

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 125**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 47/60 (2007.01)

A61K 47/64 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2016 PCT/US2016/053185**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.03.2017 WO17053619**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2016 E 16775949 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3353198**

54 Título: **Moléculas de almacén a base de fibronectina de unión a glicano-3**

30 Prioridad:

23.09.2015 US 201562222633 P

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

03.03.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TERRAGNI, CHRISTINA;
LIPOVSEK, DASA;
TOTH, JOSEPH;
RAKESTRAW, GINGER, C.;
CARVAJAL, IRVITH, M.;
KRYSTEK, STANLEY, RICHARD, JR.;
O'NEIL, STEVEN, R.;
CHEN, GUODONG;
HUANG, RICHARD, Y.;
BARNHART, BRYAN, C. y
LOFFREDO, JOHN, THOMAS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 809 125 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moléculas de armazón a base de fibronectina de unión a glipicano-3

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional de Estados Unidos N.º 62/222.633, presentada el miércoles, 23 de septiembre de 2015.

10 **Antecedentes**

El glipicano-3 es un antígeno oncofetal que pertenece a la familia de glipicanos de los proteoglicanos de heparina sulfato anclados con glicosilfosfatidilinositol. Los glipicanos regulan la actividad de varios factores de crecimiento, incluyendo Wnts, Hedgehog, proteínas morfogénicas óseas y factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Filmus et al. FEBS J. 2013, 280:2471-2476). Los glipicanos se caracterizan por una unión covalente a cadenas complejas de polisacáridos llamados glicosaminoglicanos de heparinsulfato. Los glipicanos están implicados en la señalización celular en la interfaz célula-matriz extracelular. (Sasisekharan et al., Nature Reviews|Cancer, Volumen 2 (2002). Hasta ahora, se han identificado seis miembros distintos de la familia de glipicanos humanos. El glipicano-3 unido a la membrana celular está compuesto por dos subunidades, unidas por uno o más enlaces disulfuro.

El glipicano-3 se expresa en el hígado fetal y la placenta durante el desarrollo y se regula por disminución o se silencia en tejidos adultos normales. Las mutaciones y las depleciones en el gen de glipicano-3 son responsables del síndrome de dismorfia de Simpson-Golabi-Behmel o Simpson en seres humanos. El glipicano-3 se expresa en varios tipos de cáncer y, en particular, carcinoma hepatocelular ("CHC"), melanoma, tumor de Wilm y hepatoblastoma. (Jakubovic y Jothy; Ex. Mol. Path. 82:184-189 (2007); Nakatsura y Nishimura, Biodrugs 19(2):71-77 (2005). La forma de la superficie celular del glipicano-3 se expresa altamente en el CHC (> 50 %) y en otros cánceres, incluido el cáncer de pulmón escamoso (aproximadamente 25 %).

El glipicano-3 estimula el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo* estimulando la señalización Wnt canónica que induce la acumulación citosólica y la translocación nuclear del factor de transcripción β -catenina (Filmus, citado anteriormente). Se ha demostrado que GPC3 puede formar un complejo con varias Wnts (Capurro et al., Cancer Res., 2005, 65:6245-6254) y Frizzleds, el receptor de señalización para Wnts (Filmus, et al., Genome Biol., 2008, 9:224).

El CHC es la tercera causa principal de muertes relacionadas con el cáncer en todo el mundo. Cada año, El CHC representa aproximadamente 1 millón de muertes. (Nakatsura y Nishimura, Biodrugs 19 (2): 71-77 (2005).) El virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C y el consumo crónico de alcohol en exceso que conduce a cirrosis hepática siguen siendo las causas más comunes de CHC. Su incidencia ha aumentado dramáticamente en Estados Unidos debido a la propagación de la infección por el virus de la hepatitis C y se espera que aumente durante las próximas 2 décadas. El CHC se trata principalmente mediante trasplante de hígado o resección tumoral. El pronóstico del paciente depende tanto de la función hepática subyacente como de la etapa en la que se diagnostica el tumor. (Parikh y Hyman, Am J. Med. 120(3):194-202 (2007).) Se necesitan estrategias efectivas de tratamiento del CHC. El documento WO 2012/065978 describe las proteínas farmacéuticas y/o diagnósticas lipocalina 2 y lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos, que se unen al glipicano-3.

45 **Sumario**

En un primer aspecto, la invención se refiere a polipéptidos que comprenden un décimo dominio de fibronectina humana de tipo III (10 F_n3) que comprende los bucles BC, DE y FG, en el que los polipéptidos se unen específicamente al glipicano-3 humano (GPC3) con una K_D de 1 μ M o menos, y en el que

(a) los bucles BC, DE y FG comprenden las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente;

(b) los bucles BC, DE y FG comprenden las SEQ ID NO: 19, 20 y 21, respectivamente;

(c) los bucles BC, DE y FG comprenden las SEQ ID NO: 32, 33 y 34, respectivamente;

(d) los bucles BC, DE y FG comprenden las SEQ ID NO: 45, 46 y 47, respectivamente;

(e) los bucles BC, DE y FG comprenden las SEQ ID NO: 58, 59 y 60, respectivamente;

(f) los bucles BC, DE y FG comprenden las SEQ ID NO: 71, 72 y 73, respectivamente;

(g) los bucles BC, DE y FG comprenden las SEQ ID NO: 84, 85 y 86, respectivamente; o

(h) los bucles BC, DE y FG comprenden las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a polipéptidos que comprenden un décimo dominio de fibronectina humana de tipo III (¹⁰F_n3), en el que los polipéptidos se unen específicamente al glipicano-3 humano (GPC3) con una K_D de 1 μM o menos, en el que el dominio humano ¹⁰F_n3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3 y en el que los bucles BC, DE y FG representados por (X)_v, (X)_x y (X)_z, respectivamente, y comprenden

- 5 (a) los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 129, respectivamente;
 (b) los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 156, respectivamente;
 10 (c) los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 183, respectivamente;
 (d) los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 210, respectivamente;
 15 (e) los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 237, respectivamente;
 (f) los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 264, respectivamente;
 (g) los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 291, respectivamente; o
 20 (h) los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 318, respectivamente.

En el presente documento se desvela polipéptidos que contienen armazones a base de fibronectina (FBS) que se unen a glipicano-3 humano y conjugados de estos polipéptidos que son adecuados como agentes terapéuticos y de diagnóstico.

En el presente documento se desvela un polipéptido que comprende un FBS que se une específicamente al glipicano-3 humano (GPC3). En algunas realizaciones, la FBS anti-GPC3 se conjuga con un agente terapéutico o de diagnóstico.

30 En el presente documento se desvelan métodos para tratar el cáncer en un sujeto humano mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido que comprende un FBS anti-GPC3 o un conjugado de fármaco-FBS anti-GPC3. En algunas realizaciones, el cáncer sobreexpresa glipicano-3 en relación con las células no cancerosas. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer hepático (por ejemplo, carcinoma hepatocelular, hepatoblastoma), melanoma, tumor de Wilm o cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón escamoso).

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas, que comprende el polipéptido de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable, o el conjugado de la invención.

40 Además, la invención se refiere a la composición farmacéutica de la invención para su uso en un método para atenuar o inhibir una enfermedad o trastorno de glipicano-3 en un sujeto, en el que la enfermedad o trastorno de glipicano-3 es cáncer, preferentemente en el que el cáncer es carcinoma hepatocelular, melanoma, tumor de Wilm, hepatoblastoma, cáncer de ovarios o cáncer de pulmón escamoso.

La invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos de la invención.

45 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

Breve descripción de las figuras

50 La **Figura 1** representa las secuencias de aminoácidos de polipéptidos de adnectina anti-GPC3 representativos. 4578F03 (SEQ ID NO: 9), 4578H08 (SEQ ID NO: 18), 4578B06 (SEQ ID NO: 35), 4606F06 (SEQ ID NO: 48), 5273C01 (SEQ ID NO: 61), 5273D01 (SEQ ID NO: 74), 5274E01 (SEQ ID NO: 87), 6561A01 (SEQ ID NO: 87), 6077F02 (SEQ ID NO: 102), 6093A01 (SEQ ID NO: 463).

55 Las **Figuras 2A-2B** son esquemas que representan la estructura de los conjugados de fármaco adnectina GPC3-análogo de tubulisina DAR1 y DAR2.

60 Las **Figuras 3A-3D** muestran resultados de citometría de flujo de adnectinas anti-GPC3 que se unen a células positivas para glipicano-3 humano.

Las **Figuras 4A-4B** muestran resultados de citometría de flujo de AdxDC DAR1 y DAR2 anti-GPC3 que se unen a células Hep3B y H446 humanas.

65 Las **Figuras 5A-5B** muestran la inhibición del crecimiento celular de células Hep3B y H446 por AdxDC DAR1 y DAR2 anti-GPC3.

Las **Figuras 6A-6B** muestran la inhibición del crecimiento celular de células Hep3B y HepG2 por AdxDC DAR1 y DAR2 anti-GPC3.

5 Las **Figuras 7A-7B** son gráficos de barras que representan la tasa de internalización de la adnectina anti-GPC3, ADX_6077_F02, en células H446 y HepB3

Las **Figuras 8A-8F** representan la membrana y la adnectina anti-GPC3 marcada con AF488 internalizada, ADX_6077_F02, en los puntos de tiempo de 15 minutos y 8 horas.

10 La **Figura 9** es un gráfico que representa el perfil de exposición del conjugado de fármaco adnectina análogo de tubulicina anti-GPC3 en ratones.

15 Las **Figuras 10A-10B** son gráficos que representan la eficacia de los conjugados de fármaco de adnectina anti-GPC3 en un modelo de xenoinjerto HepG2, medido mediante la reducción del volumen del tumor y el porcentaje de cambio de peso corporal.

20 Las **Figuras 11A-11D** son gráficos que representan la eficacia de DAR1 y DAR2 en un modelo de xenoinjerto HepG2 ($TV_0 = 380-480 \text{ mm}^3$), medido por la reducción del volumen tumoral y el porcentaje de cambio de peso corporal.

Las **Figuras 12A-12B** son gráficos que representan la eficacia de DAR2 en un modelo de xenoinjerto HepG2 ($TV_0 = 228-350 \text{ mm}^3$), medido por la reducción del volumen tumoral y el porcentaje de cambio de peso corporal.

25 Las **Figuras 13A-13B** son gráficos que representan la eficacia de DAR2 en un modelo de xenoinjerto HepG2 ($TV_0 = 514-673 \text{ mm}^3$), medido por la reducción del volumen tumoral y el porcentaje de cambio de peso corporal.

La **Figura 14** representa los péptidos pépticos comunes para GPC3 humano (aminoácidos 1-559 de la SEQ ID NO:344, seguido de 6X his) determinado por espectrometría de masas.

30 La **Figura 15** es una representación gráfica del sitio de unión a la adnectina ADX_6077_F02 en GPC3 humano, según lo determinado por HDX-MS.

35 Las **Figuras 16A-16B** son comparaciones gráficas de la cinética de unión de mutantes DG anti-GPC3 con la adnectina anti-GPC3 parental.

40 La **Figura 17** muestra el volumen tumoral en función de los días posteriores a la administración de varias dosis de GPC3_AdxDC DA o control AdxDC no de unión a ratones NSG a los que se han implantado células tumorales Hep3B, mostrando que GPC3_AdxDC DA es eficaz en xenoinjertos derivados de líneas celulares con alta expresión de glipicano-3.

45 La **Figura 18** muestra el volumen tumoral en función de los días posteriores a la administración de varias dosis de GPC3_AdxDC DA o control AdxDC no de unión a ratones SCID CB17 a los que se han implantados células tumorales H446, mostrando que GPC3_AdxDC DA ralentiza el crecimiento de los xenoinjertos derivados de líneas celulares con baja expresión de glipicano-3.

50 La **Figura 19** muestra la autorradiografía cuantitativa de cuerpo entero (QWBA) de tejidos de ratones tomados 0,17 horas, 1 hora, 5 horas y 168 horas después de la administración de $0,22 \mu\text{M/kg}$ de ^3H GPC3_AdxDC a los ratones, mostrando una captación preferente del tumor Hep3B en relación con los tejidos normales.

La **Figura 20** muestra QWBA de tejidos de ratones tomados 0,17 horas, 1 hora, 5 horas y 168 horas después de la administración de $0,015 \mu\text{M/kg}$ de ^3H GPC3_AdxDC a los ratones, mostrando una captación preferente del tumor Hep3B en relación con los tejidos normales.

55 La **Figura 21** muestra QWBA de tejidos de ratones tomados 0,17 horas, 1 hora, 5 horas y 168 horas después de la administración de $0,22 \mu\text{M/kg}$ de ^3H GPC3_AdxDC a los ratones, mostrando una mayor absorción del tumor Hep3B en relación con el control AdxDC no de unión.

60 La **Figura 22** muestra QWBA de tejidos de ratones tomados 0,17 horas, 1 hora, 5 horas y 168 horas después de la administración de $0,22 \mu\text{M/kg}$ de ^3H RGE_AdxDC (control, AdxDC sin unión a GPC3) a los ratones, mostrando una menor absorción del tumor Hep3B en relación con GPC3 AdxDC.

65 La **Figura 23** muestra la concentración de radiactividad total en varios tejidos de ratón a las 0,17 horas, 1 hora, 5 horas, 24 horas, 48 horas y 168 horas después de la administración de ^3H GPC3_AdxDC o control AdxDC no de unión ("RGE_AdxDC") administrado a ratones. Las barras para cada tejido se muestran en el orden establecido en la frase anterior.

Las **Figuras 24A-24B** muestran mapas de calor del bucle BC de GPC3_AdxDC DG (aminoácidos 15-21 de la SEQ ID NO:98) obtenido mediante exploración posicional usando glipicano-3 humano-biotina 10 nM (Figura 24A) o 1 nM (Figura 24B). La secuencia del bucle BC wt se establece en los aminoácidos 15-21 de la SEQ ID NO:1.

Las **Figuras 25A-25B** muestran mapas de calor del bucle BC de GPC3_AdxDC DA (aminoácidos 15-21 de la SEQ ID NO:98) obtenido mediante exploración posicional usando glipicano-3 humano-biotina 10 nM (Figura 25A) o 1 nM (Figura 25B). La secuencia del bucle BC wt se establece en los aminoácidos 15-21 de la SEQ ID NO:1.

Las **Figuras 26A-26B** muestran mapas de calor del bucle DE de GPC3_AdxDC DG obtenido mediante exploración posicional usando glipicano-3 humano-biotina 10 nM (Figura 26A) o 1 nM (Figura 26B). La secuencia del bucle DE wt se establece en los aminoácidos 52-55 de la SEQ ID NO:1.

Las **Figuras 27A-27B** muestran mapas de calor del bucle DE de GPC3_AdxDC DA obtenido mediante exploración posicional usando glipicano-3 humano-biotina 10 nM (Figura 27A) o 1 nM (Figura 27B). La secuencia del bucle DE wt se establece en los aminoácidos 52-55 de la SEQ ID NO:1.

La **Figura 28** muestra mapas de calor del bucle FG de GPC3_AdxDC DG (aminoácidos 69-79 de la SEQ ID NO:98) obtenido mediante exploración posicional usando glipicano-3 humano-biotina 10 nM. La secuencia del bucle FG wt se establece en los aminoácidos 77-87 de la SEQ ID NO:1.

La **Figura 29** muestra mapas de calor del bucle FG de GPC3_AdxDC DG (aminoácidos 69-79 de la SEQ ID NO:98) obtenido mediante exploración posicional usando glipicano-3 humano-biotina 1 nM. La secuencia del bucle FG wt se establece en los aminoácidos 77-87 de la SEQ ID NO:1.

La **Figura 30** muestra mapas de calor del bucle FG de GPC3_AdxDC Da (aminoácidos 69-79 de la SEQ ID NO:98) obtenido mediante exploración posicional usando glipicano-3 humano-biotina 10 nM. La secuencia del bucle FG wt se establece en los aminoácidos 77-87 de la SEQ ID NO:1.

La **Figura 31** muestra mapas de calor del bucle FG de GPC3_AdxDC Da (aminoácidos 69-79 de la SEQ ID NO:98) obtenido mediante exploración posicional usando glipicano-3 humano-biotina 1 nM. La secuencia del bucle FG wt se establece en los aminoácidos 77-87 de la SEQ ID NO:1.

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 un experto en la técnica entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de la invención descrita también se pueden usar cualquier método y composición similar o equivalente a los descritos en el presente documento, en el presente documento se describen los métodos y composiciones preferentes.

Los términos "glipicano-3", "proteoglucano de glipicano 3", "GPC3", "OTTHUMP0000062492", "GTR2-2", "SGB", "DG-SX", "SDYS", "SGBS", "OCI-5", y "SGBS 1" se usan de forma indistinta e incluyen variantes, isoformas y homólogos de especies de glipicano-3 humano. La secuencia de aminoácidos completa de un glipicano-3 humano de ejemplo tiene el número de acceso Genbank/NC-BI NM_004484 (SEQ ID NO:344).

Un "resto de aminoácido" es la porción restante de un aminoácido después de que se ha perdido una molécula de agua (un H⁺ del lado nitrogenado y un OH⁻ del lado carboxílico) en la formación de un enlace peptídico.

Por "polipéptido" se entiende cualquier secuencia de dos o más aminoácidos, independientemente de la longitud, de la modificación postraduccional o de la función. Los polipéptidos pueden incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales tales como los descritos en la patente de Estados Unidos N.º 6,559,126. Los polipéptidos también se pueden modificar mediante cualquiera de varias formas químicas habituales (por ejemplo, se puede modificar un aminoácido con un grupo protector; el aminoácido de carboxilo terminal se puede convertir en un grupo amida terminal; el resto de amino terminal se puede modificar con grupos para, por ejemplo, mejorar la lipofilia; o el polipéptido se puede glucosilar químicamente o modificar de otro modo para aumentar la estabilidad o la semivida *in vivo*). Las modificaciones de polipéptidos pueden incluir la unión de otra estructura ta 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).

Un polipéptido "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se purificará (1) en más de un 95 % en peso del polipéptido, según se determina mediante el método de Lowry y, lo más preferentemente, en más de un 99 % en peso,

(2) hasta un grado suficiente para obtener al menos restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata.

5 Tal como se usa en el presente documento, un "dominio ¹⁰F_n3" o "resto de ¹⁰F_n3" o "molécula ¹⁰F_n3" se refiere a ¹⁰F_n3 de tipo silvestre y sus variantes biológicamente activas, por ejemplo, las variantes biológicamente activas que se unen específicamente a una diana, tal como una proteína diana. Un dominio ¹⁰F_n3 humano de tipo silvestre puede comprender la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:1. Las variantes biológicamente activas de un dominio ¹⁰F_n3 incluyen dominios ¹⁰F_n3 que comprenden al menos, como máximo o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6,
10 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.

