y datos de ELISA para unión a HSA y seroalbúmina de ratón (MSA) se proporcionan en la tabla 4.

Tabla 4.

Grupos de DB ELISA	DB ELISA de HSA (DO450)		kd de HSA (s-1)	kd de HSA/kd original	DB ELISA de MSA (DO450)		kd de MSA (s-1)	kd de MSA/kd original
	Ymín obs	Ymáx obs			Ymín obs	Ymáx obs		
MEJOR (cerca al original)								
ADX_6727_C01 (K85A)	88	98	2,97E-04	1,1	90	93	5,09E-04	1,2
ADX_6727_D01 (K85T)	88	97	2,59E-04	1,0	88	91	4,33E-04	1,0
ADX_6727_B01 (K85S)	94	97	3,21 E-04	1,2	88	91	5,01E-04	1,2
ADX_6727_B04 (Y35S/K85S)	62	99	1,10E-03	4,1	74	95	1,42E-03	3,3
ADX_6727_G10 (Y35S/K85A)	54	96	8,92E-04	3,3	54	100	1,38E-03	3,2
ALTO (alcanza 100 % de unión)								
ADX_6727_C07 (R30A/K85S)	44	100	2,18E-03	8	6	94	3,34E-03	7,8
ADX_6727_C03 (Y35S)	31	99	1,07E-03	4	23	95	1,21E-03	2,8
ADX_6727_D02 (R30N)	20	99	1,35E-03	5	17	93	1,18E-03	2,8
ADX_6727_F06 (L41A/K85T)	19	90	2,98E-03	11	4	91	5,50E-03	12,8
ADX_6734_A02 (I43A/Y44E)	4	100	NB	NB	3	100	NB	NB
MEDIO (<100 % de unión)								
ADX_6727_G01 (L41A)	12	79	3,70E-03	14	3	87	6,39E-03	14,9
ADX_6727_F03 (I43Y)	9	89	4,68E-03	17	2	67	3,80E-03	8,9
ADX_6727_D06 (Y44A/K85S)	8	67	5,46E-03	20	1	85	6,22E-03	14,5
ADX_6727_F04 (Y44A/K85A)	6	56	6,24E-03	23	2 77		6,94E-03	16,2
ADX_6727_B05 (I43S/K85T)	4	60	7,49E-03	28	2	63	7,81E-03	18,2
BAJO (<50 % de unión)								
ADX_6727_B11 (Q33D/K85S)	1	12	1,51E-02	56	1	11	NB	NB
ADX_6727_D10 (Q33D/K85T)	2	19	1,34E-02	50	1	42	6,08E-02	142,1
ADX_6727_B09 (L38T/K85T)	2	16	9,21 E-03	34	1	27	2,62E-02	61,2
ADX_6727_H02 (I43S)	2	37	1,39E-02	52	1	39	9,77E-03	22,8
ADX_6727_G05 (I43S/K85A)	2	38	1,43E-02	53	1	32	1,16E-02	27,0

*Nota: Velocidades de disociación para proteínas HTTP medidas a 25°C. La numeración de las sustituciones de aminoácidos enumeradas entre paréntesis con el nombre de Adnectinas se basa en la secuencia de aminoácidos núcleo de ADX_7016_A01 (SEQ ID NO: 23).

5

Como se muestra en las figuras 1 y 2, los sensogramas de velocidad de disociación de HSA (obtenidos mediante análisis por RPS) se correlacionaron con agrupamiento de DB ELISA.

10

Se seleccionaron 15 adnectinas de unión a HSA variantes adicionales para su análisis posterior. Un resumen de los datos de RPS y ELISA para estas variantes, incluyendo los datos de unión a HSA y MSA, se proporciona en la tabla

5 y los sensogramas de velocidad de disociación para estas variantes se proporcionan en la figura 3.

Tabla 5

ID de ADX	kd de HSA (s-1)	kd de HSA/kd original	Unión a HSA (UR)	DB ELISA de HSA		kd de MSA (s-1)	kd de MSA/kd original	Unión a MSA (UR)	DB ELISA de MSA	
				YMIN OBS (DO450)	YMAX X OBS (DO450)				YMIN OBS (DO450)	YMAX OBS (DO450)
	2,69E-04		54	90	94	4,28E-04		95	95	98
6727_G10 (Y35S/K85A)	8,92E-04	3,3	27	54	96	1,38E-03	3,2	63	54	100
6727_G06 (Y35A/K85S)	1,05E-03	3,9	26	69	98	1,43E-03	3,3	66	40	95
6727_F10 (Y35A/K85T)	1,09E-03	4,0	22	61	98	1,56E-03	3,6	55	39	98
6727_B04 (Y35S/K85S)	1,10E-03	4,1	23	62	99	1,42E-03	3,3	62	74	95
6727_A07 (Y44S/K85T)	1,29E-03	4,8	28	60	98	2,22E-03	5,2	56	31	94
6727_G02 (Y44S)	1,50E-03	5,6	33	38	95	2,13E-03	5,0	64	15	91
6727_F07 (Y44S/K85A)	1,76E-03	6,5	35	44	96	2,77E-03	6,5	62	20	96
6727_G04 (Y44S/K85S)	1,77E-03	6,6	28	75	99	2,59E-03	6,0	56	46	94
6727_D03 (L41S)	7,77E-03	28,9	24	3	33	1,34E-02	31,3	43	1	54
6727_E08 (L38T)	8,15E-03	30,3	25	2	12	2,48E-02	57,8	30	1	12
6727_H10 (L41S/K85S)	8,60E-03	32,0	19	5	39	1,46E-02	34,0	35	1	59
6727_B09 (L38T/K85T)	9,21E-03	34,3	19	2	16	2,62E-02	61,2	26	1	27
6727_H08 (L38T/K85T)	1,00E-02	37,3	18	2	17	2,84E-02	66,3	23	1	21
6727_H06 (Y44Q/K85T)	1,42E-02	52,7	24	1	12	1,43E-02	33,5	43	1	33
6727_B03 (Y44Q)	2,14E-02	79,4	14	2	18	1,79E-02	41,9	33	1	23

- 5 *Nota: Velocidades de disociación para proteínas HTTP medidas a 25°C. La numeración de las sustituciones de aminoácidos enumeradas entre paréntesis con el nombre de Adnectinas se basa en la secuencia de aminoácidos núcleo de ADX_7016_A01 (SEQ ID NO: 23).

- 10 En conjunto, los datos muestran que los datos de DB ELISA de HSA/MSA de 4pt se correlacionaron bien con la exploración de velocidad de disociación, es decir, Las adnectinas de unión a HSA con velocidades de disociación más lentas fueron mejores aglutinantes en ELISA (con algunas excepciones).

Ejemplo 3: Afinidad de unión de variantes de PKE3 de velocidad de disociación rápida para seroalbúminas

- 15 Se probaron tres adnectinas de unión a HSA variantes en para determinar la afinidad de unión a HSA, MSA, seroalbúmina de rata (SA de rata) y seroalbúmina de mono cinomolgo (SA de cino) usando análisis por RPS.

- 20 La RPS se llevó a cabo de la siguiente manera. Se inmovilizó seroalbúmina de longitud completa humana, de ratón, de rata y de mono cinomolgo en un chip CM5 de la serie Biacore T a 15 ug/ml en tampón de acetato 10 mM (pH 5,0) usando acoplamiento convencional NHS/EDC, a una densidad superficial de aproximadamente 1000-1100 UR. Para mediciones de velocidad de disociación a 25 °C, se aplicaron adnectinas PKE como analitos a 500 nM en tampón de ejecución HBS-P+ (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, tensoactivo P20 0,005 % v/v) a un caudal de 20 ul/min durante 120 s sobre las albúminas inmovilizadas, seguido de 800 s para disociación. Para mediciones de afinidad cinética llevadas a cabo a 37 °C, se aplicó una serie de concentraciones de las adnectinas PKE (0,05 - 333 nM) en tampón de ejecución HBS-P+ a un caudal de 40 ul/min durante 180 s seguido de disociación durante 240 s o 600 s.
- 25 Se realizó regeneración de la superficie del chip entre ciclos con dos pulsos de 30 segundos de glicina 10 mM, pH 2,0. Las trazas cinéticas de los sensogramas con resta de referencia se ajustaron a un modelo de unión 1:1 para

afinidad utilizando el software Biaevaluation. Solo la fase de disociación fue adecuada para la determinación de las velocidades de disociación.

Los resultados se resumen en la tabla 6 y los sensogramas se proporcionan en las figuras 4A-4D.

5

Tabla 6.

ID de adnectina	Ligando	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	Rmáx (UR)
ADX 7016 A01 (PKE2)	HSA	6,12E+04	3,78E-04	6,2	140
	SA de cino	8,94E+04	3,91E-04	4,4	140
	MSA	2,37E+05	6,68E-04	2,8	115
	SA de rata	1,80E+05	1,43E-03	8,0	120
ADX 7016 G01 (Y44S)	HSA	3,82E+04	3,20E-03	83,7	110
	SA de cino	6,25E+04	4,26E-03	68,1	125
	MSA	2,35E+05	6,29E-03	26,8	100
	SA de rata	3,31E+05	3,46E-02	104	40
ADX_7016_E02 (L38T)	HSA	2,42E+04	1,61E-02	666	50
	SA de cino	1,19E+05	1,71E-01	1430	45
	MSA	6,84E+04	3,43E-02	502	75
	SA de rata	4,94E+04	5,58E-02	1130	45
ADX 7016 C03 (Y44Q)	HSA	3,21E+04	2,85E-02	889	50
	SA de cino	4,12E+04	4,44E-02	1080	60
	MSA	1,15E+05	3,05E-02	265	90
	SA de rata	8,91E+04	1,19E-01	1340	35

Nota: El experimento de SA de cino se realizó usando un chip Biacore diferente

Ejemplo 4: Las adnectinas PKE3 de velocidad de disociación rápida presentan un aclaramiento más rápido que la adnectina PKE2 original natural

- 10 Se probó el aclaramiento de las tres adnectinas PKE3 del ejemplo 3 *in vivo* en ratas Sprague Dawley (n=2/grupo). Se administró a las ratas una única dosis IV de cada adnectina PKE3 (2 mg/kg) y se recogió plasma en los siguientes puntos temporales: 5 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 1 día, 2 días, 3 días, 5 días y 7 días.

- 15 Como se muestra en la figura 5, la adnectina PKE2 original (ADX_7016_A01) presentó la semivida más larga, mientras que las tres adnectinas PKE3 tenían semividas más cortas. Se observaron resultados similares en ratones (figura 6).

Tabla 7: RESUMEN DE SECUENCIAS

SEQ ID	Descripción	Secuencia
1	Dominio ¹⁰ F _n 3 humano natural	VSDVPRDLEVVAATPTSLISW DAPAVTVRY YRITYGETGGNSPVQEF TV PGSKST ATISGLKPGVDYITITVYA VTGRGDSPASSKP ISINYRT
2	Dominio ¹⁰ F _n 3 humano natural con secuencias de bucle definidas de manera genérica	VSDVPRDLEVVA(A) _u LLISW(X) _v YRITY(X) _w FTV(X) _x ATISGL (X) _y YTITVYA(X) _z ISINYRT
3	Líder del extremo N	MGVSDVPRDL
4	Líder del extremo N	GVSDVPRDL
5	Líder del extremo N	X _n SDVPRDL

ES 2 781 207 T3

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
6	Líder del extremo N	X _n DVPRDL
7	Líder del extremo N	X _n VPRDL
8	Líder del extremo N	X _n PRDL
9	Líder del extremo N	X _n RDL
10	Líder del extremo N	X _n DL
11	Líder del extremo N	MASTSG
12	Cola del extremo C	EIEK
13	Cola del extremo C	EGSGC
14	Cola del extremo C	EIEKPCQ
15	Cola del extremo C	EIEKPSQ
16	Cola del extremo C	EIEKP
17	Cola del extremo C	EIEKPS
18	Cola del extremo C	EIEKPC
19	Cola del extremo C	EIDK
20	Cola del extremo C	EIDKPCQ
21	Cola del extremo C	EIDKPSQ
22	Cola de His 6X	HHHHHH
23	núcleo 7016_A01 (también conocido como 2629_E06; Adnectina PKE2 original); los bucles CD y FG están subrayados	EVVAATPTSL ^{LI} SWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS ^{DL} GPLYIYQ ^{EFT} VPGSKSTATISGLKPGVDY ^{TI} TVYAVTGS ^{GESPASSKPI} SIN ^{YRT}
24	7016_A01	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSL ^{LI} SWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS ^{DL} GPLYIYQ ^{EFT} VPGSKSTATISGLKPGVDY ^{TI} TVYAVTGS ^{GESPASSKPI} SIN ^{YRTEIDKPSOHHHHHH}
25	7016_A01 sin marcador de his, cola del extremo C y MG del extremo N	VSDVPRDLEVVAAATPTSL ^{LI} SWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS ^{DL} G ^P LYIYQ ^{EFT} VPGSKSTATISGLKPGVDY ^{TI} TVYAVTGS ^{GESPASSKPI} S IN ^{YRT}
26	Núcleo 7016_A01 con prolina del extremo C	EVVAATPTSL ^{LI} SWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS ^{DL} GPLYIYQ ^{EFT} VPGSKSTATISGLKPGVDY ^{TI} TVYAVTGS ^{GESPASSKPI} SIN ^{YRTP}

ES 2 781 207 T3

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
27	7016_A01 sin marcador de his, cola del extremo C y MG del extremo N y con prolina del extremo C	VSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VP GS KSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GE SPASSKPI S IN Y RTP
28	Bucle CD de 7016_A01	GREVQKYS DL GPLYIYQ E
29	Bucle FG de 7016_A01	VTGS GE SPASSKPI
30	Núcleo 7016_G01 (Y44S) (también conocido como 6727_G02)	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VP GS KSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GE SPASSKPI S IN Y RTP
31	7016_G01	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VP GS KSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GE SPASSKPI S IN Y RTEIDKPSOHHHHHH
32	7016_G01 sin marcador de his, cola del extremo C y MG del extremo N	VSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VP GS KSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GE SPASSKPI S IN Y RTP
33	Núcleo 7016_G01 con prolina del extremo C	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VP GS KSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GE SPASSKPI S IN Y RTP
34	7016_G01 sin marcador de his, cola del extremo C y MG del extremo N y con prolina del extremo C	VSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VP GS KSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GE SPASSKPI S IN Y RTP
35	Bucle CD de 7016_G01	GREVQKYS DL GPLYIYQ E
36	Núcleo 7016_E02 (L38T) (también conocido como 6727_E08)	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VP GS KSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GE SPASSKPI S IN Y RTP
37	7016_E02	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VP GS KSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GE SPASSKPI S IN Y RTEIDKPSOHHHHHH
38	7016_E02 sin marcador de his, cola del extremo C y MG del extremo N	VSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VP GS KSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GE SPASSKPI S IN Y RTP
39	Núcleo 7016_E02 con prolina del extremo C	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VP GS KSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GE SPASSKPI S IN Y RTP

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
40	7016_E02 sin marcador de his, cola del extremo C y MG del extremo N y con prolina del extremo C	VSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTP
41	Bucle CD de 7016_E02	GREVQKYSDLGPLYIYQE
42	Núcleo 7016_C03 (Y44Q) (también conocido como 6727_B03)	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTP
43	7016_C03	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSOHHHHHH
44	7016_C03 sin marcador de his, cola del extremo C y MG del extremo N	VSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTP
45	Núcleo 7016_C03 con prolina del extremo C	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTP
46	7016_C03 sin marcador de his, cola del extremo C y MG del extremo N y con prolina del extremo C	VSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTP
47	Bucle CD de 7016_C03	GREVQKYSDLGPLYIYQE
48	Núcleo ADX_6727_C01 (K85A)	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTP
49	ADX_6727_C01	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSOHHHHHH
50	Bucle FG de ADX_6727_C01	VTGSGESPASSKPI
51	Núcleo ADX_6727_D01 (K85T)	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTP
52	ADX_6727_D01	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSOHHHHHH
53	Bucle FG de ADX_6727_D01	VTGSGESPASSKPI
54	Núcleo ADX_6727_B01 (K85S)	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTP
55	ADX_6727_B01	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGSGESPASSKPI SINYRTEIDKPSOHHHHHH
56	Bucle FG de ADX_6727_B01	VTGSGESPASSKPI

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
57	Núcleo ADX_6727_B04 (Y35S/K85S)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKSSDLGPLYIYQEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GESPASSPISINRYT
58	ADX_6727_B04	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKSSDL GPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GESPASSP ISINRYRTEIDKPSOHHHHHH
59	Bucle CD de ADX_6727_B04	GREVQKSSDLGPLYIYQE
56	Bucle FG de ADX_6727_B04	VTGS GESPASSP
60	Núcleo ADX_6727_G10 (Y35S/K85A)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKSSDLGPLYIYQEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GESPASSPISINRYT
61	ADX_6727_G10	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKSSDL GPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GESPASSP ISINRYRTEIDKPSOHHHHHH
59	Bucle CD de ADX_6727_G10	GREVQKSSDLGPLYIYQE
50	Bucle FG de ADX_6727_G10	VTGS GESPASSP
62	Núcleo ADX_6727_C07 (R30A/K85S)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGAEVQKYSDLGPLYIYQEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GESPASSPISINRYT
63	ADX_6727_C07	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGAEVQKYSDL GPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GESPASSP ISINRYRTEIDKPSOHHHHHH
64	Bucle CD de ADX_6727_C07	GAEVQKYSDLGPLYIYQE
56	Bucle FG de ADX_6727_C07	VTGS GESPASSP
65	Núcleo ADX_6727_C03 (Y35S)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKSSDLGPLYIYQEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GESPASSKPI SINRYT
66	ADX_6727_C03	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKSSDL GPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GESPASSKPI ISINRYRTEIDKPSOHHHHHH
59	Bucle CD de ADX_6727_C03	GREVQKSSDLGPLYIYQE
67	Núcleo ADX_6727_D02 (R30N)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGNEVQKYSDLGPLYIYQEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GESPASSKPI SINRYT
68	ADX_6727_D02	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGNEVQKYSDL GPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GESPASSKPI ISINRYRTEIDKPSOHHHHHH
69	Bucle CD de ADX_6727_D02	GNEVQKYSDLGPLYIYQE
70	Núcleo ADX_6727_F06 (L41A/K85T)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GESPASSPISINRYT
71	ADX_6727_F06	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDL GPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS GESPASSP ISINRYRTEIDKPSOHHHHHH
72	Bucle CD de ADX_6727_F06	GREVQKYSDLGPLYIYQE
53	Bucle FG de ADX_6727_F06	VTGS GESPASSP