Una "Adnectina" o "Adx" o "adnectina" o "adx" se refiere a una molécula de ¹⁰F_n3 humana que se ha modificado (en relación con la secuencia de tipo silvestre) para unirse específicamente a una diana.

15 Una "adnectina de GPC3" o "adnectina anti-GPC3" es una adnectina que se une específicamente a GPC3, por ejemplo, con una K_D de 1 μM o menos.

20 Una "región" de un dominio ¹⁰F_n3 (o resto o molécula) tal como se usa en el presente documento se refiere o bien a un bucle (AB, BC, CD, DE, EF y FG), una cadena β (A, B, C, D, E, F y G), el extremo N (correspondiente a los restos de aminoácidos 1-7 de la SEQ ID NO:1) o el extremo C (correspondiente a los restos de aminoácidos 93-94 de la SEQ ID NO:1).

25 Un "bucle del polo norte" de un dominio (o resto) ¹⁰F_n3 se refiere a uno cualquiera de los bucles BC, DE y FG de un dominio ¹⁰F_n3.

Un "bucle del polo sur" de un dominio (o resto) ¹⁰F_n3 se refiere a uno cualquiera de los bucles AB, CD y EF de un dominio ¹⁰F_n3.

30 Una "región de armazón" se refiere a cualquier región no bucle de un dominio ¹⁰F_n3 humano. La región de armazón incluye las cadenas β A, B, C, D, E, F y G, así como la región N-terminal (aminoácidos correspondientes a los restos 1-7 de la SEQ ID NO: 1) y la región C-terminal (aminoácidos correspondientes a los restos 93-94 de la SEQ ID NO: 1).

35 "Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en una secuencia seleccionada, después de alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin tomar en consideración cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los software BLASTSM, BLASTSM-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 conseguir la alineación máxima sobre toda la longitud de las secuencias que se comparan.

45 A efectos del presente documento, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que puede, como alternativa, citarse como una secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un % determinado de identidad de secuencia de aminoácidos para, con o frente a una secuencia de aminoácidos B) se calcula del modo siguiente: 100 veces la parte X/Y donde X es el número de restos de aminoácidos registrados como coincidencias idénticas mediante un programa de alineamiento de secuencias, tal como BLASTSM, BLASTSM-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR®), en esa alineación de A y B en el programa y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A.

50 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sitio de unión a adnectina" se refiere al sitio o porción de una proteína (por ejemplo, GPC3) que interacciona o se une a una adnectina en particular. Los sitios de unión a adnectina pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como a partir de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los sitios de unión a adnectina formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente se mantienen al tratarlos con disolventes desnaturizantes, mientras que los sitios de unión a adnectina formados mediante plegamiento terciario generalmente se pierden en el tratamiento con disolventes desnaturizantes.

65 Un sitio de unión a adnectina para una adnectina anti-GPC3 descrita en el presente documento puede determinarse mediante la aplicación de técnicas estándar normalmente utilizadas para mapear epítomos de anticuerpos que

incluyen, pero sin limitaciones, mapeo de proteasas y análisis mutacional.

Tal como se usa en el presente documento, se considera que un resto de aminoácido en un polipéptido "contribuye a la unión" a una diana si (1) se descubre que cualquiera de los átomos que no sean de hidrógeno de la cadena lateral o de la cadena principal del resto está a cinco angstroms de cualquier átomo de la diana de unión basándose en una estructura tridimensional del complejo determinada de forma experimental, y/o (2) la mutación del resto a su equivalente en $^{10}\text{Fn3}$ de tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), a alanina, o a un resto que tiene una cadena lateral de tamaño similar o más pequeña que el resto en cuestión, conduce a un aumento medido de la constante de disociación en el equilibrio hacia la diana (por ejemplo, un incremento en la k_{on}).

Las expresiones "se une específicamente", "unión específica", "unión selectiva y" se une selectivamente " como se usa indistintamente en el presente documento en el contexto de la unión de FBS a GPC3 se refiere a un FBS que exhibe afinidad por GPC3, pero no se une significativamente (por ejemplo, menos de aproximadamente 10% de unión) a polipéptidos diferentes medidos por una técnica disponible en la materia, tal como, pero sin limitación, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva (por ejemplo, ELISA de competición, ensayo BIACORE). El término también es aplicable cuando, por ejemplo, un dominio de unión de un FBS descrito en el presente documento es específico para GPC3 de una o más especies (por ejemplo, ser humano, roedor o primate), pero no reacciona de forma cruzada con otros glipicanos (por ejemplo, glipicano-1, glipicano-2, glipicano-5, glipicano-6).

La expresión "se une preferentemente" como se usa en el presente documento en el contexto de la unión de adnectinas a GPC3 se refiere a la situación en la que una adnectina descrita en el presente documento se une a GPC3 al menos aproximadamente un 20 % más de lo que se une a un polipéptido diferente medido por una técnica disponible en la materia, tal como, pero sin limitación, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva (por ejemplo, ELISA de competición, ensayo BIACORE).

El término " K_D ", tal como se usa en el presente documento, por ejemplo, en el contexto de las adnectinas que se unen a GPC3, se pretende que haga referencia a la constante de disociación de equilibrio de una interacción particular de adnectina-proteína (por ejemplo, GPC3) o la afinidad de una adnectina por una proteína (por ejemplo, GPC3), medida mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial o un ensayo de unión celular. Una " K_D deseada", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una K_D de una adnectina que es suficiente para los fines contemplados. Por ejemplo, una K_D deseada puede referirse a la K_D de una adnectina requerida para provocar un efecto funcional en un ensayo *in vitro*, por ejemplo, un ensayo de luciferasa basado en células.

El término " k_a ", como se usa en el presente documento en el contexto de la unión de adnectinas a una proteína, se pretende que haga referencia a la constante de velocidad de asociación para la asociación de una adnectina en el complejo adnectina/proteína.

El término " k_d ", como se usa en el presente documento en el contexto de la unión de adnectinas a una proteína, se pretende que haga referencia a la constante de la velocidad de disociación para la disociación de una adnectina en el complejo adnectina/proteína.

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

El término "actividad de glipicano" o "actividad de glipicano-3" como se usa en el presente documento se refiere a una o más de las actividades morfogénicas o de regulación del crecimiento asociadas con la activación de la señalización celular por GPC3, por ejemplo, activación de la señalización Wnt. Por ejemplo, GPC3 puede modular el crecimiento de células tumorales por formación de complejos con proteínas Wnt y/o Frizzled. GPC3 también puede activar las vías de señalización y el crecimiento de células tumorales al interactuar con FGF. La actividad de GPC3 se puede determinar utilizando métodos reconocidos en la técnica, tales como los descritos en el presente documento. Las frases "actividad de glipicano-3" o "antagonizar la actividad de glipicano-3" o "antagonizar glipicano-3" se usan indistintamente para hacer referencia a la capacidad de los conjugados de FBS anti-GP3 Y fármacos anti-GPC3 proporcionados en el presente documento para neutralizar o antagonizar una actividad de GPC3 *in vivo* o *in vitro*. Los términos "inhibir" o "neutralizar" como se usan en el presente documento con respecto a una actividad de un FBS anti-GPC3 significa la capacidad de sustancialmente antagonizar, prohibir, prevenir, restringir, ralentizar, romper, eliminar, detener, reducir o revertir, por ejemplo, la progresión o la gravedad de lo que está siendo inhibido incluyendo, pero sin limitación, una actividad o propiedad biológica, una enfermedad o afección (por ejemplo, crecimiento de células tumorales). La inhibición o neutralización es, preferentemente, de al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o mayor.

Tal como se usa en el presente documento, el término "unido" se refiere a la asociación de dos o más moléculas. El enlace puede ser covalente o no covalente. El enlace puede estar entre un polipéptido y un resto químico u otro resto de polipéptido. El enlace también puede ser genético (es decir, fusionado de manera recombinante). Tales enlaces se pueden conseguir usando una amplia variedad de técnicas reconocidas en la técnica, tales como la conjugación

química y la producción recombinante de proteínas.

El término "PK" es un acrónimo de "farmacocinética" y abarca las propiedades de un compuesto, incluidas, a modo de ejemplo, de absorción, distribución, metabolismo y eliminación por un sujeto. Una "proteína de modulación PK" o "resto PK" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier proteína, péptido o resto que afecta a las propiedades farmacocinéticas de una molécula biológicamente activa cuando se fusiona o administra junto con la molécula biológicamente activa. Los ejemplos de una proteína de modulación PK o un resto PK incluyen aglutinantes de PEG, seroalbúmina humana (HSA) (como se desvela en las publicaciones de Estados Unidos n.º 2005/0287153 y 2007/0003549, las publicaciones PCT N.º WO 2009/083804 y WO 2009/133208), seroalbúmina humana y variantes de la misma, transferrina y variantes de la misma, Fc o fragmentos de Fc y variantes de los mismos, y azúcares (por ejemplo, ácido siálico).

La "semivida" en suero o plasma 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 al aclaramiento o secuestro del polipéptido por mecanismos naturales. La semivida se puede determinar de cualquier manera conocida *per se*, tal como por análisis farmacocinético. Las técnicas adecuadas serán claras para el experto en la materia y pueden, por ejemplo, generalmente, implicar las etapas de administrar una dosis adecuada de un polipéptido a un primate; extraer muestras de sangre u otras muestras de dicho primate a intervalos regulares; determinar el nivel o concentración del polipéptido en dicha muestra de sangre; y calcular, de (una gráfica de) los datos obtenidos de este modo, el tiempo hasta que el nivel o concentración del polipéptido se haya reducido en un 50 % en comparación con el nivel inicial tras la dosificación. Se pueden encontrar métodos para determinar la semivida, por ejemplo, en Kenneth et al., *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists* (1986); Peters et al., *Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach* (1996); y Gibaldi, M. et al., *Pharmacokinetics*, Segunda edición revisada, Marcel Dekker (1982).

La semivida en suero se puede expresar usando parámetros tales como el $t_{1/2}$ -alfa, el $t_{1/2}$ -beta y el área bajo la curva (AUC). Un "aumento en la semivida" se refiere a un aumento en uno cualquiera de estos parámetros, dos cualesquiera de estos parámetros, o en estos tres parámetros. En determinadas realizaciones, un aumento en la semivida se refiere a un aumento en el $t_{1/2}$ -beta y/o HL_Lambda_z, ya sea con o sin un aumento en el $t_{1/2}$ -alfa y/o la AUC o ambos.

El término "detectable" se refiere a la capacidad de detectar una señal sobre la señal de fondo. La expresión "señal detectable" es una señal derivada de técnicas de imagen no invasivas tales como, pero sin limitación, tomografía de emisión de positrones (PET). La señal detectable es detectable y distinguible de otras señales de fondo que pueden generarse a partir del sujeto. En otras palabras, existe una diferencia mensurable y estadísticamente significativa (por ejemplo, una diferencia estadísticamente significativa es una diferencia suficiente para distinguir entre la señal detectable y la de fondo, tal como aproximadamente 0,1 %, 1 %, 3 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 40 % o más de diferencia entre la señal detectable y la de fondo) entre la señal detectable y la de fondo. Los patrones y/o las curvas de calibración pueden usarse para determinar la intensidad relativa de la señal detectable y/o la de fondo.

Una "cantidad detectable efectiva" de una composición que comprende un agente de formación de imágenes descrito en el presente documento se define como una cantidad suficiente para producir una imagen aceptable usando un equipo que está disponible para uso clínico. Una cantidad detectable eficaz de un agente de obtención de imágenes proporcionado en el presente documento puede administrarse en más de una inyección. La cantidad eficaz detectable puede variar según factores tal como el grado de susceptibilidad del individuo, la edad, el sexo y el peso del individuo, respuestas idiosincrásicas del individuo y similares. Cantidades detectables efectivas de composiciones de formación de imágenes también pueden variar según el instrumento y las metodologías utilizadas. La optimización de tales factores está dentro del nivel de habilidad en la técnica. En determinadas realizaciones, un agente de obtención de imágenes de GPC3, por ejemplo, los descritos en el presente documento, proporciona un factor de diferenciación (es decir, señal específica respecto a la señal de fondo) de 2 o más, por ejemplo, 3, 4, 5 o más.

Los términos "individuo", "sujeto" y "paciente", que se usan de manera indistinta en el presente documento, hacen referencia a un animal, preferentemente un mamífero (incluyendo un no primate y un primate), por ejemplo, un ser humano.

Un "cáncer" se refiere a un amplio grupo de diversas enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado de células anómalas en el cuerpo. La división y el crecimiento celular no regulados dan como resultado la formación de tumores malignos que invaden los tejidos vecinos y también pueden hacer metástasis a partes distantes del cuerpo a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo.

El "tratamiento" o "terapia" de un sujeto se refiere a cualquier tipo de intervención o proceso realizado en, o la administración de un agente activo para, el sujeto con el objetivo de invertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o prevenir la aparición, progresión, desarrollo, gravedad o recurrencia de un síntoma, complicación, afección o indicios bioquímicos asociados con una enfermedad.

"Administración" o "administrar" tal como se usa en el presente documento en el contexto de las adnectinas anti-GPC3, se refiere a introducir una adnectina GPC3 o una sonda basada en adnectina GPC3 o una sonda marcada (también

denominada "agente de obtención de imágenes") descrita en el presente documento en un sujeto. Cualquier vía de administración es adecuada, tal como intravenosa, oral, tópica, subcutánea, peritoneal, intraarterial, inhalación, vaginal, rectal, nasal, introducción en el líquido cefalorraquídeo o la instilación en los compartimentos corporales.

5 Con los términos "coadministración" o similares tal como se usa en el presente documento, se pretende abarcar la administración de los agentes terapéuticos seleccionados a un único paciente y se pretende que incluyan regímenes en los que los agentes se administran por la misma vía de administración o una diferente o al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

10 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere al menos a la dosis mínima, pero menos que una dosis tóxica, de un agente que es necesario para impartir un beneficio terapéutico a un sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad efectiva" se refiere al menos a una cantidad efectiva, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado deseado.

15 Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad suficiente" se refiere a una cantidad suficiente para lograr el resultado deseado.

20 El término "muestra" puede referirse a una muestra de tejido, muestra celular, una muestra de fluido y similares. Puede obtenerse la muestra de un sujeto. La muestra de tejido puede incluir cabello (incluidas las raíces), frotis bucales, sangre, saliva, semen, músculo o de cualquier órgano interno. El fluido puede ser, pero sin limitación, orina, sangre, ascitis, líquido pleural, líquido cefalorraquídeo y similares. El tejido corporal puede incluir, pero sin limitación, tejido de la piel, músculo, endometrio, uterino y cervical.

25 **Visión general**

La invención se refiere a nuevos polipéptidos que comprenden un décimo dominio de fibronectina humana de tipo III (¹⁰F_{n3}) que se une al glicoproteína-3 humano. Dichos polipéptidos se pueden acoplar a otros agentes terapéuticos y de diagnóstico y son útiles, por ejemplo, para dirigir agentes terapéuticos y de diagnóstico a células y tejidos que expresan glicoproteína-3 (por ejemplo, células cancerosas que sobreexpresan glicoproteína-3).

I. Armazones a base de fibronectina anti-GPC3

35 Tal como se usa en el presente documento, un "armazón a base de fibronectina" o proteína o resto "FBS" se refiere a proteínas o restos que se basan en una repetición de fibronectina de tipo III ("Fn3") y pueden modificarse para unirse específicamente a diana dadas, por ejemplo, proteínas diana. Fn3 es un pequeño dominio (de aproximadamente 10 kDa) que tiene la estructura de un plegamiento de inmunoglobulina (Ig) (es decir, una estructura de sándwich β de tipo Ig, que consiste en siete cadenas β y seis bucles). La fibronectina tiene 18 repeticiones de Fn3, y aunque la homología de secuencia entre las repeticiones es baja, todas comparten una elevada similitud en la estructura terciaria. Los dominios Fn3 también están presentes en muchas proteínas que no son fibronectina, tales como moléculas de adhesión, moléculas de superficie celular, por ejemplo, receptores de citocina y dominios de unión a hidratos de carbono. Para recapitulaciones, véase, Bork, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89(19):8990-8994 (1992); Bork et al., J. Mol. Biol., 242(4):309-320 (1994); Campbell et al., Structure, 2(5):333-337 (1994); Harpez et al., J. Mol. Biol., 238(4):528-539 (1994)). El término proteína o resto "FBS" pretende incluir armazones basados en dominios Fn3 de estas otras proteínas (es decir, moléculas no fibronectina).

45 Un dominio Fn3 es pequeño, monomérico, soluble y estable. Carece de enlaces disulfuro y, por lo tanto, es estable en condiciones reductoras. Los dominios Fn3 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, mientras que crean dos "caras" compuestas de los bucles que conectan las cadenas beta o de tipo beta. Los bucles AB, CD y EF se localizan en una cara ("el polo sur") y los bucles BC, DE y FG se localizan en la cara opuesta ("el polo norte").

55 Los bucles en las moléculas de Fn3 son estructuralmente similares a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los anticuerpos, y cuando se alteran, pueden estar implicados en la unión de la molécula Fn3 a una diana, por ejemplo, una proteína diana. Otras regiones de moléculas Fn3, tales como las cadenas beta o similares a beta y las regiones N-terminal o C-terminal, cuando se alteran, también pueden estar implicados en la unión a una diana. Cualquiera o todos los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG pueden participar en la unión a una diana. Cualquiera de las cadenas beta o similares a beta pueden estar implicadas en la unión a una diana. Los dominios Fn3 también pueden unirse a una diana a través de uno o más bucles y una o más cadenas beta o similares a beta. La unión también puede requerir las regiones N-terminal o C-terminal.

65 Un FBS anti-GPC3 puede basarse en el décimo dominio de fibronectina de tipo III, es decir, el décimo módulo de Fn3 humano (¹⁰F_{n3}) en el que uno o más bucles accesibles a disolventes han sido aleatorizados o mutados. La secuencia

de aminoácidos de un resto ¹⁰F_n3 humano de tipo silvestre es la siguiente:

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTTITVYA VTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 1)

5 Los bucles AB, CD y EF están subrayados; los bucles BC, FG y DE se enfatizan en negrita; las cadenas β se localizan entre o adyacentes a cada una de las regiones bucle; y la región N-terminal se muestra en cursiva). Los últimos dos restos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 son una porción de una región C-terminal. El dominio central ¹⁰F_n3 comienza con el aminoácido 9 ("E") y termina con el aminoácido 94 ("T") y corresponde a un polipéptido de 86 aminoácidos. El dominio ¹⁰F_n3 humano de tipo silvestre central se establece en la SEQ ID NO:2. Tanto las proteínas ¹⁰F_n3 variantes como las de tipo silvestre se caracterizan por la misma estructura, a saber, siete secuencias de dominio de cadena beta designadas de A a G y seis regiones de bucle (bucle AB, bucle BC, bucle CD, bucle DE, bucle EF y bucle FG) que conectan las siete secuencias de dominio de cadena beta. Las cadenas beta situadas más cercanas a los extremos N y C pueden adoptar una conformación similar a la 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 se refiere a los restos 63-67, y el bucle FG se refiere a los restos 76-87.