ES 2 781 207 T3

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
73	Núcleo ADX_6727_G01 (L41A)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL G PL YIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDY TI TVYAVTGS G ESPASS KP ISIN YRT
74	ADX_6727_G01	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL G PL YIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDY TI TVYAVTGS G ESPASS KP ISIN YRTE IDKPSOHHHHHH
72	Bucle CD de ADX_6727_G01	GREVQKYS DL G PL YIYQ E
75	Núcleo ADX_6727_F03 (I43A)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL G PL YIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDY TI TVYAVTGS G ESPASS KP ISIN YRT
76	ADX_6727_F03	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL G PL YIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDY TI TVYAVTGS G ESPASS KP ISIN YRTE IDKPSOHHHHHH
77	Bucle CD de ADX_6727_F03	GREVQKYS DL G PL YIYQ E
78	Núcleo ADX_6727_D06 (Y44A/K85S)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL G PL YIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDY TI TVYAVTGS G ESPASS SP ISIN YRT
79	ADX_6727_D06	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL G PL YIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDY TI TVYAVTGS G ESPASS SP ISIN YRTE IDKPSOHHHHHH
80	Bucle CD de ADX_6727_D06	GREVQKYS DL G PL YIYQ E
56	Bucle FG de ADX_6727_D06	VTGS G ESPASS SP
81	Núcleo ADX_6727_F04 (Y44A/K85A)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL G PL YIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDY TI TVYAVTGS G ESPASS SP ISIN YRT
82	ADX_6727_F04	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL G PL YIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDY TI TVYAVTGS G ESPASS SP ISIN YRTE IDKPSOHHHHHH
80	Bucle CD de ADX_6727_F04	GREVQKYS DL G PL YIYQ E
50	Bucle FG de ADX_6727_F04	VTGS G ESPASS SP
83	Núcleo ADX_6727_B05 (I43S/K85T)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL G PL YIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDY TI TVYAVTGS G ESPASS SP ISIN YRT
84	ADX_6727_B05	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL G PL YIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDY TI TVYAVTGS G ESPASS SP ISIN YRTE IDKPSOHHHHHH
85	Bucle CD de ADX_6727_B05	GREVQKYS DL G PL YIYQ E
53	Bucle FG de ADX_6727_B05	VTGS G ESPASS SP
86	Núcleo ADX_6727_B11 (Q33D/K85S)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL G PL YIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDY TI TVYAVTGS G ESPASS SP ISIN YRT
87	ADX_6727_B11	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL G PL YIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDY TI TVYAVTGS G ESPASS SP ISIN YRTE IDKPSOHHHHHH
88	Bucle CD de ADX_6727_B11	GREVQKYS DL G PL YIYQ E
56	Bucle FG de ADX_6727_B11	VTGS G ESPASS SP

ES 2 781 207 T3

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
89	Núcleo ADX_6727_D10 (Q33D/K85T)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS G ESPASS SP ISIN Y RT
90	ADX_6727_D10	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS G ESPASS SP ISIN Y RT E IDKPSQH HHHHH
88	Bucle CD de ADX_6727_D10	GREVQKYS DL GPLYIYQ E
53	Bucle FG de ADX_6727_D10	VTGS G ESPASS SP
91	Núcleo ADX_6727_B09 (L38T/K85T)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS G ESPASS SP ISIN Y RT
92	ADX_6727_B09	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS G ESPASS SP ISIN Y RT E IDKPSQH HHHHH
41	Bucle CD de ADX_6727_B09	GREVQKYS DL GPLYIYQ E
53	Bucle FG de ADX_6727_B09	VTGS G ESPASS SP
93	Núcleo ADX_6727_H02 (I43S)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS G ESPASS SKP ISIN Y RT
94	ADX_6727_H02	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS G ESPASS SKP ISIN Y RT E IDKPSQH HHHHH
85	Bucle CD de ADX_6727_H02	GREVQKYS DL GPLYIYQ E
95	Núcleo ADX_6727_G05 (I43S/K85A)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS G ESPASS AP ISIN Y RT
96	ADX_6727_G05	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS G ESPASS AP ISIN Y RT E IDKPSQH HHHHH
85	Bucle CD de ADX_6727_G05	GREVQKYS DL GPLYIYQ E
50	Bucle FG de ADX_6727_G05	VTGS G ESPASS AP
97	Núcleo ADX_6727_G06 (Y35A/K85S)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKAS DL GPLYIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS G ESPASS SP ISIN Y RT
98	ADX_6727_G06	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKAS DL GPLYIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS G ESPASS SP ISIN Y RT E IDKPSQH HHHHH
99	Bucle CD de ADX_6727_G06	GREVQKAS DL GPLYIYQ E
56	Bucle FG de ADX_6727_G06	VTGS G ESPASS SP
100	Núcleo ADX_6727_F10 (Y35A/K85T)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKAS DL GPLYIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS G ESPASS SP ISIN Y RT
101	ADX_6727_F10	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKAS DL GPLYIYQ EFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGS G ESPASS SP ISIN Y RT E IDKPSQH HHHHH
99	Bucle CD de ADX_6727_F10	GREVQKAS DL GPLYIYQ E

ES 2 781 207 T3

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
53	Bucle FG de ADX_6727_F10	VTGSGESPASS TP
102	Núcleo ADX_6727_A07 (Y44S/K85T)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYI S QEFT VPGSKSTATISGLKPGVDY T ITVYAVTGS G ESPASS TP ISIN Y RT
103	ADX_6727_A07	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYI S QEFTVPGSKSTATISGLKPGVDY T ITVYAVTGS G ESPASS TP ISIN Y RT E IDKPSQH H H H H H H H
35	Bucle CD de ADX_6727_A07	GREVQKYS DL GPLYI S QE
53	Bucle FG de ADX_6727_A07	VTGSGESPASS TP
104	Núcleo ADX_6727_F07 (Y44S/K85A)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYI S QEFT VPGSKSTATISGLKPGVDY T ITVYAVTGS G ESPASS TP ISIN Y RT
105	ADX_6727_F07	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYI S QEFTVPGSKSTATISGLKPGVDY T ITVYAVTGS G ESPASS TP ISIN Y RT E IDKPSQH H H H H H H H
35	Bucle CD de ADX_6727_F07	GREVQKYS DL GPLYI S QE
50	Bucle FG de ADX_6727_F07	VTGSGESPASS TP
106	Núcleo ADX_6727_G04 (Y44S/K85S)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYI S QEFT VPGSKSTATISGLKPGVDY T ITVYAVTGS G ESPASS TP ISIN Y RT
107	ADX_6727_G04	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYI S QEFTVPGSKSTATISGLKPGVDY T ITVYAVTGS G ESPASS TP ISIN Y RT E IDKPSQH H H H H H H H
35	Bucle CD de ADX_6727_G04	GREVQKYS DL GPLYI S QE
56	Bucle FG de ADX_6727_G04	VTGSGESPASS TP
108	Núcleo ADX_6727_D03 (L41S)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL G P S Y IYQEFT VPGSKSTATISGLKPGVDY T ITVYAVTGS G ESPASS KP ISIN Y RT
109	ADX_6727_D03	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL G P S Y IYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDY T ITVYAVTGS G ESPASS KP ISIN Y RT E IDKPSQH H H H H H H H
110	Bucle CD de ADX_6727_D03	GREVQKYS DL G P S Y IYQE
111	Núcleo ADX_6727_H10 (L41S/K85S)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL G P S Y IYQEFT VPGSKSTATISGLKPGVDY T ITVYAVTGS G ESPASS TP ISIN Y RT
112	ADX_6727_H10	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL G P S Y IYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDY T ITVYAVTGS G ESPASS TP ISIN Y RT E IDKPSQH H H H H H H H
110	Bucle CD de ADX_6727_H10	GREVQKYS DL G P S Y IYQE
56	Bucle FG de ADX_6727_H10	VTGSGESPASS TP
113	Núcleo ADX_6727_H08 (L38T/K85T)	EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYI S QEFT VPGSKSTATISGLKPGVDY T ITVYAVTGS G ESPASS TP ISIN Y RT
114	ADX_6727_H08	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DL GPLYI S QEFTVPGSKSTATISGLKPGVDY T ITVYAVTGS G ESPASS TP ISIN Y RT E IDKPSQH H H H H H H H
41	Bucle CD de ADX_6727_H08	GREVQKYS DL GPLYI S QE

ES 2 781 207 T3

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
53	Bucle FG de ADX_6727_H08	VTGSGESPASSP
115	Núcleo ADX_6727_H06 (Y44Q/K95T)	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIQEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGTGSGESPASSPISINVRT
116	ADX_6727_H06	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDL GPLYIQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGTGSGESPASSP ISINVRTEIDKPSQHSHHHH
47	Bucle CD de ADX_6727_H06	GREVQKYSDLGPLYIQE
53	Bucle FG de ADX_6727_H06	VTGSGESPASSP
117	Núcleo ADX_6734_A02 (I43A/Y44E)	EVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYAQEFT VPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGTGSGESPASSKPI SINVRT
118	ADX_6734_A02	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDL GPLYAQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGTGSGESPASSKPI SINVRTEIDKPSQHSHHHH
119	Bucle CD de ADX_6734_A02	GREVQKYSDLGPLYAQE
120	Enlazador	PSTPPTPSPSTPPTSPS
121	Enlazador	GGSGSGSGSGSGS
122	Enlazador	GGSGSGSGSGSGS
123	Enlazador	GGSGSGSGSGSGSG
124	Enlazador	GSEGSEGSEGSEGSE
125	Enlazador	GGSEGGSE
126	Enlazador	GGSGSGS
127	Enlazador	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
128	Enlazador	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
129	Enlazador	GGGGSGGGSGGGSG
130	Enlazador	GPGPGPG
131	Enlazador	GPGPGPGPGPG
132	Enlazador	PAPAPA
133	Enlazador	PAPAPAPAPAPA
134	Enlazador	PAPAPAPAPAPAPAPAPA
135	Enlazador	PSPEPPTPEP
136	Enlazador	PSPEPPTPEPPSPEPPTPEP
137	Enlazador	PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP
138	Enlazador	PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP
139	Enlazador	EEEEDE
140	Enlazador	EEEEDEEEEEDE
141	Enlazador	EEEEDEEEEEDEEEEEDEEEEEDE
142	Enlazador	EEEEDEEEEEDEEEEEDEEEEEDEEEEEDEEEEEDE
143	Enlazador	RGEEKKKEKEKEEQEERETKTP
144	Enlazador	(PSPEPPTPEP) _n n=1-10
145	Enlazador	(EEEEDE) _n E n=1-10
146	Uso ilustrativo de enlazador	NYRTPGPSPEPPTPEP
147	Uso ilustrativo de enlazador	PSPEPPTPEPGVSDV
148	Cola del extremo C	EIEPKSS
149	Cola del extremo C	EIDKPC