En consecuencia, en determinadas realizaciones, el resto FBS anti-GPC3 (por ejemplo, adnectina anti-GPC3) comprende un dominio ¹⁰F_n3 que se define generalmente por la siguiente secuencia degenerada:
 20 VSDVPRDLEVVA(X)_uLLISW(X)_vYRITY(X)_wFTV(X)_xATISGL(X)_yYTITVYA(X)_zISINY RT (SEQ ID NO: 3), o mediante una secuencia que carece 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos N-terminales, respectivamente.

En la SEQ ID NO: 3, el bucle AB se representa mediante (X)_u, el bucle BC se representa mediante (X)_v, el bucle CD se representa mediante (X)_w, el bucle DE se representa mediante (X)_x, el bucle EF se representa mediante (X)_y y el bucle FG se representa mediante X_z. X representa cualquier aminoácido, y el subíndice tras la X representa un número entero del número de aminoácidos. En particular, u, v, w, x, y y z pueden estar cada uno 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 en la SEQ ID NO:3) pueden tener de cualquier punto de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, o de 0 a 1 sustituciones, deleciones o adiciones a través de las 7 regiones de armazón en relación con los correspondientes aminoácidos mostrados en las SEQ ID NO:3. En algunas realizaciones, las secuencias de las cadenas beta pueden tener en cualquier parte de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, o de 0 a 1 sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservadoras, a través de las 7 regiones de armazón en relación con los correspondientes aminoácidos mostrados en las SEQ ID NO:3.

35 Se debería de entender que no todos los restos en una región de bucle necesitan modificarse o alterarse para lograr un dominio de unión a ¹⁰F_n3 que tiene una fuerte afinidad por una diana deseada. Adicionalmente, también se pueden hacer inserciones y deleciones en las regiones bucle mientras que aún se producen dominios de unión de ¹⁰F_n3 anti-GPC3 de alta afinidad. Con "alterado" se refiere a una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos en relación con una secuencia de molde (es decir, el correspondiente dominio de fibronectina humana de tipo silvestre) e incluye adiciones, deleciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el resto FBS anti-GPC3 comprende un dominio ¹⁰F_n3 en el que las regiones no bucle comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos 80, 85, 90, 95, 98 o 100 % idéntica a las regiones no bucle de SEQ ID NO:1 y en el que al menos un Bucle seleccionado de AB, BC, CD, DE, EF y FG está alterado.

45 En algunas realizaciones, uno o más bucles seleccionados de AB, BC, CD, DE, EF y FG se pueden alargar o acortar en longitud en relación con el correspondiente bucle, en ¹⁰F_n3 de tipo silvestre. En cualquiera de los polipéptidos dados, uno o más bucles se pueden extender en longitud, uno o más bucles se pueden reducir en longitud o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la longitud de un bucle dado se puede extender en 2-25, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20, o 10-15 aminoácidos. En algunas realizaciones, la longitud de un bucle dado se puede reducir en 1-15, 1-11, 1-10, 1-5, 1-3, 1-2, 2-10 o 2-5 aminoácidos. En particular, el bucle FG de ¹⁰F_n3 es de 13 restos de longitud, mientras que el correspondiente bucle en las cadenas pesadas de los anticuerpos varía de 4-28 restos. Por tanto, en algunas realizaciones, la longitud del bucle FG de ¹⁰F_n3 se puede alterar en longitud así como en la secuencia para obtener la mayor flexibilidad y afinidad por la diana posibles en los polipéptidos que dependen de FG para la unión a la diana.

En determinadas realizaciones, el resto FBS anti-GPC3 comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), en el que el dominio ¹⁰F_n3 comprende un bucle, AB; un bucle, BC; un bucle, CD; un bucle, DE; un bucle EF; y un bucle FG; y tiene al menos un bucle seleccionado de los bucles BC, DE y FG con una secuencia de aminoácidos alterada en relación con la secuencia del correspondiente bucle del dominio ¹⁰F_n3 humano. En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 descrita en el presente documento comprende un dominio ¹⁰F_n3 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a las regiones no bucle

de la SEQ ID NO:1 o 2, en las que al menos un bucle seleccionado de BC, DE y FG está alterado. En determinadas realizaciones, los bucles BC y FG están alterados, en determinadas realizaciones, los bucles BC y DE están alterados, en determinadas realizaciones, los bucles DE y FG están alterados y en ciertas realizaciones, los bucles BC, DE y FG están alterados, es decir, los dominios ¹⁰F_n3 comprenden bucles no naturales. En determinadas realizaciones, los bucles AB, CD y/o EF están alterados. En algunas realizaciones, se combinan una o más alteraciones específicas del armazón con una o más alteraciones del bucle.

En algunas realizaciones, las secuencias de unión no ligando del ¹⁰F_n3 anti-GPC3 pueden alterarse siempre que el ¹⁰F_n3 conserve la función de unión al ligando y/o la estabilidad estructural. En algunas realizaciones, la región no de bucle del dominio ¹⁰F_n3 se puede modificar mediante una o más sustituciones conservadoras. Hasta un 5 %, 10 %, 20 % o incluso 30 % o más de los aminoácidos en el dominio ¹⁰F_n3, puede alterarse mediante una sustitución conservadora sin alterar sustancialmente la afinidad del ¹⁰F_n3 por un ligando. En determinadas realizaciones, las regiones no de bucle, por ejemplo, las cadenas β pueden comprender en cualquier parte de 0-15, 0-10, 0-8, 0-6, 0-5, 0-4, 0-3, 1-15, 1-10, 1-8, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 2-15, 2-10, 2-8, 2-6, 2-5, 2-4, 5-15, o 5-10 sustituciones conservadoras de aminoácidos. En realizaciones de ejemplo, la modificación del armazón puede reducir la afinidad de unión del ligando ¹⁰F_n3 por un ligando en menos de 100 veces, 50 veces, 25 veces, 10 veces, 5 veces o 2 veces. Puede ser que tales cambios puedan alterar la inmunogenicidad del ¹⁰F_n3 *in vivo*, y cuando se reduce la inmunogenicidad, tales cambios pueden ser deseables. Tal como se usa en el presente documento, "sustituciones conservadoras" son restos que son físicamente o funcionalmente similares a los correspondientes restos de referencia. Es decir, una sustitución conservadora y su resto de referencia tienen un tamaño, forma, carga eléctrica similares, propiedades químicas, incluyendo la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Las sustituciones conservadoras a modo de ejemplo incluyen aquellas que cumplen los criterios definidos para una mutación puntual aceptada en Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, 5:345-352 (1978 y Supp.). Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen sustituciones en los siguientes grupos: (a) valina, glicina; (b) glicina, alanina; (c) valina, isoleucina, leucina; (d) ácido aspártico, ácido glutámico; (e) asparagina, glutamina; (f) serina, treonina; (g) lisina, arginina, metionina; y (h) fenilalanina, tirosina.

En algunas realizaciones, 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 han desvelado diversas alteraciones adicionales en el armazón de ¹⁰F_n3 que son beneficiosas o neutrales. Véase, por ejemplo, Batori et al., Protein Eng., 15(12):1015-1020 (December 2002); Koide et al., Biochemistry, 40(34):10326-10333 (Aug. 28, 2001).

En otras realizaciones, los restos de aminoácidos del núcleo hidrofóbico (restos en negrita en SEQ ID NO:3 anterior) son fijos y cualquier sustitución, sustituciones conservadoras, deleciones o adiciones tienen lugar en otros restos que no sean los restos de aminoácidos hidrófobos del núcleo en el armazón de ¹⁰F_n3. Por tanto, en algunas realizaciones, los restos hidrófobos del núcleo de los polipéptidos proporcionados en el presente documento no se han modificado en relación con el dominio ¹⁰F_n3 humano de tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO:1).

Una molécula de ¹⁰F_n3 puede comprender el enlazador flexible entre la 10^a y 11^a repetición del dominio F_n3, es decir, EIDKPSQ (SEQ ID NO: 369). El polipéptido ¹⁰F_n3 de tipo silvestre con EIDKPSQ (SEQ ID NO: 369) en su extremo C está representado por

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATIS

GLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT EIDKPSQ (SEQ ID NO: 4)

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

A. Adnectinas anti-GPC3 de ejemplo

En algunas realizaciones, el bucle BC del FBS anti-GPC3 (por ejemplo, una adnectina que se une específicamente a GPC3 humano) comprende una secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 6, 19, 32, 45, 58, 71, 84 o 99, en donde, opcionalmente, el bucle BC comprende 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, deleciones o inserciones relativas al bucle BC de las SEQ ID NO: 6, 19, 32, 45, 58, 71, 84, o 99.

En algunas realizaciones, el bucle DE del FBS anti-GPC3 comprende una secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 7, 20, 33, 46, 59, 72, 85 o 100, en donde, opcionalmente, el bucle DE comprende 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, deleciones o inserciones relativas al bucle DE de las SEQ ID NO: 7, 20, 33, 46, 59, 72, 85, o 100.

En algunas realizaciones, el bucle FG del FBS anti-GPC3 comprende una secuencia de aminoácidos establecida en

las SEQ ID NO: 8, 21, 34, 47, 60, 73, 86, 101, 129, 156, 183, 210, 237, 264, 291 o 318, en donde, opcionalmente, el bucle FG comprende 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, deleciones o inserciones relativas al bucle FG de los SEQ ID NO: 8, 21, 34, 47, 60, 73, 86, 101, 129, 156, 183, 210, 237, 264, 291 o 318.

5 En algunas realizaciones, el bucle BC de la adnectina anti-GPC3 (es decir, una adnectina que se une específicamente a GPC3 humano) comprende una secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 6, 19, 32, 45, 58, 71, 84 o 99, en donde, opcionalmente, el bucle BC comprende 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, deleciones o inserciones relativas al bucle BC de las SEQ ID NO: 6, 19, 32, 45, 58, 71, 84 o 99; el bucle DE de la adnectina anti-GPC3
10 comprende una secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 7, 20, 33, 46, 59, 72, 85 o 100, en donde, opcionalmente, el bucle DE comprende 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, deleciones o inserciones relativas al bucle DE de las SEQ ID NO: 7, 20, 33, 46, 59, 72, 85 o 100; y el bucle FG del FBS anti-GPC3 comprende una secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 8, 21, 34, 47, 60, 73, 86, 101, 129, 156, 183, 210, 237, 264, 291 o 318, en donde, opcionalmente, el bucle FG comprende 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, deleciones o inserciones
15 relativas al bucle FG de los SEQ ID NO: 8, 21, 34, 47, 60, 73, 86, 101, 129, 156, 183, 210, 237, 264, 291 o 318.

En algunas realizaciones, el FBS anti-GPC3 comprende un bucle BC que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 6, 19, 32, 45, 58, 71, 84 o 99; un bucle DE que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 7, 20, 33, 46, 59, 72, 85 o 100; un bucle FG que comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 8, 21, 34, 47, 60, 73, 86, 101, 129, 156, 183, 210, 237, 264, 291 o 318.
20

En algunas realizaciones, el FBS anti-GPC3 comprende los bucles BC, DE, y FG como se establece en las SEQ ID NO: 6, 19, 32, 45, 58, 71, 84 o 99; 7, 20, 33, 46, 59, 72, 85 o 100; y 8, 21, 34, 47, 60, 73, 86, 101, 129, 156, 183, 210, 237, 264, 291 o 318, respectivamente, y tiene sustituciones de aminoácidos en los bucles BC, DE y FG que permiten que el FBS mantenga la unión a GPC3.
25

En algunas realizaciones, el FBS anti-GPC3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por (X)_v, (X)_x y (X)_z, respectivamente, tienen secuencias de aminoácidos al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de los bucles BC, DE o FG establecidas en las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente.
30

En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente, en las que el bucle BC tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos, y el bucle DE tiene 0, 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, tal como una sustitución conservadora de aminoácidos, y el bucle FG tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos, tal como sustituciones conservadoras de aminoácidos.
35

En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 (por ejemplo, un resto anti-FBS que comprende un ¹⁰F_n3 humano) comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por (X)_v, (X)_x y (X)_z, respectivamente, comprenden los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente.
40

En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por (X)_v, (X)_x y (X)_z, respectivamente, tienen secuencias de aminoácidos al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de los bucles BC, DE o FG establecidas en las SEQ ID NO: 19, 20 y 21, respectivamente.
45

En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 19, 20 y 21, respectivamente, en las que el bucle BC tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos, y el bucle DE tiene 0, 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, tal como una sustitución conservadora de aminoácidos, y el bucle FG tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos, tal como sustituciones conservadoras de aminoácidos.
50

En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por (X)_v, (X)_x y (X)_z, respectivamente, comprenden los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 19, 20 y 21, respectivamente.
55

En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por (X)_v, (X)_x y (X)_z, respectivamente, tienen secuencias de aminoácidos al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de los bucles BC, DE o FG establecidas en las SEQ ID NO: 32, 33 y 34, respectivamente.
60

En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 32, 33 y 34, respectivamente, en las que el bucle BC tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como
65

sustituciones conservadoras de aminoácidos, y el bucle DE tiene 0, 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, tal como una sustitución conservadora de aminoácidos, y el bucle FG tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos, tal como sustituciones conservadoras de aminoácidos.

5 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por $(X)_v$, $(X)_x$ y $(X)_z$, respectivamente, comprenden los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 32, 33 y 34, respectivamente.

10 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por $(X)_v$, $(X)_x$ y $(X)_z$, respectivamente, tienen secuencias de aminoácidos al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de los bucles BC, DE o FG establecidas en las SEQ ID NO: 45, 46 y 47, respectivamente.

15 En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 45, 46 y 47, respectivamente, en las que el bucle BC tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos, y el bucle DE tiene 0, 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, tal como una sustitución conservadora de aminoácidos, y el bucle FG tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos, tal como sustituciones conservadoras de aminoácidos.

20 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por $(X)_v$, $(X)_x$ y $(X)_z$, respectivamente, comprenden los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 45, 46 y 47, respectivamente.

25 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por $(X)_v$, $(X)_x$ y $(X)_z$, respectivamente, tienen secuencias de aminoácidos al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de los bucles BC, DE o FG establecidas en las SEQ ID NO: 58, 59 y 60, respectivamente.

30 En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 58, 59 y 60, respectivamente, en las que el bucle BC tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos, y el bucle DE tiene 0, 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, tal como una sustitución conservadora de aminoácidos, y el bucle FG tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos, tal como sustituciones conservadoras de aminoácidos.

40 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por $(X)_v$, $(X)_x$ y $(X)_z$, respectivamente, comprenden los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 58, 59 y 60, respectivamente.

45 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por $(X)_v$, $(X)_x$ y $(X)_z$, respectivamente, tienen secuencias de aminoácidos al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de los bucles BC, DE o FG establecidas en las SEQ ID NO: 71, 72 y 73, respectivamente.

50 En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 71, 72 y 73, respectivamente, en las que el bucle BC tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos, y el bucle DE tiene 0, 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, tal como una sustitución conservadora de aminoácidos, y el bucle FG tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos, tal como sustituciones conservadoras de aminoácidos.

55 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por $(X)_v$, $(X)_x$ y $(X)_z$, respectivamente, comprenden los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 71, 72 y 73, respectivamente.

60 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por $(X)_v$, $(X)_x$ y $(X)_z$, respectivamente, tienen secuencias de aminoácidos al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de los bucles BC, DE o FG establecidas en las SEQ ID NO: 84, 85 y 86, respectivamente.

65 En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 84, 85 y 86, respectivamente, en las que el bucle BC tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos, y el bucle DE tiene 0, 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, tal como una sustitución conservadora de aminoácidos, y el bucle FG tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos,

tal como sustituciones conservadoras de aminoácidos.

5 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por $(X)_v$, $(X)_x$ y $(X)_z$, respectivamente, comprenden los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 84, 85 y 86, respectivamente.

10 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por $(X)_v$, $(X)_x$ y $(X)_z$, respectivamente, tienen secuencias de aminoácidos al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de los bucles BC, DE o FG establecidas en las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente.

15 En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente, en las que el bucle BC tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos, y el bucle DE tiene 0, 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, tal como una sustitución conservadora de aminoácidos, y el bucle FG tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos, tal como sustituciones conservadoras de aminoácidos.

20 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por $(X)_v$, $(X)_x$ y $(X)_z$, respectivamente, comprenden los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente.

25 En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 99, 100 y 129, respectivamente, en las que el bucle BC tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos, y el bucle DE tiene 0, 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, tal como una sustitución conservadora de aminoácidos.

30 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por $(X)_v$, $(X)_x$ y $(X)_z$, respectivamente, comprenden los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: SEQ ID NO: 99, 100 y 129, respectivamente.

35 En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 99, 100 y 156, respectivamente, en las que el bucle BC tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos, y el bucle DE tiene 0, 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, tal como una sustitución conservadora de aminoácidos.

40 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por $(X)_v$, $(X)_x$ y $(X)_z$, respectivamente, comprenden los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: SEQ ID NO: 99, 100 y 156, respectivamente.

45 En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 99, 100 y 183, respectivamente, en las que el bucle BC tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos, y el bucle DE tiene 0, 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, tal como una sustitución conservadora de aminoácidos.

50 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por $(X)_v$, $(X)_x$ y $(X)_z$, respectivamente, comprenden los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: SEQ ID NO: 99, 100 y 183, respectivamente.

55 En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 99, 100 y 210, respectivamente, en las que el bucle BC tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos, y el bucle DE tiene 0, 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, tal como una sustitución conservadora de aminoácidos.

60 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por $(X)_v$, $(X)_x$ y $(X)_z$, respectivamente, comprenden los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: SEQ ID NO: 99, 100 y 210, respectivamente.

65 En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 99, 100 y 237, respectivamente, en las que el bucle BC tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos, y el bucle DE tiene 0, 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, tal

como una sustitución conservadora de aminoácidos.

5 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por (X)_v, (X)_x y (X)_z, respectivamente, comprenden los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: SEQ ID NO: 99, 100 y 237, respectivamente.

10 En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 99, 100 y 264, respectivamente, en las que el bucle BC tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos, y el bucle DE tiene 0, 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, tal como una sustitución conservadora de aminoácidos.

15 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por (X)_v, (X)_x y (X)_z, respectivamente, comprenden los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: SEQ ID NO: 99, 100 y 264, respectivamente.

20 En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 99, 100 y 291, respectivamente, en las que el bucle BC tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos, y el bucle DE tiene 0, 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, tal como una sustitución conservadora de aminoácidos.

25 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por (X)_v, (X)_x y (X)_z, respectivamente, comprenden los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: SEQ ID NO: 99, 100 y 291, respectivamente.

30 En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 99, 100 y 318, respectivamente, en las que el bucle BC tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos, y el bucle DE tiene 0, 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, tal como una sustitución conservadora de aminoácidos.