ES 2 781 207 T3

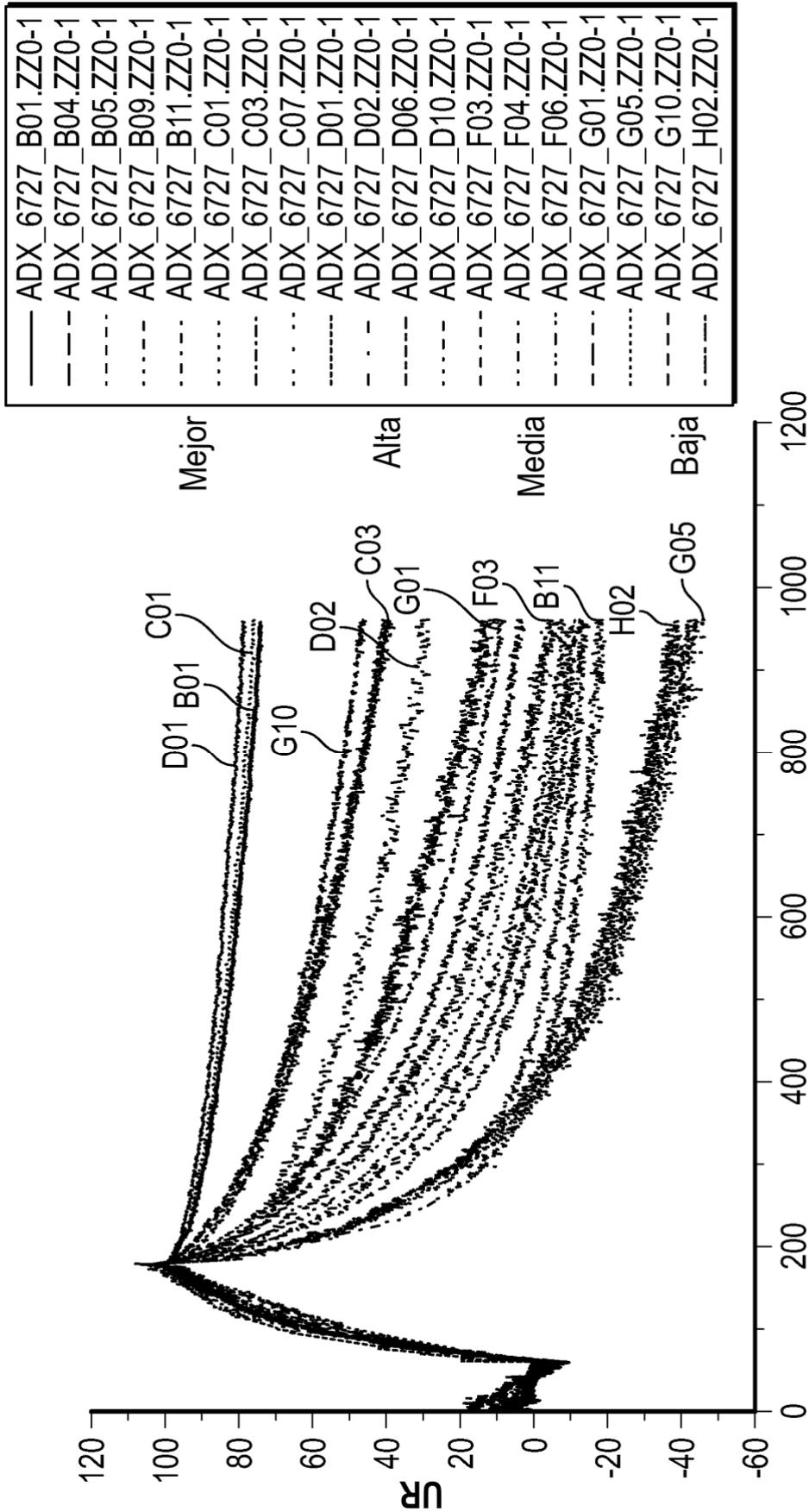
(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
150	Cola del extremo C	EIDKP
151	Cola del extremo C	EIDKPS
152	Cola del extremo C	EIDKPSQLE
153	Cola del extremo C	EIEDEDEDEDED
154	Cola del extremo C	EGSGS
155	Cola del extremo C	EIDKPCQLE
156	Cola del extremo C	EIDKPSQHHHHHH
157	Cola del extremo C	GSGCHHHHHH
158	Cola del extremo C	EGSGCHHHHHH
159	Cola del extremo C	PIDK
160	Cola del extremo C	PIEK
161	Cola del extremo C	PIDKP
162	Cola del extremo C	PIEKP
163	Cola del extremo C	PIDKPS
164	Cola del extremo C	PIEKPS
165	Cola del extremo C	PIDKPC
166	Cola del extremo C	PIEKPC
167	Cola del extremo C	PIDKPSQ
168	Cola del extremo C	PIEKPSQ
169	Cola del extremo C	PIDKPCQ
170	Cola del extremo C	PIEKPCQ
171	Cola del extremo C	PHHHHHH
172	Cola del extremo C	PCHHHHHH
173	7016_A01 (secuencia de ácido nucleico)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACC CCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCGA TATTACCGCATCACTTACGGCAGGGAGGTTTCTGAGTACTCGGACTTG GGTCCGTTGTACATCTACCAAGAGTTCCTGTGCCTGGGAGCAAGTCC ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATAACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), en donde el dominio ¹⁰F_n3 se une a seroalbúmina humana (HSA) con una K_D de 1 μM o menos y comprende bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG, en donde el bucle CD tiene 2 sustituciones de aminoácidos en relación con el bucle CD correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23, en donde las 2 sustituciones de aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en:
- (i) la arginina (R) en la posición 2 del bucle CD se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, E, A, Q o N;
 - (ii) la glutamina (Q) en la posición 5 del bucle CD se sustituye por D;
 - (iii) la tirosina (Y) en la posición 7 del bucle CD se sustituye por un aminoácido seleccionado de S o A;
 - (iv) la leucina (L) en la posición 10 del bucle CD se sustituye por un aminoácido seleccionado de S, T o A;
 - (v) la leucina (L) en la posición 13 del bucle CD se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, S o A;
 - (vi) la tirosina (Y) en la posición 14 del bucle CD se sustituye por un aminoácido seleccionado de A o T;
 - (vii) la isoleucina (I) en la posición 15 del bucle CD se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, S o A; y
 - (viii) La tirosina (Y) en la posición 16 del bucle CD se sustituye por un aminoácido seleccionado de Q, E, S o A.
2. Un polipéptido que comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), en donde el dominio ¹⁰F_n3 se une a seroalbúmina humana (HSA) con una K_D de 1 μM o menos y comprende bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG, en donde el bucle CD tiene 1 sustitución de aminoácidos con respecto al bucle CD correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23, en donde la sustitución de 1 aminoácido se selecciona del grupo que consiste en:
- (i) la arginina (R) en la posición 2 del bucle CD se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, E, A, Q o N;
 - (ii) la glutamina (Q) en la posición 5 del bucle CD se sustituye por D;
 - (iii) la tirosina (Y) en la posición 7 del bucle CD se sustituye por un aminoácido seleccionado de S o A;
 - (iv) la leucina (L) en la posición 10 del bucle CD se sustituye por un aminoácido seleccionado de S, T o A;
 - (v) la leucina (L) en la posición 13 del bucle CD se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, S o A;
 - (vi) la tirosina (Y) en la posición 14 del bucle CD se sustituye por un aminoácido seleccionado de A o T;
 - (vii) la isoleucina (I) en la posición 15 del bucle CD se sustituye por un aminoácido seleccionado de D, S o A; y
 - (viii) La tirosina (Y) en la posición 16 del bucle CD se sustituye por un aminoácido seleccionado de Q, E, S o A.
3. El polipéptido de la reivindicación 2, en donde la tirosina (Y) en la posición 16 del bucle CD se sustituye por serina (S).
4. El polipéptido de la reivindicación 2, en donde la leucina (L) en la posición 10 del bucle CD se sustituye por treonina (T).
5. El polipéptido de la reivindicación 2, en donde la tirosina (Y) en la posición 16 del bucle CD se sustituye por glutamina (Q).
6. El polipéptido de la reivindicación 2, en donde el dominio ¹⁰F_n3 tiene además una sustitución de aminoácido en el bucle FG, en donde la lisina en la posición 12 del bucle FG se sustituye por un aminoácido seleccionado de A, T o S.
7. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dominio ¹⁰F_n3 se une al dominio I-II de HSA.
8. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la velocidad de disociación del polipéptido con respecto a la velocidad de disociación del dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23 tiene una relación de al menos 3.
9. El polipéptido de la reivindicación 7, en donde la relación es al menos 25.
10. El polipéptido de la reivindicación 7, en donde la relación es al menos 50.
11. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido comprende una proteína heteróloga.
12. El polipéptido de la reivindicación 11, en donde la proteína heteróloga es un residuo terapéutico.
13. El polipéptido de la reivindicación 11 o 12, en donde la proteína heteróloga es un polipéptido que comprende un dominio ¹⁰F_n3.
14. Una composición que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo.

15. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
- 5 16. Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
17. Una célula que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 15 o el vector de expresión de la reivindicación 16.
- 10 18. Un método para producir el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende cultivar la célula de la reivindicación 17 en condiciones adecuadas para expresar el polipéptido y purificar el polipéptido.
- 15 19. Un método para mejorar la semivida de un residuo, que comprende unir al residuo un polipéptido de unión a seroalbúmina humana de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.