35 En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3, en la que los bucles BC, DE y FG representados por (X)_v, (X)_x y (X)_z, respectivamente, comprenden los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: SEQ ID NO: 99, 100 y 318, respectivamente.

40 Las regiones de armazón de tales adnectinas anti-GPC3 pueden comprender uno cualquiera de 0 a 20, de 0 a 15, de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, o de 0 a 1 sustituciones, sustituciones conservadoras, deleciones o adiciones relativas a los restos de aminoácidos del armazón de la SEQ ID NO:3. Dichas modificaciones de armazón se pueden hacer, siempre que la adnectina anti-GPC3 sea capaz de unirse a GPC3 con un K_D deseado.

45 En determinadas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende una secuencia de aminoácidos al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica al de una adnectina anti-GPC3 desvelada en el presente documento y que tiene, por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 18, 31, 44, 57, 70, 83 y 98.

50 En determinadas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende una secuencia de aminoácidos al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 9-18, 22-31, 35-44, 48-57, 61-70, 74-83, 87-98, 102-128, 130-155, 157-182, 184-209, 211-236, 238-263, 265-290, 292-317 y 319-343.

55 En determinadas realizaciones, las adnectinas anti-GPC3 descritas en el presente documento comprenden una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las regiones no bucle BC, DE o FG establecidas en las SEQ ID NO: 3, 5, 18, 31, 44, 57, 70, 83 o 98.

60 En determinadas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende bucles BC, DE y FG como se establece en las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente; y una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las regiones no bucle BC, DE o FG establecidas en las SEQ ID NO: 3, 5, 18, 31, 44, 57, 70, 83 o 98.

65 En determinadas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende bucles BC, DE y FG como se establece en las SEQ ID NO: 19, 20 y 21, respectivamente; y una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las regiones no bucle BC, DE o FG establecidas en las SEQ ID NO: 3, 5, 18, 31, 44, 57, 70, 83 o 98.

En determinadas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende bucles BC, DE y FG como se establece en las SEQ ID NO: 32, 33 y 34, respectivamente; y una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las regiones no bucle BC, DE o FG establecidas en las SEQ ID NO: 3, 5, 18, 31, 44,

5 En determinadas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende bucles BC, DE y FG como se establece en las SEQ ID NO: 99, 100 y 318, respectivamente y una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las regiones no bucle BC, DE o FG establecidas en las SEQ ID NO: 3, 5, 18, 31, 44, 57, 70, 83 o 98.

En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 5, 18, 31, 44, 57, 70, 83, 98, 128, 155, 182, 209, 236, 263, 290 y 317.

10 En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende además un resto C-terminal seleccionado del grupo que consiste en P_mX_n , P_mCX_n y $P_mCX_{n1}CX_{n2}$, en las que X es cualquier aminoácido y m, n, n1 y n2 son independientemente 0 o un número entero de 1, 2, 3, 4, 5 o más.

15 En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 5, 9-18, 22-31, 35-44, 48-57, 61-70, 74-83, 87-98, 102-128, 130-155, 157-182, 184-209, 211-236, 238-263, 265-290, 292-317 y 319-343.

20 En determinadas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 98, 102-128, 129-155, 157-182, 184-209, 211-236, 238-263, 265-290, 292-317 y 319-343, opcionalmente con una o más histidinas (por ejemplo, 6xHis) en el extremo C-terminal.

25 En determinadas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 102-127. En determinadas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende las SEC ID NO: 114-118. En otras realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende las SEC ID NO: 123-127.

30 En el presente documento se proporcionan polipéptidos que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10^{-7} o menos, en el que los polipéptidos comprenden un dominio $^{10}Fn3$ que comprende los bucles BC, DE y FG de ADX_6077_A01, es decir, SEQ ID NO: 99, 100 y 101. En el presente documento se proporcionan polipéptidos que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10^{-7} o menos, en el que los polipéptidos comprenden un dominio $^{10}Fn3$ que comprende un bucle BC que comprende la SEQ ID NO:99, un bucle DE que comprende la SEQ ID NO: 100 y un bucle FG que comprende la SEQ ID NO: 101. También se proporcionan polipéptidos que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10^{-7} o menos, en el que los polipéptidos comprenden un dominio $^{10}Fn3$ que comprende un bucle BC que comprende la SEQ ID NO:99, un bucle DE que comprende la SEQ ID NO: 100 y un bucle FG que comprende la SEQ ID NO: 101, en el que uno de los dos restos de aminoácidos DG en el bucle FG está sustituido con otro aminoácido. También se proporcionan polipéptidos que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10^{-7} o menos, en el que los polipéptidos comprenden un dominio $^{10}Fn3$ que comprende un bucle BC que comprende la SEQ ID NO:99, un bucle DE que comprende la SEQ ID NO: 100 y un bucle FG que comprende la SEQ ID NO: 101, en el que el resto de aminoácido D de DG en el bucle FG (es decir, D78; la numeración es relativa a la de la SEQ ID NO:102) está sustituido con otro aminoácido, por ejemplo, E, S, A y G. También se proporcionan polipéptidos que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10^{-7} o menos, en el que los polipéptidos comprenden un dominio $^{10}Fn3$ que comprende un bucle BC que comprende la SEQ ID NO:99, un bucle DE que comprende la SEQ ID NO: 100 y un bucle FG que comprende las SEQ ID NO: 101, 129, 156, 183, 210, 237, 264, 291 o 318. Cualquiera de los polipéptidos descritos en este párrafo puede comprender un resto de cisteína unido directa o indirectamente al extremo C-terminal del polipéptido y/o puede comprender uno de los siguientes restos o secuencias de aminoácidos unidos directa o indirectamente al extremo C-terminal del polipéptido: P, PC, PCHHHHHH (SEQ ID NO: 395), PCPPPPPC (SEQ ID NO: 416) o PCPPPPPCHHHHHH (SEQ ID NO: 424).

35 También se proporcionan polipéptidos que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10^{-7} o menos, en los que los polipéptidos comprenden un dominio $^{10}Fn3$ que comprende la secuencia central ADX_6077_A01, es decir, la SEQ ID NO: 98, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a los mismos o que difieren de ellos en 1-10, 1-5, 1-3, 1-2 o 1 sustitución de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos), deleciones o adiciones. También se proporcionan polipéptidos que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10^{-7} o menos, en los que los polipéptidos comprenden un dominio $^{10}Fn3$ que comprende la secuencia central ADX_6077_A01, es decir, la SEQ ID NO: 98, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a los mismos o que difieren de ellos en 1-10, 1-5, 1-3, 1-2 o 1 sustitución de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos), deleciones o adiciones, y el dominio $^{10}Fn3$ comprende un bucle BC que comprende la SEQ ID NO:99, un bucle DE que comprende la SEQ ID NO: 100 y un bucle FG que comprende las SEQ ID NO: 101, o que difiere de las mismas en un aminoácido de DG. También se proporcionan polipéptidos que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10^{-7} o menos, en los que los polipéptidos comprenden un dominio $^{10}Fn3$ que comprende la SEQ ID NO: 98, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a los mismos o que difieren de ellos en 1-10, 1-5, 1-3, 1-2 o 1 sustitución de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras de

aminoácidos), deleciones o adiciones, y el dominio ¹⁰F_n3 comprende un bucle BC que comprende la SEQ ID NO:99, un bucle DE que comprende la SEQ ID NO: 100 y un bucle FG que comprende las SEQ ID NO: 101, 129, 156, 183, 210, 237, 264, 291 o 318. También se proporcionan polipéptidos que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10⁻⁷ o menos, en los que los polipéptidos comprenden un dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia central ADX_6077_A01, es decir, la SEQ ID NO: 98, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a los mismos o que difieren de ellos en 1-10, 1-5, 1-3, 1-2 o 1 sustitución de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos), deleciones o adiciones, y además comprende un resto de cisteína unido directa o indirectamente al extremo C-terminal del polipéptido. También se proporcionan polipéptidos que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10⁻⁷ o menos, en los que los polipéptidos comprenden un dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia central ADX_6077_A01, es decir, la SEQ ID NO: 98, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a los mismos o que difieren de ellos en 1-10, 1-5, 1-3, 1-2 o 1 sustitución de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos), deleciones o adiciones, y además comprende uno de los siguientes restos o secuencias de aminoácidos unidos directa o indirectamente al extremo C-terminal del polipéptido: P, PC, PCHHHHHH (SEQ ID NO: 395), PCPPPPPC (SEQ ID NO: 416) o PCPPPPPCHHHHHH (SEQ ID NO: 424).

En el presente documento se proporcionan polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de ADX_6077_A01 o ADX_6912_G02 (con o sin una metionina N-terminal) y con o sin una cola 6xHis.

También se proporcionan en el presente documento proteínas ¹⁰F_n3 que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10⁻⁷ o menos, y comprenden los bucles BC, DE y FG de ADX_6077_A01, es decir, SEQ ID NO: 99, 100 y 101. En el presente documento se proporcionan proteínas ¹⁰F_n3 que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10⁻⁷ o menos, y comprenden un bucle BC que comprende la SEQ ID NO:99, un bucle DE que comprende la SEQ ID NO: 100 y un bucle FG que comprende la SEQ ID NO: 101. También se proporcionan proteínas ¹⁰F_n3 que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10⁻⁷ o menos, y comprenden un bucle BC que comprende la SEQ ID NO:99, un bucle DE que comprende la SEQ ID NO: 100 y un bucle FG que comprende la SEQ ID NO: 101, en el que uno de los dos restos de aminoácidos DG en el bucle FG está sustituido con otro aminoácido. También se proporcionan proteínas ¹⁰F_n3 que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10⁻⁷ o menos, y comprenden un bucle BC que comprende la SEQ ID NO:99, un bucle DE que comprende la SEQ ID NO: 100 y un bucle FG que comprende la SEQ ID NO: 101, en el que el resto de aminoácido D de DG en el bucle FG (es decir, D78; la numeración es relativa a la de la SEQ ID NO:102) está sustituido con otro aminoácido, por ejemplo, E, S, A y G. También se proporcionan proteínas ¹⁰F_n3 que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10⁻⁷ o menos, y comprenden un bucle BC que comprende la SEQ ID NO:99, un bucle DE que comprende la SEQ ID NO: 100 y un bucle FG que comprende la SEQ ID NO: 101, en el que el resto de aminoácido G de DG en el bucle FG (es decir, D79) está sustituido con otro resto de aminoácido, por ejemplo, S, A, L o V. También se proporcionan proteínas ¹⁰F_n3 que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10⁻⁷ o menos, y comprenden un bucle BC que comprende la SEQ ID NO:99, un bucle DE que comprende la SEQ ID NO: 100 y un bucle FG que comprende las SEQ ID NO: 101, 129, 156, 183, 210, 237, 264, 291 o 318. Cualquiera de las proteínas ¹⁰F_n3 descritas en este párrafo puede comprender un resto de cisteína unido directa o indirectamente a su extremo C y/o puede comprender uno de los siguientes restos o secuencias de aminoácidos unidos directa o indirectamente al extremo C: P, PC, PCHHHHHH (SEQ ID NO: 395), PCPPPPPC (SEQ ID NO: 416) o PCPPPPPCHHHHHH (SEQ ID NO: 424).

También se proporcionan proteínas ¹⁰F_n3 que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10⁻⁷ o menos, y comprenden la secuencia central ADX_6077_A01, es decir, la SEQ ID NO: 98, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a los mismos o que difieren de ellos en 1-10, 1-5, 1-3, 1-2 o 1 sustitución de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos), deleciones o adiciones. También se proporcionan proteínas ¹⁰F_n3 que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10⁻⁷ o menos, y comprenden la secuencia central ADX_6077_A01, es decir, la SEQ ID NO: 98, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a los mismos o que difieren de ellos en 1-10, 1-5, 1-3, 1-2 o 1 sustitución de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos), deleciones o adiciones, y comprenden un bucle BC que comprende la SEQ ID NO:99, un bucle DE que comprende la SEQ ID NO: 100 y un bucle FG que comprende las SEQ ID NO: 101, o que difiere de las mismas en un aminoácido de DG. También se proporcionan proteínas ¹⁰F_n3 que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10⁻⁷ o menos, y comprenden la SEQ ID NO: 98 y la secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a los mismos o que difieren de ellos en 1-10, 1-5, 1-3, 1-2 o 1 sustitución de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos), deleciones o adiciones, y comprenden un bucle BC que comprende la SEQ ID NO:99, un bucle DE que comprende la SEQ ID NO: 100 y un bucle FG que comprende las SEQ ID NO: 101, 129, 156, 183, 210, 237, 264, 291 o 318. También se proporcionan proteínas ¹⁰F_n3 que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10⁻⁷ o menos, y comprenden un dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia central ADX_6077_A01, es decir, la SEQ ID NO: 98, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a los mismos o que difieren de ellos en 1-10, 1-5, 1-3, 1-2 o 1 sustitución de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos), deleciones o adiciones, y además comprende un resto de cisteína unido directa o indirectamente al extremo C-terminal. También se proporcionan proteínas ¹⁰F_n3 que se unen específicamente a GPC3 humano con una K_D de 10⁻⁷ o menos, y comprenden un dominio ¹⁰F_n3 que comprende la secuencia central ADX_6077_A01, es decir, la SEQ ID NO: 98, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a los mismos o que difieren de ellos en 1-10, 1-5, 1-3, 1-2 o 1 sustitución de

aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos), deleciones o adiciones, y además comprende uno de los siguientes restos o secuencias de aminoácidos unidos directa o indirectamente al extremo C-terminal: P, PC, PCHHHHHH (SEQ ID NO: 395), PCPPPPPC (SEQ ID NO: 416) o PCPPPPCHHHHHH (SEQ ID NO: 424).

5 En el presente documento se proporcionan proteínas ¹⁰F_n3 que comprenden la secuencia de aminoácidos de ADX_6077_A01 o ADX_6912_G02 (con o sin una metionina N-terminal) y con o sin una cola 6xHis.

10 También se proporcionan conjugados de fármacos que comprenden uno de los polipéptidos o proteínas ¹⁰F_n3 descritas en los párrafos anteriores, conjugado con un resto de fármaco, tal como un análogo de tubulicina.

15 Además se proporcionan proteínas o polipéptidos ¹⁰F_n3 que comprenden dominios ¹⁰F_n3 que comprenden en su extremo C una secuencia que comprende una o más cisteínas, en las que al menos una cisteína se conjuga con un análogo de tubulicina descrito en el presente documento. Por ejemplo, las proteínas o polipéptidos ¹⁰F_n3 que comprenden dominios ¹⁰F_n3 pueden estar unidos a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos PmCn, en la que m y n son independientes un número entero de 1 o más y en la que una o más cisteínas se conjugan con un análogo de tubulicina descrito en el presente documento.

20 En determinadas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de los bucles BC, DE y/o FG de cualquiera de las adnectinas anti-GPC3 (por ejemplo, las SEQ ID NO: 5, 9-18, 22-31, 35-44, 48-57, 61-70, 74-83, 87-98, 102-128, 130-155, 157-182, 184-209, 211-236, 238-263, 265-290, 292-317 y 319-343) descritas en el presente documento se injertan en armazones de proteínas de dominio no ¹⁰F_n3. Por ejemplo, una o más secuencias de aminoácidos de bucle se intercambian o insertan en uno o más bucles de CDR de una cadena pesada o ligera de anticuerpo o fragmento de la misma. En otras realizaciones, el dominio de proteína en el que se intercambian o insertan una o más secuencias de bucle de aminoácidos incluye, pero sin limitación, dominios de consenso F_n3 (Centocor, EE. UU.), proteínas de repetición de anquirina (Molecular Partners AG, Zurich, Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd, Cambridge, MA), nanocuerpos de camélido de dominio único (Ablynx, Bélgica), lipocalinas (por ejemplo, anticalinas; Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), avímeros (Amgen, CA), aficuerpos (Affibody AG, Suecia), ubiquitina (por ejemplo, aflinas; Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania), miméticos de epítopos proteicos (Polyphor Ltd, Allschwil, Suiza), armazones de haz helicoidal (por ejemplo, alfa-cuerpos, Complix, Bélgica), dominios Fyn SH3 (Covagen AG, Suiza) o atrímeros (Anaphor, Inc., CA).

B. Adnectinas anti-GPC3 de competencia cruzada

35 También se proporcionan adnectinas que compiten (por ejemplo, la competencia cruzada) para unirse a GPC3 humano con las adnectinas anti-GPC3 particulares descritas en el presente documento. Pueden identificarse dichos anticuerpos competitivos basándose en su capacidad para inhibir de manera competitiva la unión a GPC3 de las adnectinas descritas en el presente documento en ensayos estándar de unión a GPC3. Por ejemplo, pueden usarse ensayos ELISA convencionales en los que se inmoviliza una proteína GPC3 recombinante sobre la placa, se marca fluorescentemente una de las adnectinas y se evalúa la capacidad de las adnectinas no marcadas para competir por la unión de la adnectina marcada.

45 En determinadas realizaciones, se puede realizar un formato ELISA competitivo para determinar si dos adnectinas anti-GPC3 se unen a sitios de unión de adnectina superpuestos en GPC3. En un formato, la adnectina n.º 1 reviste una placa, que luego se bloquea y se lava. A esta placa se añade GPC3 solo o GPC3 preincubado con una concentración saturante de adnectina n.º 2. Después de un período de incubación adecuado, la placa se lava y se prueba con un anticuerpo policlonal anti-GPC3, tal como un anticuerpo policlonal biotinilado anti-GPC3, seguido de detección con conjugado de estreptavidina-HRP y procedimientos estándar de desarrollo de tetrametilbencidina. Si la señal de OD es la misma con o sin preincubación con adnectina n.º 2, las dos adnectinas se unen independientemente una de la otra, y sus sitios de unión de adnectina no se superponen. Si, sin embargo, la señal de OD para los pocillos que recibieron GPC3/adnectina n.º 2 es menor que para los que recibieron GPC3 solo, se confirma que la unión de adnectina n.º 2 bloquea la unión de adnectina n.º 1 a GPC3.

55 Como alternativa, se realiza un experimento similar por resonancia de plasmón superficial (SPR, por ejemplo, BIAcore). La adnectina n.º 1 se inmoviliza en una superficie de chip SPR, seguido de inyecciones de GPC3 solo o GPC3 preincubado con una concentración saturante de adnectina n.º 2. Si la señal de unión para GPC3/adnectina n.º 2 es igual o mayor que la de GPC3 solo, las dos adnectinas se unen independientemente una de la otra, y sus sitios de unión de adnectina no se superponen. Si, sin embargo, la señal de unión para mezclas de GPC3/adnectina n.º 2 es inferior a la señal de unión para GPC3 solo, se confirma que la unión de adnectina n.º 2 bloquea la unión de adnectina n.º 1 a GPC3. Una característica de estos experimentos es el uso de concentraciones saturantes de adnectina n.º 2. So el GPC3 no está saturado con adnectina n.º 2, las conclusiones anteriores no se mantienen. Se pueden usar experimentos similares para determinar si dos cualesquiera proteínas de unión a GPC3 se unen a sitios de unión de adnectina superpuestos.