** Unión normalizada

FIG. 1

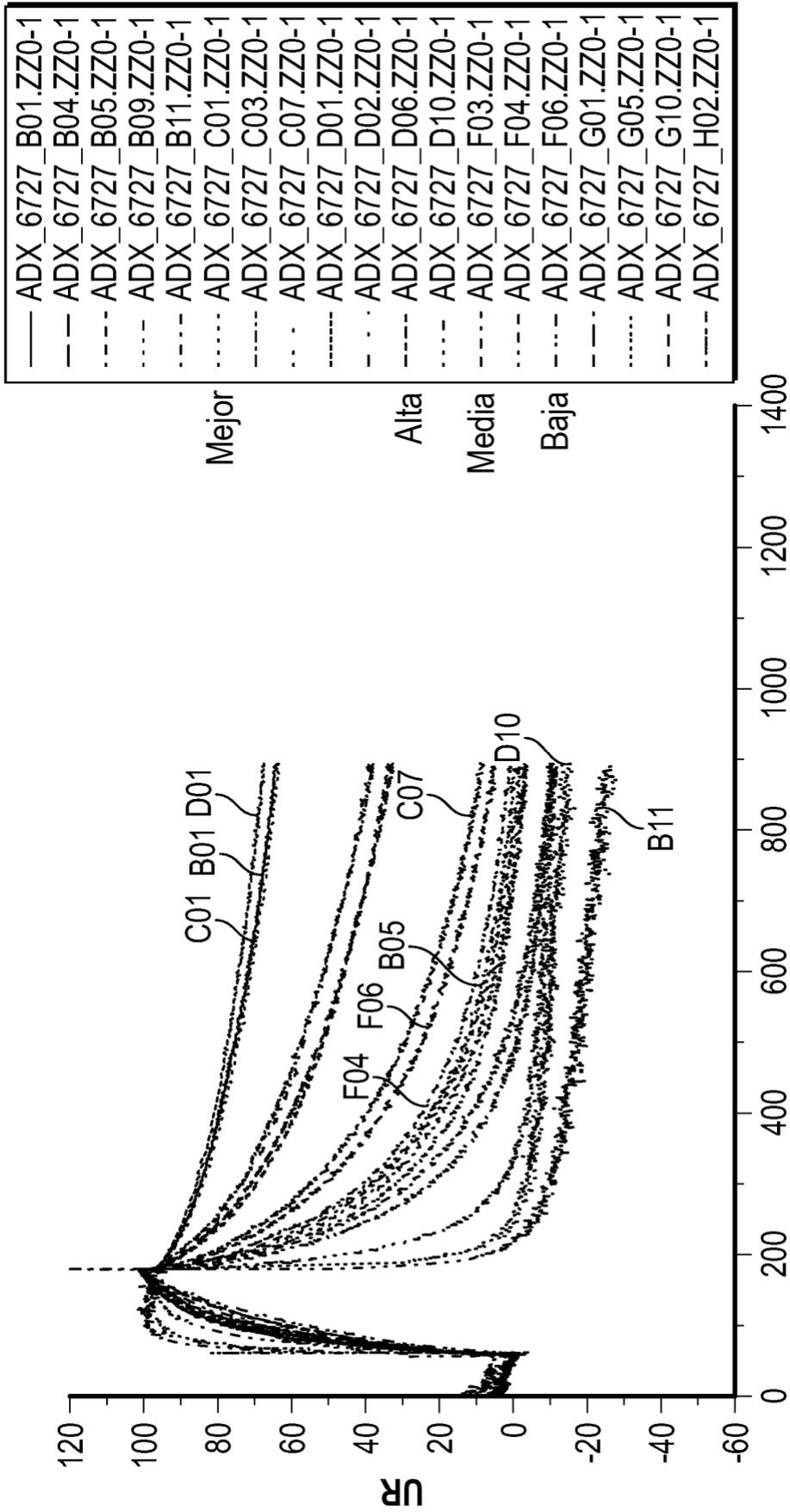


FIG. 2

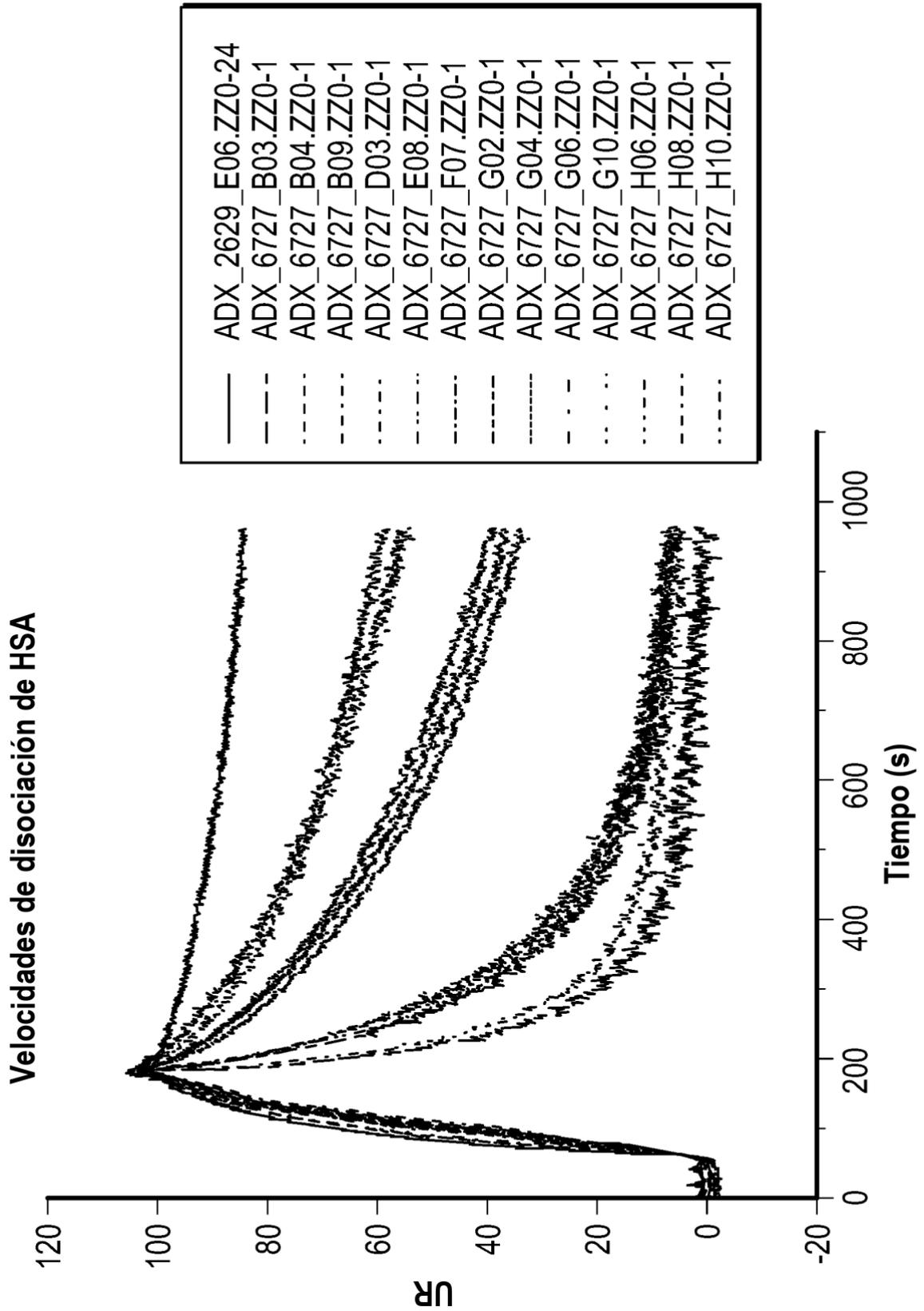
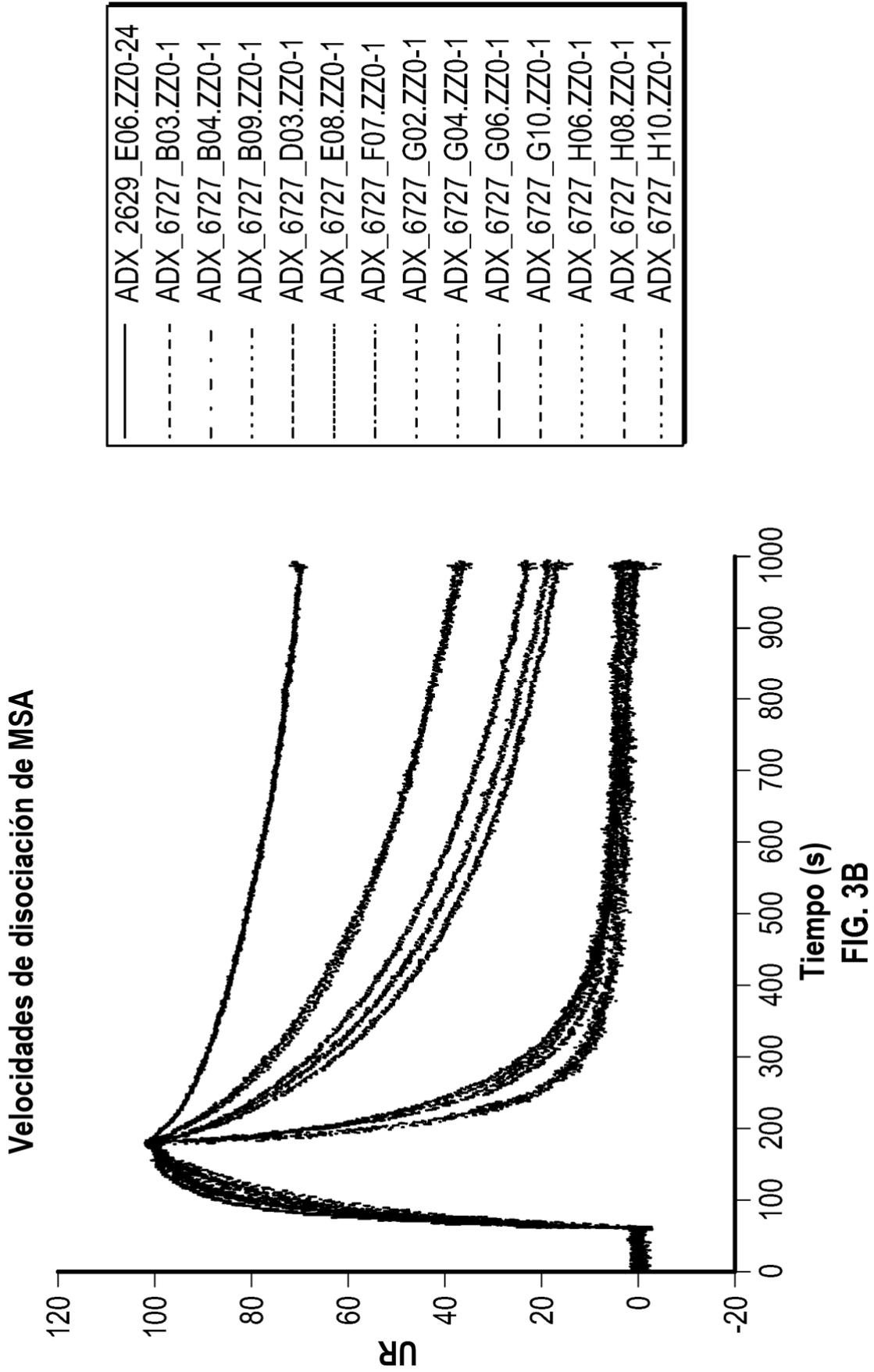


FIG. 3A



Velocidades de disociación de HSA

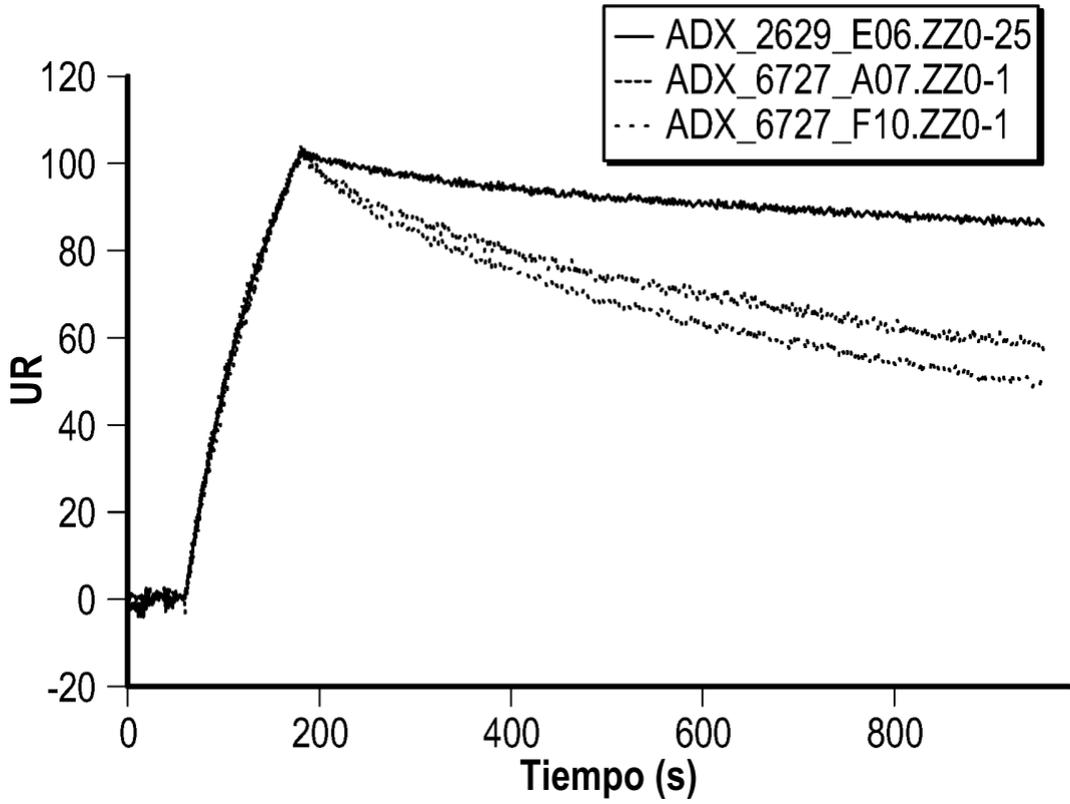


FIG. 3C

Velocidades de disociación de MSA

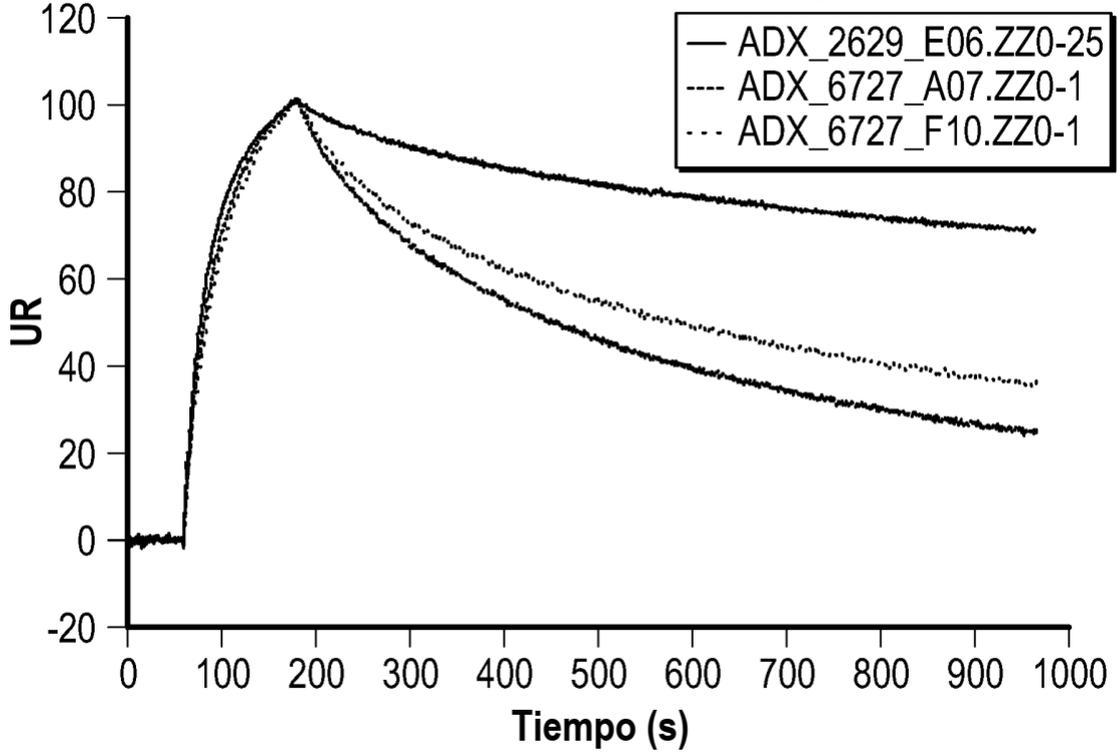


FIG. 3D

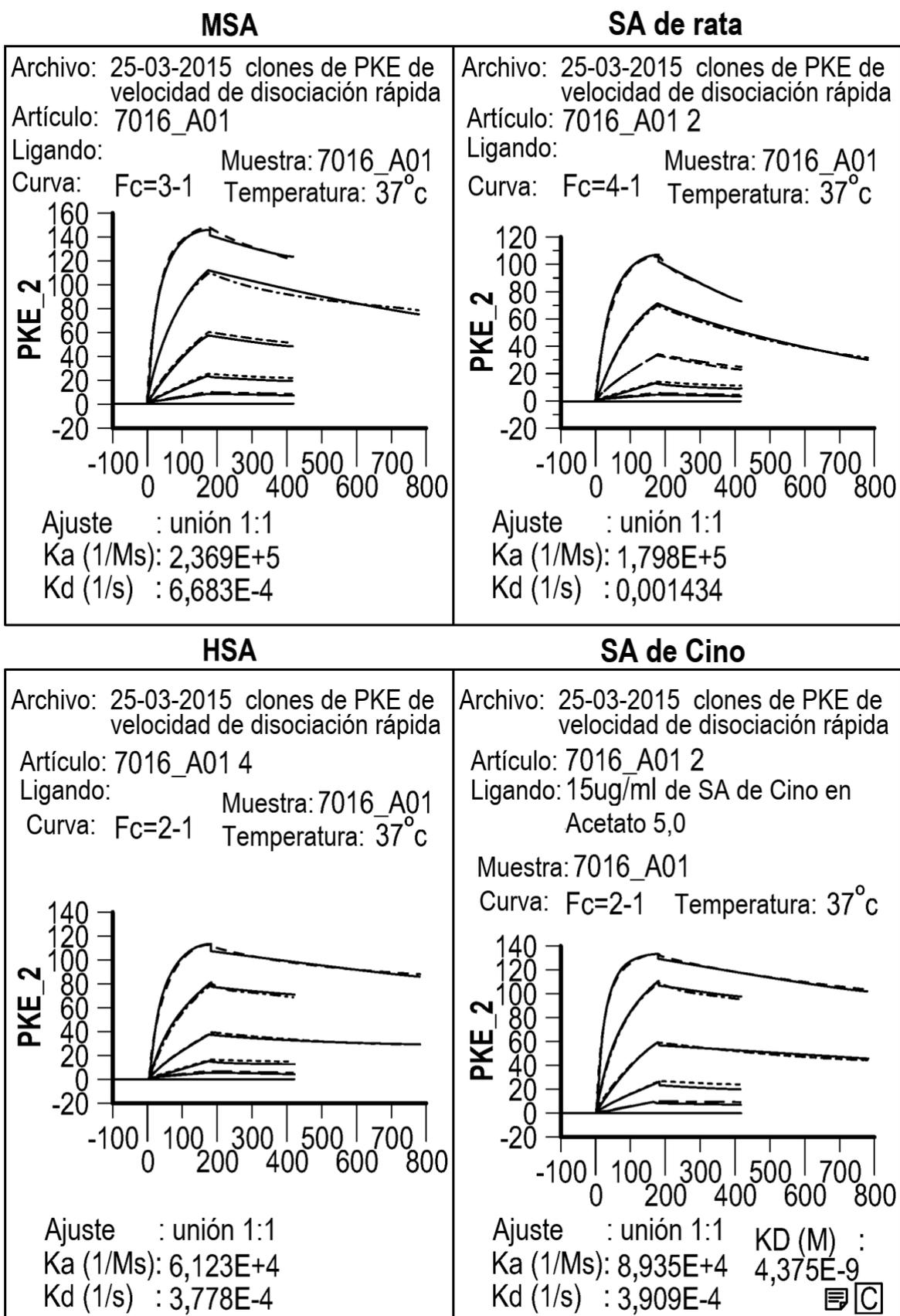