65 Ambos ensayos ejemplificados anteriormente también pueden realizarse en el orden inverso en el que se inmoviliza la adnectina n.º 2 y se añaden GPC3-adnectina n.º 1 a la placa. Como alternativa, la adnectina n.º 1 y/o n.º 2 se

pueden reemplazar con un anticuerpo monoclonal y/o una proteína de fusión de Fc-receptor soluble.

En otra realización, la competencia se puede determinar utilizando un ensayo sándwich HTRF.

- 5 Las adnectinas anti-GPC3 competidoras candidatas pueden inhibir la unión de una adnectina anti-GPC3 descrita en el presente documento a GPC3 en al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % y/o su unión se inhibe en al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %. El % de competencia se puede determinar utilizando los métodos descritos anteriormente.

- 10 En algunas realizaciones, las moléculas que compiten con las adnectinas anti-GPC3 descritas en el presente documento no necesitan ser una adnectina, pero puede ser cualquier tipo de molécula que se una a GPC3, tal como, pero sin limitación, un anticuerpo, una molécula pequeña, un péptido y similares.

- 15 En determinadas realizaciones, una adnectina se une al mismo sitio de unión a adnectina en GPC3 que una adnectina anti-GPC3 particular descrita en el presente documento. Las técnicas de mapeo estándar, tales como el mapeo de proteasas, análisis de mutaciones, HDX-MS, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear en 2 dimensiones, se pueden usar para determinar si una adnectina se une al mismo sitio de unión de adnectina que una adnectina de referencia (véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

- 20 En algunas realizaciones, las adnectinas anti-GPC3 proporcionadas en el presente documento se unen a un sitio de unión a adnectina discontinuo en GPC3 humano. En algunas realizaciones, un FBS anti-GPC3 se une a una región de, por ejemplo, 10-20 restos de aminoácidos, dentro de GPC3 humano (SEQ ID NO: 344) que comprende la SEQ ID NO:345. En algunas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 se une a una región de, por ejemplo, 10-20 restos de aminoácidos, dentro de GPC3 humano (SEQ ID NO: 344) que comprende la SEQ ID NO:346. En otras realizaciones, un FBS anti-GPC3 une dos regiones de, por ejemplo, 10-20 restos de aminoácidos, cada uno en GPC3 humano (SEQ ID NO: 344), uno que comprende la SEQ ID NO: 345 y la otra región que comprende la SEQ ID NO: 346, respectivamente.

C. Adnectinas anti-GPC3 modificadas en N-terminal y C-terminal

- 35 En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de las regiones N-terminal y/o C-terminal de una adnectina se modifican por delección, sustitución o inserción en relación con las secuencias de aminoácidos de las regiones correspondientes de dominios ¹⁰F_n3 que comprenden, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1.

- 40 En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos de adnectinas, por ejemplo, que tienen secuencias que comienzan con "VSD", como en, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, puede modificarse o eliminarse en los polipéptidos proporcionados en el presente documento. En realizaciones de ejemplo, los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 1-7, 8 o 9 de adnectinas que tienen secuencias que comienzan con "VSD", como en, por ejemplo, SEQ ID NO:1 se reemplazan con una región N-terminal alternativa que tiene de 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, o 1 aminoácido de longitud.

- 45 Ejemplos de regiones N-terminales alternativas que se pueden añadir a las secuencias del núcleo de adnectina GPC3 o aquellas que comienzan con "VSD" incluyen (representado por el código de aminoácidos de una letra) M, MG, G, MGVSDVPRD (SEQ ID NO: 351) y GVSVDVPRD (SEQ ID NO: 352). Otras regiones adecuadas de N-terminal alternativas incluyen, por ejemplo, X_nSDVPRDL (SEQ ID NO: 353), X_nDVPRDL (SEQ ID NO: 354), X_nVPRDL (SEQ ID NO: 355), X_nPRDL (SEQ ID NO: 356), X_nRDL (SEQ ID NO: 357), X_nDL (SEQ ID NO: 358) o X_nL, en la que n = 0, 1 o 2 aminoácidos, en donde cuando n = 1, X es Met o Gly, y cuando n = 2, X es Met-Gly. Cuando se añade una secuencia de Met-Gly al extremo N-terminal de un dominio ¹⁰F_n3, la M generalmente se cortará, dejando una G en el extremo N-terminal. En otras realizaciones, la región de N-terminal alternativa comprende la secuencia de aminoácidos MASTSG (SEQ ID NO:359). En determinadas realizaciones, la extensión de N-terminal consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: M, MG y G.

- 50 En algunas realizaciones, una región C-terminal alternativa que tiene de 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, o 1 aminoácidos de longitud se puede añadir a la región C-terminal de las adnectinas GPC3 que termina en "RT", como, por ejemplo, en la SEQ ID NO: 1. Los ejemplos de secuencias alternativas de la región C-terminal incluyen, por ejemplo, polipéptidos que comprenden, que consisten esencialmente en, o que consisten en, EIEK (SEQ ID NO: 360), EGSGC (SEQ ID NO: 361), EIEKPCQ (SEQ ID NO: 362), EIEKPSQ (SEQ ID NO: 363), EIEKP (SEQ ID NO: 364), EIEKPS (SEQ ID NO: 365), EIEKPC (SEQ ID NO: 366), EIDK (SEQ ID NO: 367), EIDKPCQ (SEQ ID NO: 368) o EIDKPSQ (SEQ ID NO: 369). En determinadas realizaciones, la región C-terminal consiste en EIDKPCQ (SEQ ID NO:368). En determinadas realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 está unido a una secuencia de extensión C-terminal que comprende restos E y D, y puede tener entre 8 y 50, 10 y 30, 10 y 20, 5 y 10, y 2 y 4 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, las secuencias de la cola incluyen enlazadores basados en ED en los que la secuencia

comprende repeticiones en tándem de ED. En realizaciones de ejemplo, la secuencia de la cola comprende 2-10, 2-7, 2-5, 3-10, 3-7, 3-5, 3, 4 o 5 repeticiones ED. En determinadas realizaciones, las secuencias de la cola basadas en ED también pueden incluir restos de aminoácidos adicionales, tal como, por ejemplo: EI, EID, ES, EC, EGS y EGC. Tales secuencias están basadas, en parte, en secuencias de la cola de adnectina conocidas, tales como EIDKPSQ (SEQ ID NO: 369), en las que los restos D y K se han eliminado. En algunas realizaciones, la cola basada en ED comprende un resto E, I o E1 antes de las repeticiones de ED.

En determinadas realizaciones, las secuencias de extensión N- o C-terminal están unidas al dominio ¹⁰Fn3 con secuencias enlazadoras conocidas (por ejemplo, SEQ ID NO: 426-451 en la Tabla 13). En algunas realizaciones, Las secuencias pueden colocarse en el extremo C del dominio ¹⁰Fn3 para facilitar la unión de un resto farmacocinético. Por ejemplo, Se puede añadir un enlazador que contiene cisteína tal como GSGC al extremo C para facilitar la PEGilación dirigida al sitio en el resto de cisteína.

En determinadas realizaciones, un resto C-terminal alternativo, que se puede unir a los aminoácidos en C-terminal RT (es decir, el aminoácido 94, por ejemplo, como en la SEQ ID NO: 1) de las adnectinas de GPC3 comprende los aminoácidos P_mX_n, en la que 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 algunas realizaciones, m puede ser 1, 2, 3 o más. Por ejemplo, m puede ser 1-3 o m puede ser 1-2. "n" puede ser 0, 1, 2, 3 o más, por ejemplo, n puede ser 1-3 o 1-2.

El resto P_mX_n puede estar unido directamente al aminoácido C-terminal de un resto ¹⁰Fn3, por ejemplo, a su 94^o aminoácido (basado en la numeración de aminoácidos de la SEQ ID NO:1). El resto P_mX_n puede unirse mediante un enlace peptídico al 94^o aminoácido de un resto ¹⁰Fn3. Un solo resto de prolina al final de la SEQ ID NO: 1 se denomina "95Pro" o "Pro95" o "P95" o "95P".

En determinadas realizaciones, n no es 0, y puede ser, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 años o más. Por ejemplo, n puede ser de 0-10, 0-5, 0-3, 1-10, 1-5, 1-3 o 1-2. Sin embargo, más de 10 aminoácidos pueden estar unidos a la prolina. Por ejemplo, en un resto FBS en tándem o un resto FBS fusionado a otro polipéptido, el aminoácido C-terminal del resto FBS puede estar unido a una o más prolina, y la última prolina está unida al segundo resto FBS o al resto heterólogo. Por tanto, en determinadas realizaciones, n puede ser un número entero que oscila entre 0-100, 0-200, 0-300, 0-400, 0-500 o más.

En determinadas realizaciones, P_mX_n unido al terminal C de una adnectina GPC3 comprende una cisteína. Por ejemplo, el primer aminoácido después de la prolina puede ser una cisteína, y la cisteína puede ser el último aminoácido en la molécula o la cisteína puede estar seguida por uno o más aminoácidos. La presencia de una cisteína permite la conjugación de restos heterólogos con el resto FBS, por ejemplo, restos químicos, por ejemplo, PEG. Los ejemplos de restos P_mX_n que comprenden una cisteína incluyen: P_mCX_n, en la que C es una cisteína, cada X es independientemente 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 algunas realizaciones, m puede ser 1, 2, 3 o más. Por ejemplo, m puede ser 1-3 o m puede ser 1-2. "n" puede ser 0, 1, 2, 3 o más, por ejemplo, n puede ser 1-3 o 1-2. Otros restos de ejemplo de P_mX_n incluyen dos cisteínas, por ejemplo, P_mCX_{n1}CX_{n2}, en la que cada X es independientemente cualquier aminoácido, n₁ y n₂ son independientemente 0 o un número entero que es al menos 1. Por ejemplo, n₁ puede ser 1, 2, 3, 4 o 5 y n₂ puede ser 1, 2, 3, 4 o 5. Los restos de P_mX_n de ejemplo incluyen los enumerados en la Tabla 1.

Tabla 1: Restos de P_mX_n de ejemplo

Restos con 1 prolina	Restos con 2 o más prolina	Restos con 2 cisteínas
P	PP	PCC
PI	PPI	PCGC (SEQ ID NO: 412)
PC	PPC	PCPC (SEQ ID NO: 413)
PID	PPID (SEQ ID NO: 396)	PCGSGC (SEQ ID NO: 414)
PIE	PPIE (SEQ ID NO: 397)	PCPPPC (SEQ ID NO: 415)
PIDK (SEQ ID NO: 382)	PPIDK (SEQ ID NO: 398)	PCPPPPPC (SEQ ID NO: 416)
PIEK (SEQ ID NO: 383)	PPIEK (SEQ ID NO: 399)	PCGSGSGC (SEQ ID NO: 417)
PIDKP (SEQ ID NO: 384)	PPIDKP (SEQ ID NO: 400)	PCHHHHHC (SEQ ID NO: 418)
PIEKP (SEQ ID NO: 385)	PPIEKP (SEQ ID NO: 401)	PCCHHHHHH (SEQ ID NO: 419)
PIDKPS (SEQ ID NO: 386)	PPIDKPS (SEQ ID NO: 402)	PCGCHHHHHH (SEQ ID NO: 420)

45

(continuación)

Restos con 1 prolina	Restos con 2 o más prolina	Restos con 2 cisteínas
PIEKPS (SEQ ID NO: 387)	PPIEKPS (SEQ ID NO: 403)	PCPCHHHHHH (SEQ ID NO: 421)
PIDKPC (SEQ ID NO: 388)	PPIDKPC (SEQ ID NO: 404)	PCGSGCHHHHHH (SEQ ID NO: 422)
PIEKPC (SEQ ID NO: 389)	PPIEKPC (SEQ ID NO: 405)	PCPPPCHHHHHH (SEQ ID NO: 423)
PIDKPSQ (SEQ ID NO: 390)	PPIDKPSQ (SEQ ID NO: 406)	PCPPPPCHHHHHH (SEQ ID NO: 424)
PIEKPSQ (SEQ ID NO: 391)	PPIEKPSQ (SEQ ID NO: 407)	PCGSGSGCHHHHHH (SEQ ID NO: 425)
PIDKPCQ (SEQ ID NO: 392)	PPIDKPCQ (SEQ ID NO: 408)	
PIEKPCQ (SEQ ID NO: 393)	PPIEKPCQ (SEQ ID NO: 409)	
PHHHHHH (SEQ ID NO: 394)	PPHHHHHH (SEQ ID NO: 410)	
PCHHHHHH (SEQ ID NO: 395)	PPCHHHHHH (SEQ ID NO: 411)	

En determinadas realizaciones, por ejemplo, el resto PmX_n se selecciona entre el grupo que consiste en PC, PPC y PCC. En otra realización, el resto PmX_n es PmCX_{n1}CX_{n2}. En determinadas realizaciones, PmCX_{n1}CX_{n2} se selecciona del grupo que consiste en PCPPPC (SEQ ID NO: 415) y PCPPPPC (SEQ ID NO: 416).

Cualquiera de las modificaciones en C-terminal descritas en el presente documento puede aplicarse a las adnectinas GPC3.

Cualquiera de los restos PmX_n, por ejemplo, los que se muestran en la Tabla 1 pueden ir seguidos de una cola de histidina, por ejemplo, cola de 6xHis u otra etiqueta. Esto no excluye que se pueda incluir una cola de histidina en PmX_n.

En determinadas realizaciones, las proteínas de armazón basadas en fibronectina comprenden un dominio ¹⁰Fn3 que tiene una secuencia de región N-terminal alternativa y una secuencia de región C-terminal alternativa, y opcionalmente una cola de 6X His.

II. Polipéptidos multivalentes

En determinadas realizaciones, una proteína comprende FBS de GPC3 y al menos otro FBS. Un FBS multivalente puede comprender 2, 3 o más FBS, que se asocian de manera covalente. En realizaciones de ejemplo, el resto FBS es una proteína biespecífica o dimérica que comprende dos dominios ¹⁰Fn3.

Los restos FBS, por ejemplo, los dominios ¹⁰Fn3, en una proteína multivalente pueden estar conectados por un enlazador polipeptídico. Los enlazadores polipeptídicos de ejemplo incluyen polipéptidos que tienen de 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3 o 1-2 aminoácidos. Los enlazadores adecuados para unir los dominios ¹⁰Fn3 son aquellos 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. Ejemplos específicos de enlazadores adecuados incluyen enlazadores basados en glicina-serina, enlazadores basados en glicina-prolina, enlazadores basados en prolina-alanina, así como cualquier otro enlazador descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador basado en glicina-prolina. Estos enlazadores comprenden restos de glicina y prolina y pueden tener entre 3 y 30, 10 y 30, y 3 y 20 aminoácidos de longitud. Los ejemplos de dichos enlazadores incluyen GPG, GPGPGPG (SEQ ID NO: 436) y GPGPGPGPGPG (SEQ ID NO: 437). En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador basado en prolina-alanina. Estos enlazadores comprenden restos de prolina y alanina y pueden tener entre 3 y 30, 10 y 30, 3 y 20 y 6 y 18 aminoácidos de longitud. Ejemplos de tales enlazadores incluyen PAPAPA (SEQ ID NO: 438), PAPAPAPAPAPA (SEQ ID NO: 439) y PAPAPAPAPAPAPAPAPA (SEQ ID NO: 440). En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador basado en glicina-serina. Estos enlazadores comprenden restos de glicina y serina y pueden tener entre 8 y 50, 10 y 30, y 10 y 20 aminoácidos de longitud. Los ejemplos de dichos enlazadores pueden contener, por ejemplo, (GS)₅₋₁₀ (SEQ ID NO: 464), (G₄S)₂₋₅ (SEQ ID NO: 465) y (G₄S)₂G (SEQ ID NO: 466). Los ejemplos de tales enlazadores incluyen las SEQ ID NO: 427-439. En realizaciones de ejemplo, el enlazador no contiene ningún par Asp-Lys (DK).

III. Restos farmacocinéticos

Con fines terapéuticos, las adnectinas anti-GPC3 descritas en el presente documento pueden unirse directa o indirectamente a un resto farmacocinético (PK). La farmacocinética mejorada puede evaluarse según la necesidad terapéutica percibida. A menudo es deseable aumentar la biodisponibilidad y/o aumentar el tiempo entre dosis, posiblemente aumentando el tiempo que una proteína permanece disponible en el suero después de la dosificación. En algunos casos, es deseable mejorar la continuidad de la concentración sérica de la proteína a lo largo del tiempo

(por ejemplo, disminuir la diferencia en la concentración sérica de la proteína poco después de la administración y poco antes de la próxima administración). La adnectina anti-GPC3 se puede unir a un resto que reduce la velocidad de eliminación del polipéptido en un mamífero (por ejemplo, ratón, rata o ser humano) en más de dos veces, más de tres veces, más de cuatro veces o más de cinco veces con respecto a la adnectina anti-GPC3 no modificada. Otras medidas de farmacocinética mejorada pueden incluir la semivida en suero, que a menudo se divide en una fase alfa y una fase beta. Cualquiera o ambas fases pueden mejorarse significativamente mediante la adición de un resto apropiado. Por ejemplo, el resto PK puede aumentar la semivida en suero del polipéptido en más de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 200, 400, 600, 800, 1000 % o más en relación con el dominio Fn3 solo.

Restos que ralentizan la eliminación de una proteína de la sangre, en el presente documento denominado "restos PK", incluyen restos de polioxialquileo (por ejemplo, polietilenglicol), azúcares (por ejemplo, ácido siálico) y restos proteicos bien tolerados (por ejemplo, Fc y fragmentos y variantes de los mismos), transferrina o seroalbúmina). La adnectina anti-GPC3 también se puede fusionar a la albúmina o un fragmento (porción) o variante de la albúmina como se describe en la publicación de EE.UU. número 2007/0048282, o se puede fusionar a una o más adnectinas de unión a la seroalbúmina, como se describe en el presente documento.

Otros restos PK que pueden usarse en la invención incluyen los descritos en Kontermann et al., (Current Opinion in Biotechnology 2011;22:868-76). Dichos restos PK incluyen, pero sin limitación, fusiones de seroalbúmina humana, conjugados de seroalbúmina humana, ligantes de seroalbúmina humana (por ejemplo, adnectina PKE, AlbuAb, ABD), fusiones de XTEN, fusiones de PAS (es decir, miméticos de PEG recombinantes basados en los tres aminoácidos prolina, alanina y serina), conjugados de carbohidratos (por ejemplo, hidroxietilalmidón (HES)), glucosilación, conjugados de ácido polisálico y conjugados de ácido graso.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una adnectina anti-GPC3 fusionada a un resto PK que es un azúcar polimérico. En algunas realizaciones, el resto PK es un resto de polietilenglicol o una región Fc. En algunas realizaciones, el resto PK es una proteína de unión a seroalbúmina, tal como los descritos en las publicaciones de EE.UU. N.º 2007/0178082 y 2007/0269422. En algunas realizaciones, el resto PK es seroalbúmina humana. En algunas realizaciones, el resto PK es transferrina.

En algunas realizaciones, el resto PK está unido a la adnectina anti-GPC3 a través de un enlazador polipeptídico. Los enlazadores polipeptídicos de ejemplo incluyen polipéptidos que tienen de 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3 o 1-2 aminoácidos. Los enlazadores adecuados para unir los dominios Fn3 son aquellos 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. En realizaciones de ejemplo, el enlazador no contiene ningún par Asp-Lys (DK). Se proporciona una lista de enlazadores adecuados en la Tabla 14 (por ejemplo, SEQ ID NO: 426-451).

En algunas realizaciones, se une una adnectina anti-GPC3, por ejemplo, a una adnectina anti-HSA a través de un enlazador polipeptídico que tiene un sitio de proteasa que es escindible por una proteasa en la sangre o tejido diana. Dichas realizaciones pueden usarse para liberar una adnectina anti-GPC3 para mejores liberación o propiedades terapéuticas o una producción más eficiente.

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

45 Polietilenglicol

En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 comprende polietilenglicol (PEG). PEG es un polímero hidrosoluble bien conocido que está disponible en el mercado o puede prepararse por polimerización de apertura de anillo de etilenglicol de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica (Sandler y Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, Nueva York, Vol. 3, páginas 138-161). El término "PEG" se usa ampliamente para abarcar cualquier molécula de polietilenglicol, sin tener en cuenta el tamaño o la modificación al final del PEG, y puede representarse mediante la fórmula: $X-O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2OH$, en la que n es 20 a 2300 y X es H o una modificación terminal, por ejemplo, un radical alquilo C_{1-4} . El PEG puede contener grupos químicos adicionales que son necesarios para las reacciones de unión, que son el resultado de la síntesis química de la molécula; o que actúan como espaciadores para una distancia óptima de partes de la molécula. Además, dicho PEG puede consistir en una o más cadenas laterales de PEG que están unidas entre sí. Los PEG con más de una cadena de PEG se denominan PEG ramificados o de múltiples ramas. Los PEG ramificados se describen en, por ejemplo, la solicitud publicada europea n.º. 473084A y la patente de EE.UU. N.º 5,932,462.

60 Dominio Fc de inmunoglobulina (y fragmentos)

En determinadas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 se fusiona con un dominio Fc de inmunoglobulina, o un fragmento o variante del mismo. Tal como se usa en el presente documento, una "región Fc funcional" es un dominio Fc o fragmento del mismo que retiene la capacidad de unirse a FcRn. En algunas realizaciones, una región Fc funcional se une a FcRn, la yema no posee función efectora. La capacidad de la región Fc o fragmento de la misma para unirse a FcRn se puede determinar mediante ensayos de unión estándar conocidos en la técnica. En otras realizaciones, la

región Fc o fragmento de la misma se une a FcRn y posee al menos una "función efectora" de una región Fc nativa. "Funciones efectoras" ilustrativas incluyen la unión de C1q; citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por defecto de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B; BCR), etc. Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, una adnectina anti-GPC3) y puede evaluarse usando varios ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras de anticuerpos.

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

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

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV

KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP

APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

NYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 463)

La secuencia de la bisagra central está subrayada, y las regiones CH2 y CH3 están en texto regular. Debe entenderse que la lisina C-terminal es opcional. También se pueden usar alotipos y mutantes de esta secuencia. Como se conoce en la técnica, los mutantes pueden diseñarse para modular diversas propiedades de la Fc, por ejemplo, ADCC, CDC o semivida.

En determinadas realizaciones, la región Fc usada en la fusión de adnectina anti-GPC3 comprende una región CH1. En determinadas realizaciones, la región Fc usada en la fusión de adnectina anti-GPC3 comprende las regiones CH2 y CH3. En determinadas realizaciones, la región Fc usada en la fusión de adnectina anti-GPC3 comprende una región CH2, CH3 y región de bisagra.

En determinadas realizaciones, la región "bisagra" comprende las posiciones que abarcan los restos de bisagra central 1-16 de la SEQ ID NO:463 (DKTHTCPPCPAPELLG; SEQ ID NO: 464) de la región Fc de IgG1. En determinadas realizaciones, la fusión Fc-adnectina anti-GPC3 adopta una estructura multimérica (por ejemplo, dímero) debido, en parte, a los restos de cisteína en las posiciones 6 y 9 de SEQ ID NO: dentro de la región de la bisagra.

IV. Vectores y polinucleótidos

La invención se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos de la invención. Tal como aprecian los expertos en la materia, debido a la degeneración 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 el par de bases pueden dar como resultado una sustitución conservadora en la secuencia de aminoácidos codificada, pero no se espera que altere sustancialmente la actividad biológica del producto génico. Por tanto, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína descrita en el presente documento puede modificarse ligeramente en secuencia y aún codificar su respectivo producto génico. Ciertos ácidos nucleicos de ejemplo que codifican las adnectinas anti-GPC3 y sus fusiones descritas en el presente documento incluyen ácidos nucleicos que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 452-462.

Los ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las diversas proteínas que comprenden una adnectina anti-GPC3 desvelada en el presente documento pueden sintetizarse químicamente, enzimáticamente o recombinantemente. El uso de codones puede seleccionarse para mejorar la expresión en una célula. Tal uso de codones dependerá del tipo de célula seleccionado. Se han desarrollado patrones de uso de codones especializados para *E. coli* y otras bacterias,

así como células de mamífero, células vegetales, células de levadura y células de insecto. Véase, por ejemplo: Mayfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(2):438-442 (Jan. 21,2003); Sinclair et al., Protein Expr. Purif., 26(1):96-105 (Oct. 2002); Connell, N.D., Curr. Opin. Biotechnol., 12(5):446-449 (Oct. 2001); Makrides et al., Microbiol. Rev., 60(3):512-538 (Sep. 1996); y Sharp et al., Yeast, 7(7):657-678 (Oct. 1991).

5 Las técnicas generales para la manipulación de ácidos nucleicos se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda edición, Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), o Ausubel, F. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York (1987) y actualizaciones periódicas. El ADN que codifica el polipéptido está operativamente unido a elementos reguladores transcripcionales o traduccionales adecuados derivados de mamíferos, genes virales o de insectos. Dichos elementos reguladores incluyen un promotor de la transcripción, una secuencia de operador opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión al ribosoma de ARNm adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. La capacidad de replicar en un huésped, generalmente conferido por un origen de replicación, y se incorpora adicionalmente un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes.

Las proteínas descritas en el presente documento pueden producirse recombinantemente no solo directamente, pero también como un polipéptido con un polipéptido heterólogo, que es, preferentemente, una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada es, preferentemente, una que se reconoce y procesa (es decir, escindida por una señal peptidasa) por la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no reconocen y procesan una secuencia de señal nativa, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, 1pp o líderes estables de enterotoxina II (STII). 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 (incluidos los líderes de factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o un líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en la publicación PCT N.º WO 90/13646. En la expresión en células de mamífero, se dispone de secuencias señal de mamíferos, así como líderes de secreción viral, por ejemplo, la señal de herpes simplex gD. El ADN para dichas regiones precursoras puede estar ligado en marco de lectura al ADN que codifica la proteína.

Tanto los vectores de clonación como de expresión contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. De forma general, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique de forma independiente del ADN cromosómico del huésped e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónomas. Estas secuencias son bien conocidas para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gramnegativas, el origen plasmídico de 2 μ es adecuado para levadura y varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamíferos. De forma general, el componente del origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión en mamífero (el origen de SV40 normalmente se puede usar solo, dado que contiene el promotor temprano).

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa de bacilos.

Un gen de selección adecuado para su uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC® No. 44076 o PEP4-1. Jones, Genetics, 85:12 (1977). La presencia de daños en *trp1* en el genoma de la célula huésped levadura proporciona un ambiente eficaz para detectar transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano. De forma similar, las cepas de levaduras deficientes en *Leu2* (ATCC® 20.622 o 38.626) se complementan con plásmidos conocidos portadores del gen *Leu2*.

Normalmente, los vectores de expresión y clonación contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está operablemente unido al ácido nucleico que codifica la proteína. Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor *PhoA*, los sistemas promotores de beta-lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor *tac*. Sin embargo, otros promotores bacterianos conocidos son adecuados. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente unida al ADN que codifica la proteína.

Las secuencias promotoras son conocidas por eucariotas. Casi todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases cadena arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT (SEQ ID NO: 465), en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes

eucariotas hay una secuencia AATAAA (SEQ ID NO: 466) que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias pueden insertarse adecuadamente en vectores de expresión eucarióticos.

5 Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, trisfosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

10 Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras de la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levaduras se describen adicionalmente en la publicación de patente EP N.º 73.657 y las Publicaciones PCT N.º WO 2011/124718 y WO 2012/059486. Los potenciadores de levadura también se usan ventajosamente con promotores de levadura.

15 La transcripción a partir de vectores en células huésped de mamífero puede controlarse, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus de polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y, más preferentemente, virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor ACTIN® o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, con la condición de que tales promotores sean compatibles con los sistemas de la célula huésped.

25 Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación del virus SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos que usan el virus del papiloma bovino como vector se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.601.978. Véase también Reyes et al., Nature, 297: 598-601 (1982), sobre la expresión de ADNc de β-interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, se puede utilizar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous usado como promotor.

35 La transcripción de ADN que codifica una proteína por eucariotas superiores a menudo se incrementa al insertar una secuencia potenciadora en el vector. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α-fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariótica. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador del polio en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature, 297: 17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede sufrir corte y empalme en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia que codifica el polipéptido, pero preferentemente se localiza en un sitio 5' del promotor.

45 Los vectores de expresión utilizados en células huésped eucariotas (por ejemplo, levaduras, hongos, insectos, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están habitualmente disponibles a partir de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariota o viral. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el polipéptido. Un componente útil de terminación de la transcripción es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el presente documento.

50 El ADN recombinante también puede incluir cualquier tipo de secuencia de etiqueta de proteína que pueda ser útil para purificar las proteínas. Los ejemplos de marcadores de proteínas incluyen, pero sin limitaciones, una etiqueta de histidina, una etiqueta FLAG®, una etiqueta myc, una etiqueta HA o una etiqueta GST. Los vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con huéspedes de células de bacterias, fúngicas, de levadura y mamíferos se pueden encontrar en Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, Nueva York (1985).

60 La construcción de expresión puede introducirse en la célula huésped usando un método apropiado para la célula huésped, como será evidente para un experto en la materia. En la técnica se conocen diversos métodos para introducir ácidos nucleicos en las células huésped, 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).

65 Las células huésped adecuadas incluyen células procariotas, levaduras, células de mamífero o células bacterianas. Las bacterias adecuadas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *E. coli* o *Bacillus* spp.

Levadura, preferentemente de la especie *Saccharomyces*, tal como *S. cerevisiae*, también se puede utilizar para la producción de polipéptidos. También se pueden usar diversos sistemas de cultivo de células de mamífero o insecto para expresar proteínas recombinantes. Se revisan los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos por Luckow et al. (BioTechnology, 6:47 (1988)). Los ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero adecuadas incluyen células endoteliales, células renales de mono COS-7, CV-1, células L, C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano, líneas celulares HeLa, 293, 293T y BHK. Las proteínas purificadas se preparan cultivando sistemas huésped/vector adecuados para expresar las proteínas recombinantes. La proteína FBS se purifica a partir de medios de cultivo o extractos celulares.

10 **V. Producción de proteínas**

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

Las células huésped usadas para producir las proteínas pueden cultivarse en diversos medios. Los medios comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), medio mínimo esencial ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM), (Sigma)) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enzymol., 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem., 102:255 (1980), Las patentes de Estados Unidos n.º 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5.122.469; las publicaciones PCT n.º WO 90/03430; documento WO 87/00195; o la patente de Estados Unidos N.º RE30.985 puede usarse como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede completarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco gentamicina), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se pueden incluir otros suplementos necesarios en concentraciones apropiadas que conocerán los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tal como la temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la materia.

Las proteínas desveladas en el presente documento también se pueden producir usando sistemas de traducción sin células. Para tales fines, los ácidos nucleicos que codifican la proteína deben modificarse para permitir la transcripción *in vitro* para producir ARNm y para permitir la traducción libre de células del ARNm en el sistema particular libre de células que se está utilizando (eucariota, tal como un sistema de traducción acelular de mamífero o levaduras, procarionota, tal como un sistema de traducción acelular bacteriano).

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

Las proteínas desveladas en el presente documento pueden purificarse mediante métodos de aislamiento/purificación para proteínas generalmente conocidas en el campo de la química de proteínas. Los ejemplos no limitantes incluyen extracción, recristalización, desalado (por ejemplo, con sulfato de amonio o sulfato de sodio), centrifugación, diálisis, ultrafiltración, cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía en 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 estos. Después de la purificación, las proteínas pueden intercambiarse en diferentes tampones y/o concentrarse por cualquiera de diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, filtración y diálisis.

La proteína purificada tiene, preferentemente, una pureza de al menos un 85 %, más preferentemente, una pureza de al menos 95 %, y, lo más preferentemente, una pureza de al menos un 98 % o 99 %. Independientemente del valor numérico exacto de la pureza, la proteína es suficientemente pura para su uso como producto farmacéutico.

Un método para expresar adnectinas en *E. coli* es el siguiente. Un ácido nucleico que codifica una adnectina se clona en el vector PET9d aguas arriba de un marcador de HIS₆ y se transforma en células de *E. coli* BL21 DE3 plysS y se inocula en 5 ml de medio LB que contiene 50 µg/ml de kanamicina en un formato de 24 pocillos y se cultiva a 37 °C durante la noche. Se preparan cultivos frescos de medio LB de 5 ml (50 µg/ml de kanamicina) para la expresión inducible por aspiración de 200 µl del cultivo nocturno y se dispensan en el pocillo apropiado. Los cultivos se cultivan a 37 °C hasta A₆₀₀ de 0,6-0,9. Después de la inducción con isopropil-β-tiogalactósido 1 mM (IPTG), el cultivo se expresa durante 6 horas a 30 °C y se cosecha por 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 (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 0,5 M, 1x cóctel de inhibidor de proteasa Complete™ sin EDTA (Roche), PMSF 1 mM, CHAPS 10 mM, imidazol 40 mM, 1 mg/ml de lisozima, 30 µg/ml de ADNasa, 2 µg/ml de heparina, pH 8.0) y agitado a

temperatura ambiente durante 1-3 horas. Los lisados se eliminan y se vuelven a colocar en un formato de 96 pocillos mediante la transferencia a un Unifiltro Whatman GF/D de 96 pocillos equipado con una placa de captura de 96 pocillos, de 1,2 ml y se filtraron 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 equilibrio (NaH_2PO_4 , 50 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 40 mM, pH 8,0) y se incuban durante 5 minutos. 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 minutos 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 o las placas se centrifugan 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 y se añade fondo de la placa de captura de elución antes de la elución. La proteína eluida se cuantifica usando un ensayo de proteína total con el dominio $^{10}\text{Fn3}$ de tipo silvestre como el estándar de proteína.

Un método para la expresión y purificación a media escala de adnectinas insolubles es el siguiente. Un ácido nucleico que codifica una o más adnectinas, seguida del marcador de HIS_6 , se clona en un vector pET9d (EMD Bioscience, San Diego, CA) y se expresan en células *E. coli* HMS 174. Se usan veinte ml de un cultivo de inóculo (generado a partir de una sola colonia en placa) para inocular 1 litro de medio LB que contiene 50 $\mu\text{g/ml}$ de carbenicilina y 34 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol. El cultivo se cultiva a 37 °C hasta una A_{600} de 0,6-1,0. Después de la inducción con isopropil- β -tiogalactósido 1 mM (IPTG), el cultivo se cultiva durante 4 horas a 30 °C y se cosecha por centrifugación durante 30 minutos a > 10.000 g a 4 °C. Las pellas celulares se congelan a -80 °C. El sedimento celular se resuspende en 25 ml de tampón de lisis (aH_2PO_4 20 mM, NaCl 0,5 M, Cóctel de inhibidor de proteasa completa 1x libre de EDTA (Roche), PMSF 1 mM, pH 7,4) usando un homogeneizador ULTRA-TURRAX® (IKA funciona) en hielo. La lisis celular se logra mediante homogeneización a alta presión (> 124 MPa (> 18.000 psi)) utilizando un MICROFLUIDIZADOR® 10S Modelo M-1 (Microfluidics). La fracción insoluble se separa por centrifugación durante 30 minutos a 23.300 g a 4 °C. El sedimento insoluble recuperado de la centrifugación del lisado se lava con fosfato de sodio 20 mM/ NaCl 500 mM, pH 7,4. El sedimento se resolubiliza en hidrocloreuro de guanidina 6,0 M en fosfato de sodio 20 mM/ NaCl 500 M pH 7,4 con sonicación seguido de incubación a 37 grados durante 1-2 horas. El sedimento resolubilizado se filtra a 0,45 μm y se carga en una columna Histrap equilibrada con tampón fosfato de sodio 20 mM/ NaCl 500 M/guanidina 6,0 M pH 7,4 tampón. Tras la carga, la columna se lava durante 25 CV adicionales con el mismo tampón. La proteína unida se eluye con imidazol 50 mM en fosfato de sodio 20 mM/ NaCl 500 mM/guan-HCl 6,0 M a pH 7,4. La proteína purificada se vuelve a plegar por diálisis contra acetato de sodio 50 mM/ NaCl 150 mM pH 4,5.

Un método para la expresión y purificación a media escala de adnectinas solubles es el siguiente. Un ácido nucleico que codifica una o más adnectinas, seguido del marcador de HIS_6 , se clona en un vector pET9d (EMD Bioscience, San Diego, CA) y se expresa en células *E. coli* HMS174. Se usan veinte ml de un cultivo de inóculo (generado a partir de una sola colonia en placa) para inocular 1 litro de medio LB que contiene 50 $\mu\text{g/ml}$ de carbenicilina y 34 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol. El cultivo se cultiva a 37 °C hasta una A_{600} de 0,6-1,0. Después de la inducción con isopropil- β -tiogalactósido 1 mM (IPTG), el cultivo se cultiva durante 4 horas a 30 °C y se cosecha por 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 completa 1x libre de EDTA (Roche), PMSF 1 mM, pH 7,4) usando un homogeneizador ULTRA-TURRAX® (IKA funciona) en hielo. La lisis celular se logra mediante homogeneización a alta presión (> 124 MPa (> 18.000 psi)) utilizando un MICROFLUIDIZADOR® 10S Modelo M-1 (Microfluidics). La fracción soluble se separa por centrifugación durante 30 minutos a 23.300 g a 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. A continuación, se lava 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, a pH 7,4 y luego 35 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM/ NaCl 500 M/imidazol 40 mM, pH 7,4. La proteína se 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 en A_{280} y se dializan contra 1XPBS, Tris 50 mM, NaCl 150 mM; pH 8,5, NaOAc 50 mM; NaCl 150 mM; pH 4,5. Cualquier precipitado se elimina por filtración a 0,22 μm .