FIG. 4A

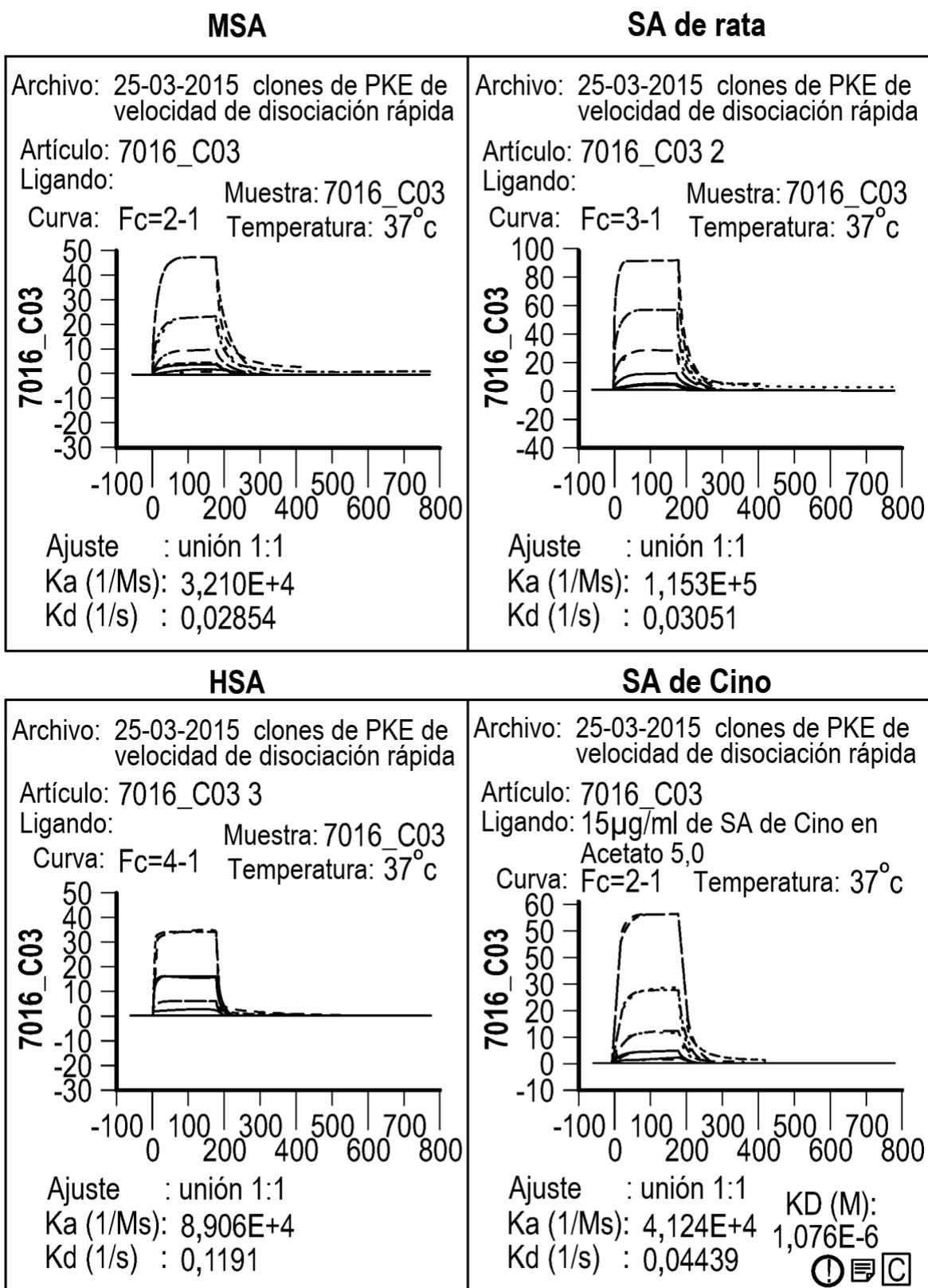


FIG. 4B

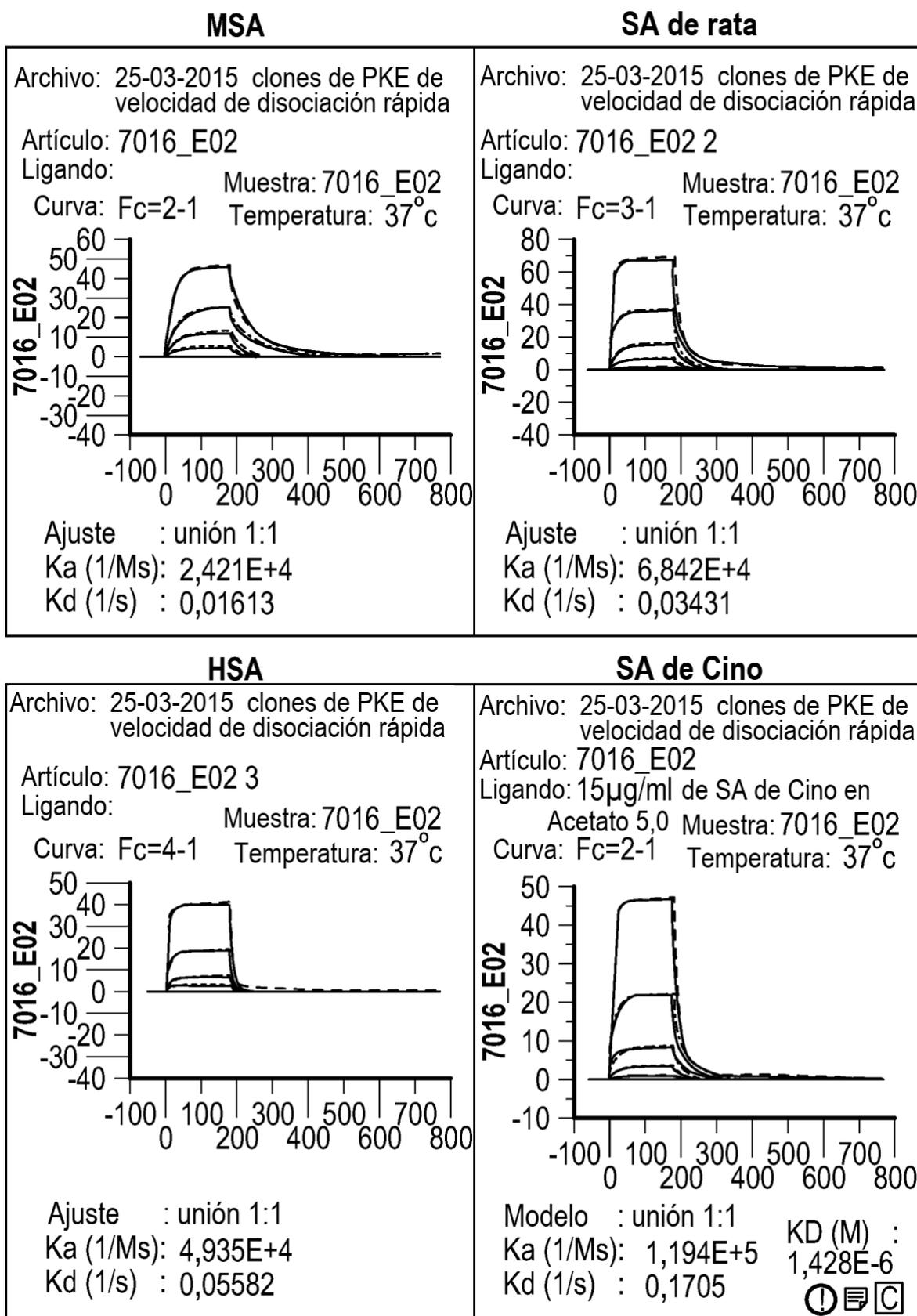


FIG. 4C

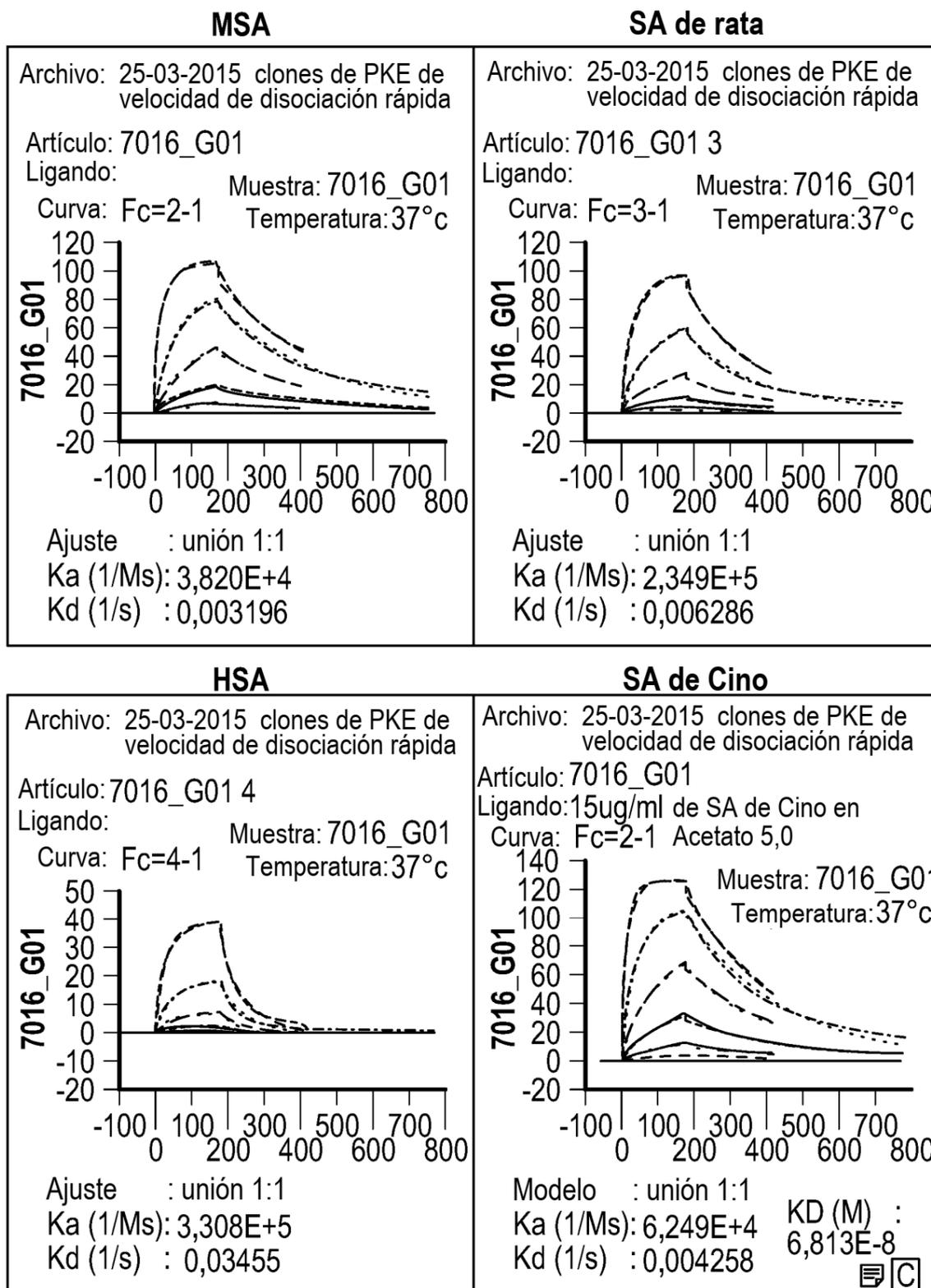


FIG. 4D