VI. Caracterización biofísica y bioquímica

La unión de las adnectinas anti-GPC3 descritas en el presente documento puede evaluarse en términos de constantes de equilibrio (por ejemplo, disociación, K_D) y en términos de constantes cinéticas (por ejemplo, constante de velocidad de asociación, k_{on} y constante de velocidad de disociación, k_{off}). Una adnectina generalmente se unirá a una molécula diana con una K_D de menos de 1 μM , 500 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 200 pM o 100 pM, aunque se pueden tolerar valores de K_D más altos cuando la k_{off} es suficientemente baja o la k_{on} , es suficientemente alta.

Ensayos in vitro para afinidad de unión

Los ensayos a modo de ejemplo para determinar la afinidad de unión de una adnectina anti-GPC3 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 (SPR) con el sistema Biacore (Uppsala, Suecia) (Welford et al., Opt. Quant. Elect 1991; 23:1; Morton y Myszka, Methods in Enzymology

1998; 295: 268) y ensayos de fluorescencia con resolución homogénea en el tiempo (HTRF) (Newton et al., J Biomol Screen 2008; 13:674-82; Patel et al., Ensayo Drug Dev Technol 2008; 6:55-68).

5 En determinadas realizaciones, las interacciones biomoleculares se pueden monitorizar en tiempo real con el sistema Biacore, que usa SPR para detectar cambios en el ángulo de resonancia de la luz en la superficie de una película delgada de oro sobre un soporte de vidrio debido a cambios en el índice de refracción de la superficie a una distancia de hasta 300 nm. El análisis 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
10 Biacore (Biacore, Inc.). Se activa un chip biosensor para el acoplamiento covalente de la diana. A continuación, la diana se diluye e inyecta sobre el chip para obtener una señal en unidades de respuesta de material inmovilizado. Como la señal en unidades de resonancia (UR) es proporcional a la masa del 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
15 1:1, produciendo los mejores valores de ajuste para k_{on} , k_{off} y R_{max} (respuesta máxima a saturación). Las Constantes de disociación de equilibrio para la unión, K_D , se calculan a partir de las mediciones de SPR como k_{off}/k_{on} .

20 En algunas realizaciones, las adnectinas anti-GPC3 descritas en el presente documento exhiben una K_D en el ensayo de afinidad SPR descrito en el Ejemplo 2 de 1 μ M o menos, 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, 200 nM o menos, 150 nM o menos, 100 nM o menos, 90 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 60 nM o menos, 50 nM o menos, 40 nM o menos, 30 nM o menos, 20 nM o menos, 15 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nm o menos, o 1 nm o menos.

25 En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 no se une sustancialmente a proteínas relacionadas, por ejemplo, la adnectina anti-GPC3 no se une sustancialmente a glipicano-1, glipicano-2, glipicano-4 o glipicano-6.

30 Debe entenderse que los ensayos descritos anteriormente en el presente documento son de ejemplo, y que cualquier método conocido en la técnica para determinar la afinidad de unión entre proteínas (por ejemplo, transferencia basada en fluorescencia (FRET), se pueden usar ensayos inmunosorbentes ligados a enzimas y ensayos de unión competitiva (por ejemplo, radioinmunoensayos) para evaluar las afinidades de unión de las adnectinas anti-GPC3 descritas en el presente documento.

Ensayos de células para la unión

35 En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 y sus conjugados se internalizan en una célula que expresa glipicano-3. Los ensayos estándar para evaluar la internalización de polipéptidos son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, un ensayo de internalización de HumZap. Para evaluar la unión a las células tumorales, por ejemplo, Hep-3b o Hep-G2 (depósito ATCC n.º HB-8064 y HB-8065, respectivamente), las células se pueden obtener de fuentes disponibles públicamente, tal como la Colección Americana de Cultivos Tipo, y se usan en ensayos
40 estándar, tal como el análisis de citometría de flujo.

VII. Conjugados farmacológicos

45 La invención se refiere a polipéptidos que comprenden un décimo dominio de fibronectina humana de tipo III (10 Fn3), por ejemplo, una adnectina, conjugado con un agente terapéutico o resto farmacológico. En un conjugado de adnectina y fármaco (AdxDC), el resto FBS (por ejemplo, adnectina anti-GPC3) se conjuga con un resto de fármaco, funcionando la adnectina como un agente dirigido para dirigir el AdxDC a una célula diana que expresa su GPC3, tal como una célula cancerosa. Una vez allí, el fármaco se libera, o bien dentro de la célula diana o en su vecindad, para actuar como un agente terapéutico. Para una revisión sobre el mecanismo de acción y el uso de conjugados farmacológico
50 como se usan con anticuerpos, por ejemplo, en la terapia del cáncer, véase Schrama et al., Nature Rev. Drug Disc., 5:147 (2006).

55 Los restos de fármacos adecuados para su uso en conjugados farmacológicos incluyen citoxinas o radiotoxinas. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, las mata), incluyendo, antimetabolitos, agentes alquilantes, aglutinantes de la ranura menor del ADN, intercaladores de ADN, reticulantes de ADN, inhibidores de la histona desacetilasa, inhibidores de exportación nuclear, inhibidores de proteosoma, inhibidores de topoisomerasa I o II, inhibidores de la proteína de choque térmico, inhibidores de tirosina quinasa, antibióticos y agentes anti-mitóticos.

60 Los ejemplos de agentes adecuados incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina,
65 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y

cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorrubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse con una adnectina anti-GPC3 de la invención incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maytansinas y auristatinas, y sus derivados.

Los conjugados farmacológicos de adnectina se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada y el resto farmacológico no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción farmacológica puede ser una proteína o un polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa o fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína, tal como el factor de necrosis tumoral, o interferón-gamma; o, modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de las colonias de granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulante de las colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

Una adnectina anti-GPC3 puede conjugarse con un agente terapéutico usando la tecnología de enlazadores disponible en la técnica. Los ejemplos de tipos de enlazadores que se han usado para conjugar una citotoxina a una adnectina incluyen, pero sin limitación, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptidos. Se puede elegir un enlazador que sea, por ejemplo, susceptible a la escisión por pH bajo dentro del compartimento lisosómico o susceptible a la escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas preferentemente en tejido tumoral, tales como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D). Se describen ejemplos de citotoxinas, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 6,989,452, 7,087,600 y 7,129,261, y en las solicitudes PCT N.º PCT/US02/17210, PCT/US2005/017804, PCT/US06/37793, PCT/US06/060050, PCT/US2006/060711, WO/2006/110476, y en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 60/891,028.

En determinadas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 y el agente terapéutico preferentemente se conjugan a través de un enlazador escindible, tal como un enlazador de peptidilo, disulfuro o hidrazona. Más preferentemente, el enlazador es un enlazador de peptidilo que puede comprender Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 467), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser, o Glu. Los FBS-DC se pueden preparar de acuerdo con métodos similares a los descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 7,087,600; 6,989,452; y 7,129,261; las publicaciones PCT n.º WO 02/096910; documento WO 07/038658; documento WO 07/051081; documento WO 07/059404; documento WO 08/083312; y WO 08/103693; las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 2006/0024317; 2006/0004081; y 2006/0247295.

Un enlazador en sí mismo puede unirse, por ejemplo, unirse de forma covalente, por ejemplo, usando química de maleimida, a una cisteína de un resto PmXn en la adnectina anti-GPC3, en el que al menos una X es una cisteína. Por ejemplo, un enlazador se puede unir covalentemente a un adnectina-PmXn anti-GPC3, en el que al menos una X es una cisteína. Por ejemplo, un enlazador se puede unir a un adnectina-PmCn anti-GPC3, en el que P es una prolina, C es una cisteína, y m y n son números enteros que son al menos 1, por ejemplo, 1-3. La ligadura a una cisteína se puede realizar como se conoce en la técnica usando química de maleimida (por ejemplo, Imperiali, B. *et al.*, Protein Engineering: Nucleic Acids and Molecular Biology, Vol. 22, págs. 65-96, Gross, H.J., ed. (2009)). Para conectar un enlazador a una cisteína en un anti-GPC3FBS, el enlazador puede, por ejemplo, comprender un resto maleinimido, en el que el resto reacciona luego con la cisteína para formar un enlace covalente. En determinadas realizaciones, los aminoácidos que rodean la cisteína están optimizados para facilitar la reacción química. Por ejemplo, una cisteína puede estar rodeada de aminoácidos cargados negativamente para una reacción más rápida en relación con una cisteína que está rodeada por un tramo de aminoácidos cargados positivamente (documento EP 1074563). El enlace de un resto farmacológico a una cisteína en una adnectina anti-GPC3 es un enlace específico del sitio.

Para el tratamiento del cáncer, el fármaco preferentemente es un fármaco citotóxico que causa muerte de la célula cancerosa dirigida. Los fármacos citotóxicos que se pueden usar en los FBS-DC anti-GPC3 incluyen, por ejemplo, los siguientes tipos de compuestos y sus análogos y derivados:

(a) enediinas tales como caliqueamicina (véase, por ejemplo, Lee *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 1987, 109, 3464 y 3466) y uncialmacina (véase, por ejemplo, Davies *et al.*, documento WO 2007/038868 A2 (2007); Chowdari *et al.*, documento US 8.709.431 B2 (2012); y Nicolaou *et al.*, documento WO 2015/023879 A1 (2015));

(b) tubulisininas (véase, por ejemplo, Domling *et al.*, documento US 7.778.814 B2 (2010); Cheng *et al.*, documento US 8.394.922 B2 (2013); y Cong *et al.*, documento US 8.980.824 B2 (2015));

(c) alquilantes de ADN, tales como análogos de CC-1065 y duocarmicina (véase, por ejemplo, Boger, US 6.545.530 B1 (2003); Sufi *et al.*, documento US 8.461.117 B2 (2013); y Zhang *et al.*, documento US 8.852.599 B2 (2014));

(d) epotilonas (véase, por ejemplo, Vite *et al.*, US 2007/0275904 A1 (2007) y US RE42930 E (2011));

(e) auristatinas (véase, por ejemplo, Senter *et al.*, US 6.844.869 B2 (2005) y Doronina *et al.*, documento US

7.498.298 B2 (2009));

(f) dímeros de pirrolobenzodiazepina (PBD) (véase, por ejemplo, Howard et al., US 2013/0059800 A1(2013); US 2013/0028919 A1 (2013); y WO 2013/041606 A1 (2013)); y

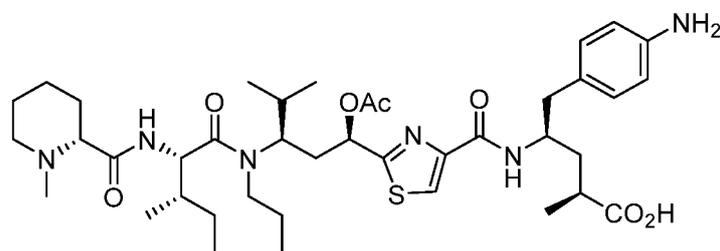
5

(g) maitansinoides tales como DM1 y DM4 (véase, por ejemplo, Chari et al., US 5.208.020 (1993) y Amphlett et al., US 7.374.762 B2 (2008)).

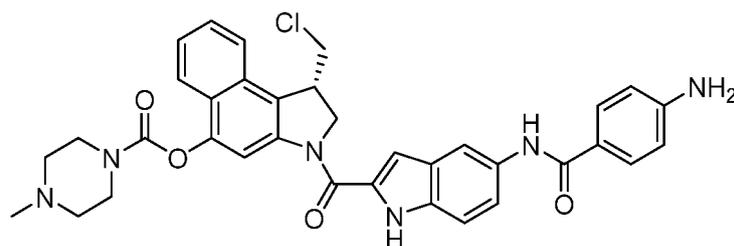
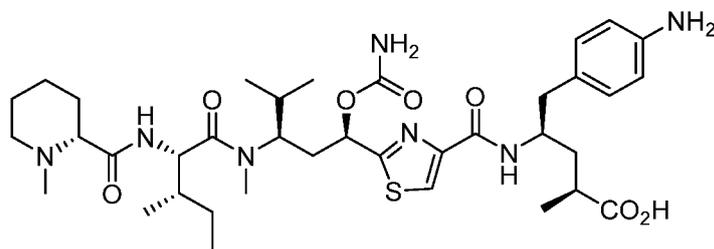
Las referencias de restos de fármacos anteriores, además de desvelar los restos de fármacos adecuados, también desvelan enlazadores que pueden usarse para hacer compuestos de fármaco-enlazador adecuados para conjugarlos. Se encuentran divulgaciones particularmente pertinentes relacionadas con la preparación de compuestos de fármaco-enlazador en Chowdari et al., documento US 8.709.431 B2 (2012); Cheng et al., documento US 8.394.922 B2 (2013); Cong et al., documento US 8.980.824 B2 (2015); Sufi et al., documento US 8.461.117 B2 (2013); y Zhang et al., documento US 8.852.599.

15

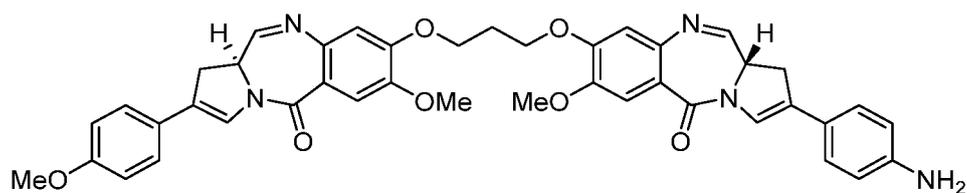
Preferentemente, el resto de fármaco es un alquilante de ADN, tubulisina, auristatina, pirrolobenzodiazepina, enediina o compuesto maitansinoide, tales como:

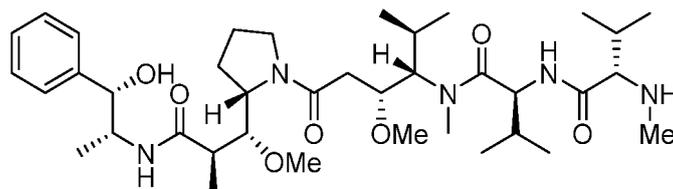
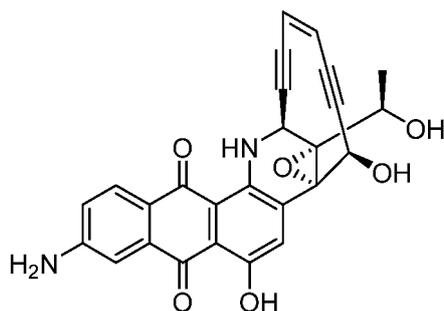


20

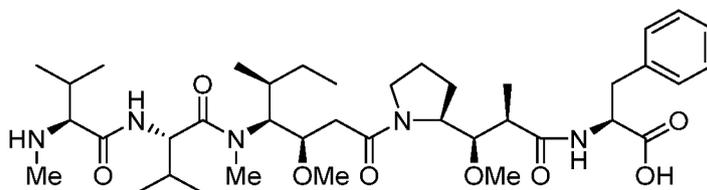


25



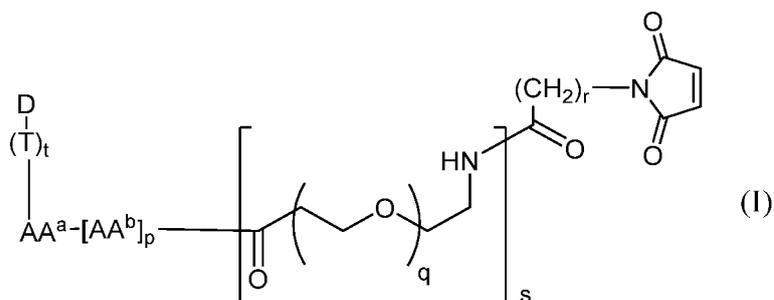


5 o



10 El grupo funcional en el que se efectúa la conjugación es el grupo amina (-NH₂) en el caso de los primeros cinco fármacos anteriores y el grupo metilamina (-NHMe) en el caso de los dos últimos fármacos.

15 Para conjugar un fármaco con una adnectina, se necesita un grupo enlazador. El fármaco se combina con el enlazador para formar un compuesto enlazador-fármaco, que luego se conjuga con la adnectina. Un compuesto fármaco-enlazador puede representarse mediante la fórmula (I)



en la que

20 D es un fármaco;

T es un grupo autoinmolador;

25 t es 0 o 1;

AA^a y cada AA^b se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, omitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;

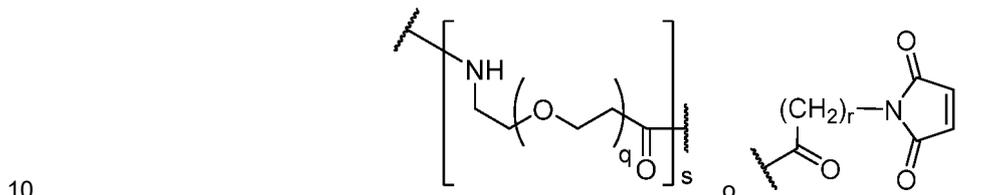
30 p es 1, 2, 3 o 4;

q es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

r es 1, 2, 3, 4 o 5; y

s es 0 o 1.