Comparación de perfil PK de clones PKE de "velocidad de disociación rápida" en ratas

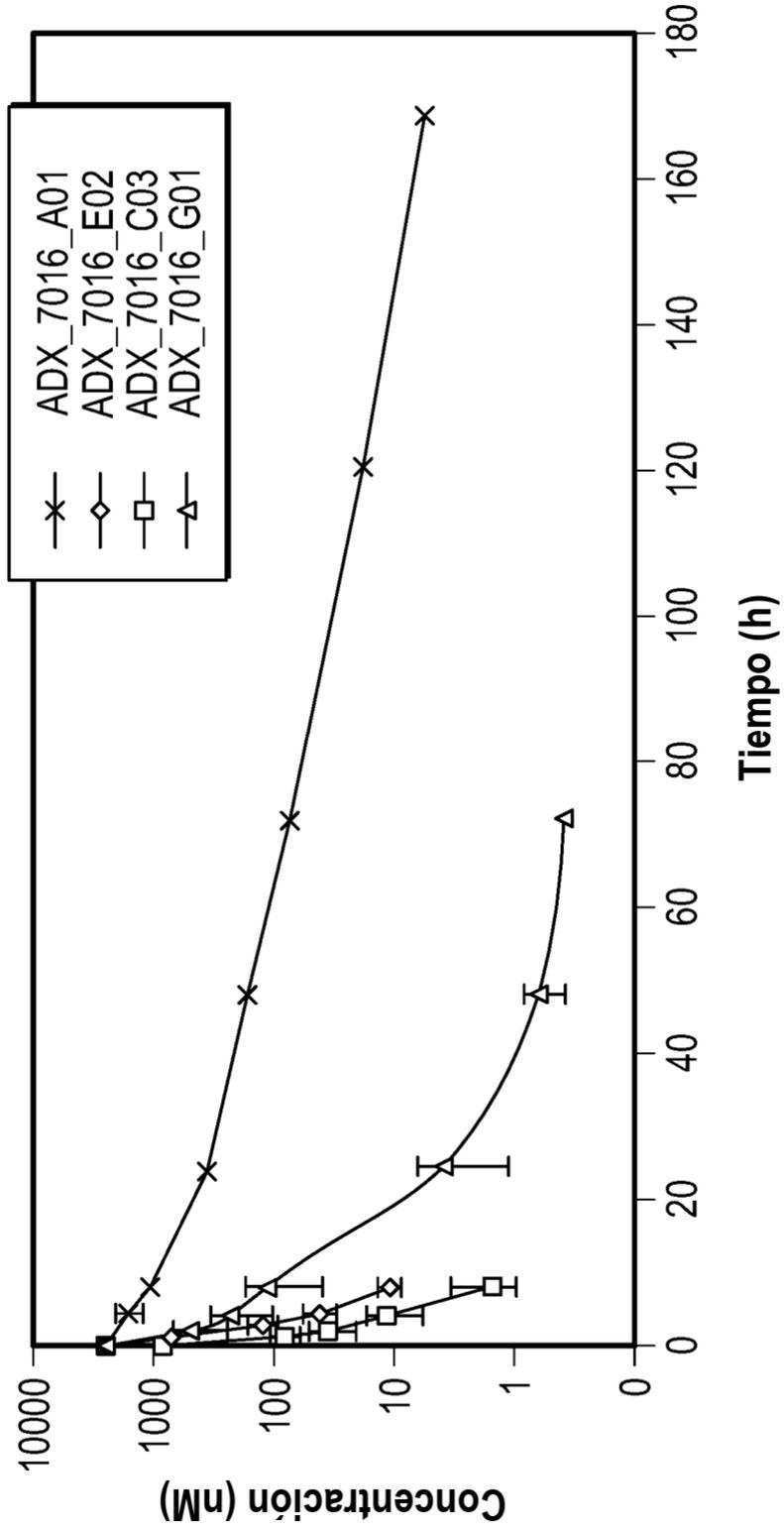
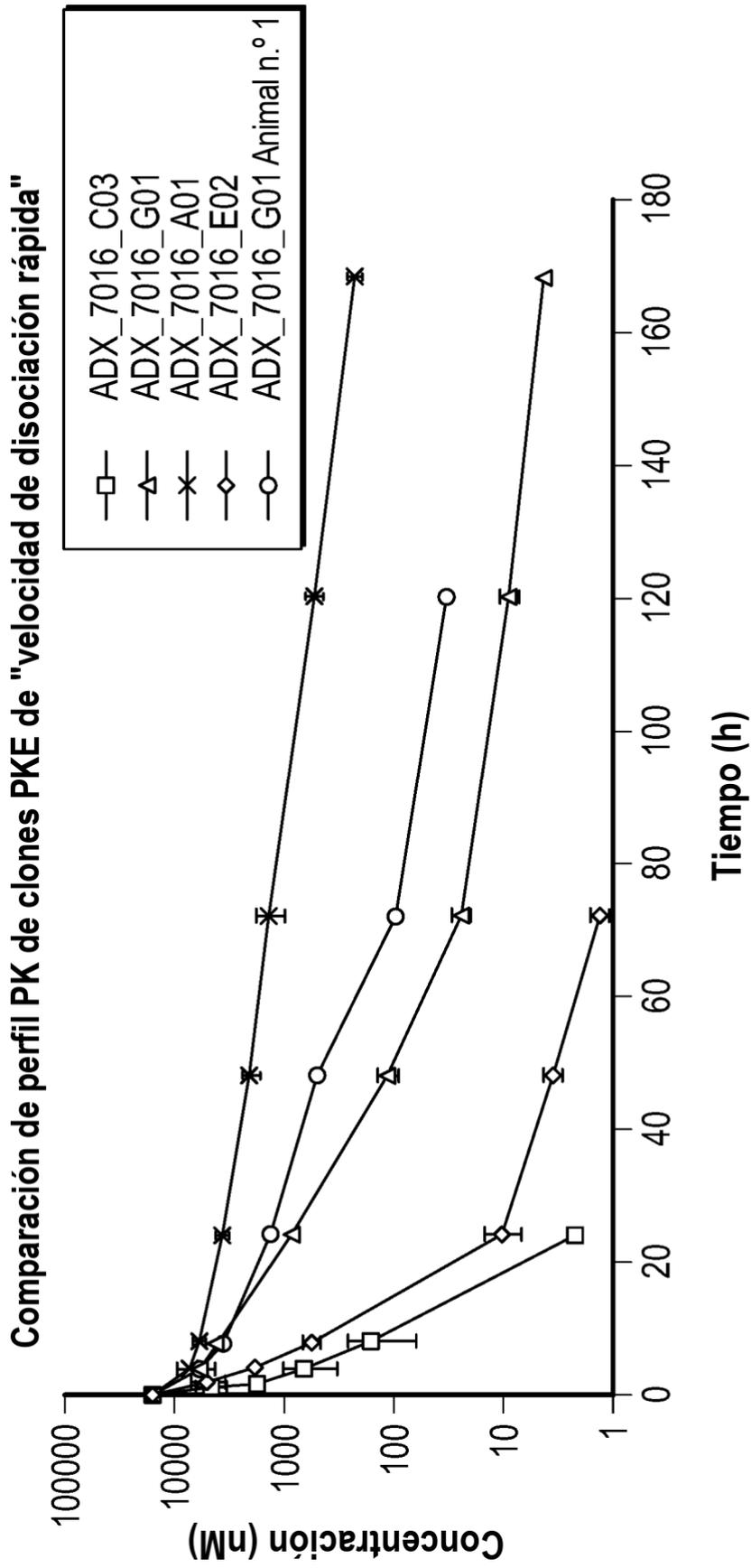


FIG. 5



* n=2 para ADX_7016_G01 debido a un valor atípico

FIG. 6