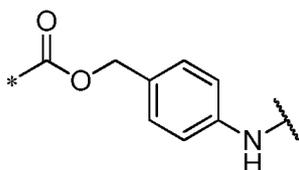
- 5 En la fórmula (II), $-AA^a-[AA^b]_p-$ representa un polipéptido cuya longitud está determinada por el valor de p (dipéptido si p es 1, tetrapéptido si p es 3, etc.). AA^a está en el extremo carboxi del polipéptido y su grupo carboxilo forma un enlace peptídico (amida) con un nitrógeno amina del fármaco D (o grupo T autoinmolador, si está presente). Por el contrario, el último AA^b está en el extremo amino del polipéptido y su grupo α -amino forma un enlace peptídico con



- dependiendo de si s es 1 o 0, respectivamente. Los polipéptidos preferidos $-AA^a-[AA^b]_p-$ son Val-Cit, Val-Lys, Lys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, Val-Ala, Lys-Val-Cit, Ala-Val-Cit, Val-Gly, Val-Gln y Asp-Val-Cit, escrito en la dirección convencional de N a C, como en $H_2N-Val-Cit-CO_2H$). Más preferentemente, el polipéptido es Val-Cit, Val-Lys o Val-Ala. Preferentemente, un polipéptido $-AA^a-[AA^b]_p-$ es escindible por una enzima que se encuentra dentro de la célula diana (cáncer), por ejemplo, una catepsina, y especialmente catepsina B.
- 15

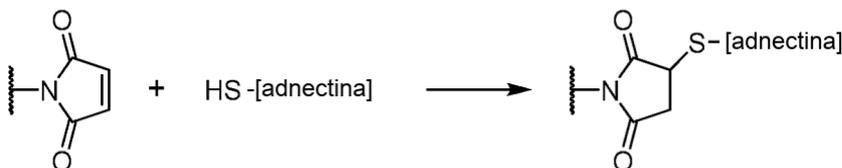
- Si el subíndice s es 1, el enlazador-fármaco (I) contiene un grupo poli(etilenglicol) (PEG), que puede mejorar ventajosamente la solubilidad del enlazador-fármaco (I), facilitando la conjugación con la adnectina, una etapa que se realiza en medios acuosos. Asimismo, un grupo PEG puede servir como un espaciador entre la adnectina y el péptido $-AA^a-[AA^b]_p-$, para que la mayor parte de la adnectina no interfiera estéricamente con la acción de una enzima de escisión peptídica.
- 20

- Como lo indica el subíndice t es igual a 0 o 1, opcionalmente está presente un grupo T autoinmolador. Un grupo autoinmolador es uno tal que la escisión de AA^a o AA^b , según sea el caso, inicia una secuencia de reacción que da como resultado que el grupo autoinmolador se desprenda del fármaco D y libere al último para ejercer su función terapéutica. Cuando están presentes, el grupo T autoinmolador, preferentemente, es un grupo p-aminobencil oxycarbonilo (PABC), cuya estructura se muestra a continuación, con un asterisco (*) que indica el extremo del PABC unido a un nitrógeno amina del fármaco D y una línea ondulada (~~~~~) que indica el extremo unido al polipéptido $-AA^a-[AA^b]_p-$.
- 25
- 30

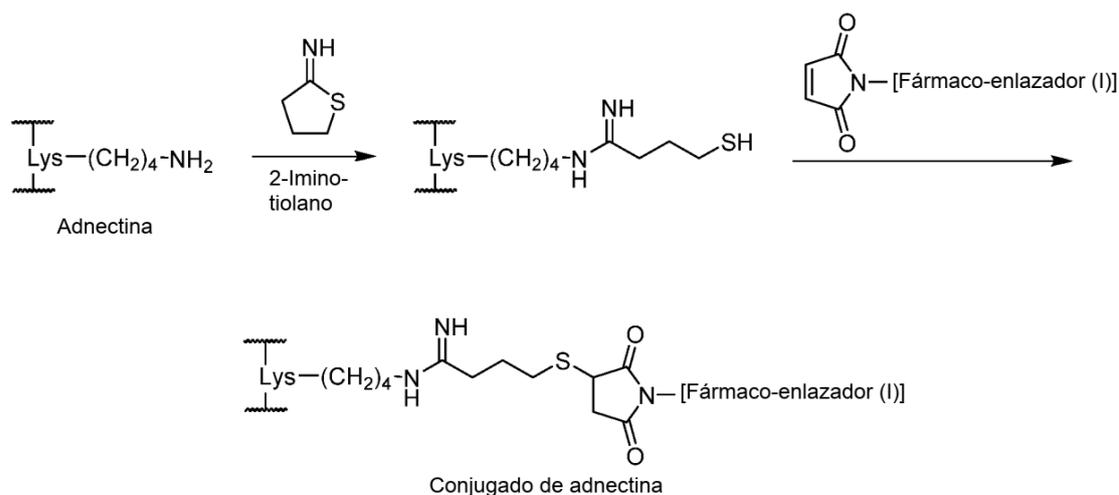


- Otro grupo autoinmolador que puede usarse es un tiazol sustituido, como se desvela en Feng, documento US 7.375.078 B2 (2008).
- 35

El grupo maleimida en la fórmula (I) sirve como un grupo funcional reactivo para la unión a la adnectina a través de una reacción de adición de Michael por un grupo sulfhidrilo en la adnectina, como se muestra a continuación:



- Como alternativa, un grupo ϵ -amino en la cadena lateral de un resto de lisina de la adnectina puede hacerse reaccionar con 2-iminotiolano para introducir un grupo tiol libre (-SH). El grupo tiol puede reaccionar con el grupo maleimida en el enlazador-fármaco (I) para efectuar la conjugación:
- 45



La conjugación mediante este último método a veces se denomina "conjugación aleatoria" como el número y la posición de los restos de lisina modificados por el iminotiolano es difícil de predecir.

5

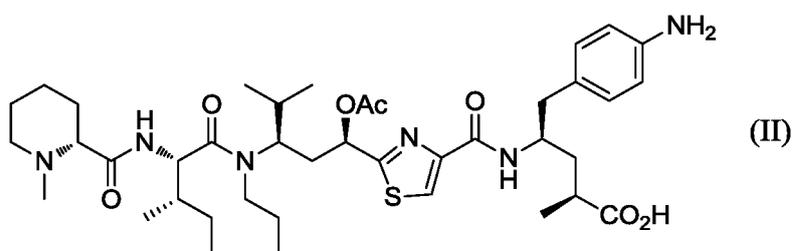
En determinadas realizaciones, el agente terapéutico en un conjugado de fármaco FBS, por ejemplo, AdxDC, es tubulisina o análogo de tubulisina. Las tubulinas pertenecen a un grupo de polipéptidos antimicóticos y depsipéptidos de origen natural que incluyen las fomopsinas, las dolastatinas y las criptoficinas (Hamel et al., Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents, 2002, 2: 19-53). Las tubulinas impiden el ensamblaje de las tubulinas en microtúbulos, haciendo que las células afectadas se acumulen en la fase G₂/M y sufran apoptosis (Khalil et al., ChemBioChem 2006, 7:678-683).

10

Además de las tubulinas de origen natural, se han descrito los análogos de tubulisina sintética con potente actividad citotóxica que son adecuados para su uso en el conjugado de fármaco de armazón FBS, por ejemplo, AdxDC, proporcionados en el presente documento, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 8.394.922 y 8.980.824.

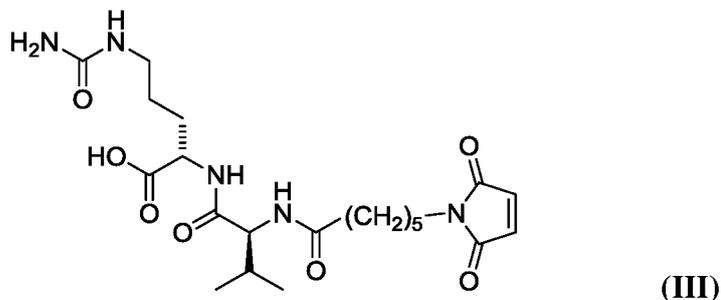
15

En algunas realizaciones, el agente terapéutico en el AdxDC es un análogo sintético de tubulisina sintética y tiene una estructura representada por la fórmula (II):



20

Para conjugar un resto de fármaco, por ejemplo, que tiene la fórmula II, un armazón de FBS, por ejemplo, un armazón FBS anti-GPC3, se usa un resto enlazador que tiene una estructura representada por la fórmula (III):



25

Este resto enlazador comprende un dipéptido valina-citrulina (Val-Cit, citado en la dirección convencional N-C), que está diseñada para ser escindida por la enzima intracelular catepsina B después de que el AdxDC haya alcanzado una célula cancerosa diana y haya sido internalizado por ella, liberando así el agente terapéutico para ejercer su efecto citotóxico (Dubowchik et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8:3341-3346; Dubowchik et al., Biorg. Med. Chem. Lett.,

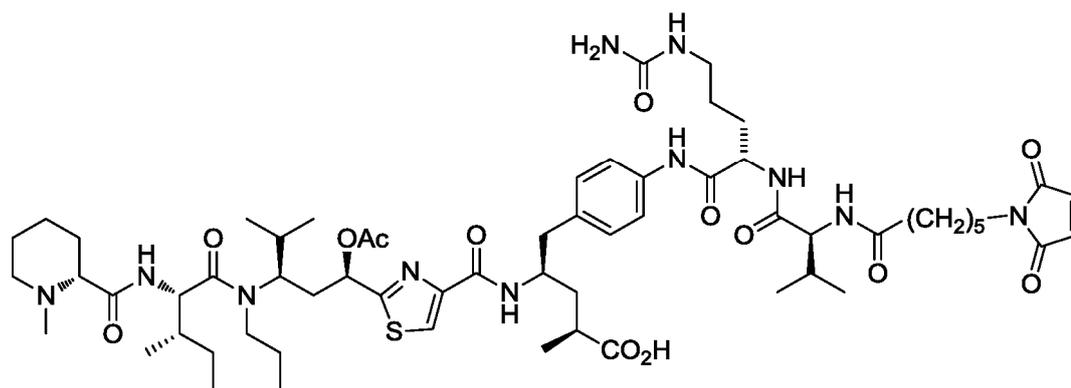
30

1998, 8:3347-3352; Dubowchik et al., Bioconjugate Chem., 2002, 13:855-869).

El fármaco (II) y el enlazador (III) se acoplan para producir un compuesto enlazador-fármaco que tiene una estructura representada por la fórmula (IV), que luego se conjuga con la adnectina. La preparación del enlazador-fármaco (IV) se describe en Cheng et al., documento US 8.394.922 B2 (2013) (véase, por ejemplo, la Fig. 20b y el Ejemplo 22). Los expertos en la materia apreciarán que, en el caso del enlazador-fármaco (IV), ni un grupo autoinmolador opcional ni un grupo PEG están presentes, pero que tales grupos pueden incorporarse si se desea.

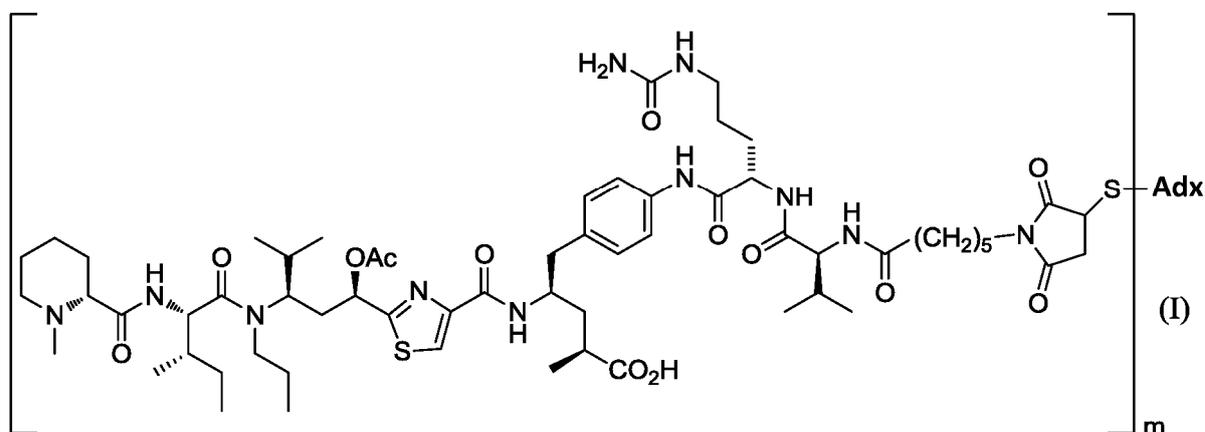
En la preparación de un conjugado AdxDC, se prepara un compuesto agente terapéutico-enlazador que tiene una estructura representada por la fórmula (IV), que después se conjuga al armazón de FBS.

(IV)



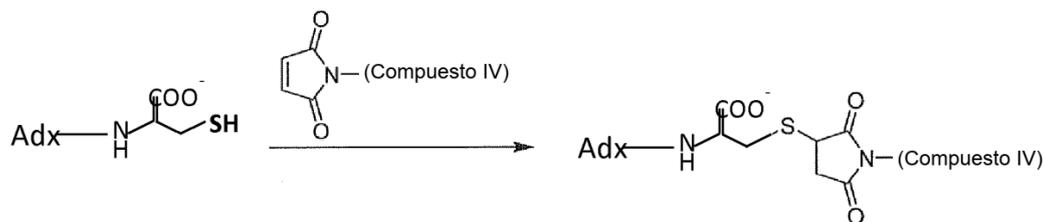
En algunas realizaciones, el conjugado FBS-fármaco tiene una estructura representada por la Fórmula (V).

(V)



en la que m es 1, 2, 3, 4 o más. En determinadas realizaciones, m es 1. En otras realizaciones, m es 2.

En una realización, un grupo tiol en la cadena lateral de un resto de cisteína C-terminal de la adnectina anti-GPC3 (Adx) se hace reaccionar con el grupo maleimida en el compuesto (V) para efectuar la conjugación:



AdxDC DAR1

En otra realización, los grupos tiol de dos cisteínas localizadas en el extremo C de la adnectina anti-GPC3 (Adx) reaccionan con el grupo maleimida en el compuesto (IV) para efectuar la conjugación de dos moléculas de fármaco por adnectina (por ejemplo, DAR2, la figura 2).

5 En algunas realizaciones, la anti-GPC3Adx en el conjugado tiene una secuencia de aminoácidos como se ha descrito anteriormente en la Sección IA que se ha modificado para contener una cola C-terminal que comprende una cisteína. En algunas realizaciones, la anti-GPC3Adx comprende una secuencia de aminoácidos centrales seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 9-10, 18, 22-23, 31, 35-3644, 48-49, 57, 61-62, 70, 74-75, 83, 87-88, 98, 102-105, 128, 130-132, 155, 157-159, 180, 184-186, 20-, 211-213, 236, 238-240, 263, 265-267, 290, 292-294, 317 y 319-321, que se modifica para contener un resto C-terminal que comprende una cisteína.

15 En algunas realizaciones, la anti-GPC3Adx se ha modificado para contener un resto C-terminal que consiste en P_mCX_n o $P_mCX_{n1}CX_{n2}$, como se define en el presente documento. En determinadas realizaciones, el resto C-terminal consiste en PC, PCC o una cualquiera de las secuencias en C-terminal descritas en el presente documento, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 409-423. En determinadas realizaciones, el resto C-terminal consiste en PC o PCPPPPPC (SEQ ID NO:416).

20 En determinadas realizaciones, la Adx anti-GPC3 modificada comprende un resto en C-terminal que consiste en P_mCX_n y se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11-14, 24-27, 37-40, 50-53, 63-66, 76-79, 89-93, 106-118, 133-145, 160-172, 187-199, 214-226, 241-253, 268-280, 295-307 y 322-334.

25 En determinadas realizaciones, la Adx anti-GPC3 modificada comprende un resto en C-terminal que consiste en $P_mCX_{n1}CX_{n2}$ y se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 15-17, 28-30, 41-43, 54-57, 67-70, 80-83, 94-97, 119-127, 146-154, 173-181, 200-208, 227-235, 254-262, 281-289, 308-316 y 335-343.

En realizaciones particulares, la Adx anti-GPC3 para su uso en el conjugado farmacológico es una cualquiera de las SEC ID NO: 114-118; 123-127; 141-145; 150-154; 168-172; 177-181; 195-199; 204-208; 222-226; 231-235; 249-253; 258-262; 276-280; 285-289; 303-307; 312-316; 330-334; y 339-343.

30 Las adnectinas anti-GPC3 descritas en el presente documento también pueden conjugarse con un isótopo radiactivo para generar radiofármacos citotóxicos. Los ejemplos de isótopos radiactivos que se pueden conjugar con anticuerpos para su uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero sin limitación, yodo¹³¹, indio¹¹¹, ytrio⁹⁰ y lutecio¹⁷⁷. Los métodos para preparar radioconjugados se encuentran establecidos en la técnica.

35 **VIII. Composiciones farmacéuticas**

La invención se refiere a composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden los polipéptidos de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable, o los conjugados de la invención, en las que la composición está esencialmente exenta de endotoxinas y/o pirógenos.

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

55 Las formulaciones terapéuticas que comprenden proteínas se preparan para el almacenamiento mezclando las proteínas descritas que tienen el grado deseado de pureza con vehículos fisiológicamente aceptables opcionales, excipientes o estabilizadores (Osol, A., ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición (1980)), en forma de soluciones acuosas, formulaciones liofilizadas u otras formulaciones secas. Los vehículos, excipientes y/o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como Tween,

PLURONIC® o polietilenglicol (PEG).

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

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Dichas moléculas están presentes de manera conveniente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin que se pretende.

Las proteínas pueden inmovilizarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Osol, A., ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición (1980).

Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* son generalmente estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen las proteínas descritas en el presente documento, estando dichas matrices una forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etilvinilacetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como la serie LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli-ácido D-(-)-3-hidroxi-butírico. Mientras que los polímeros tales como etilvinilacetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden crear estrategias racionales para la estabilización según el mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlace S-S intermolecular a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando restos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices de polímeros específicas.

En aplicaciones terapéuticas, las proteínas se administran a un sujeto, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Se pueden administrar por vía intravenosa en bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vías intramuscular, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o inhalación. La proteína también puede administrarse por vía intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, para ejercer también efectos terapéuticos locales y sistémicos. Los vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos y pueden ser determinados por los expertos en la técnica según lo requiera la situación clínica. Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH de aproximadamente 7,4, que contiene aproximadamente de 1 mg/ml a 25 mg/ml de seroalbúmina humana, (2) solución salina al 0,9 % (NaCl al 0,9% p/v) y (3) dextrosa al 5 % (p/v). Los métodos de la presente divulgación pueden ponerse en práctica *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

La administración de proteínas, y uno o más agentes terapéuticos adicionales, ya sea coadministrado o administrado secuencialmente, puede realizarse como se ha descrito anteriormente para aplicaciones terapéuticas. El experto en la técnica entenderá que los vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración conjunta dependen de la identidad del agente terapéutico particular que se administra conjuntamente.

Cuando está presente en una forma de dosificación acuosa, en lugar de liofilizada, la proteína normalmente se formulará a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, aunque se permite una amplia variación fuera de estos intervalos. Para el tratamiento de enfermedades, la dosificación apropiada de proteínas dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, la gravedad y la evolución de la enfermedad, de si las proteínas se administran con fines preventivos o terapéuticos, el curso de la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta a la fusión y el criterio del médico encargado de la atención. La proteína se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a una dosis que produce el efecto deseado para el que se administra. La dosis exacta dependerá del trastorno que se va a tratar y un experto en la técnica la podrá determinar usando técnicas conocidas. Las dosis preferidas pueden variar de aproximadamente 10 mg/metro cuadrado a aproximadamente 2000 mg/metro cuadrado, más preferentemente, de aproximadamente 50 mg/metro cuadrado a aproximadamente 1000 mg/metro cuadrado. En algunas realizaciones, la adnectina anti-GPC3 o AdxDC anti-GPC3 se administra a aproximadamente 0,01 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg al día, de 0,01 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg al día, o de 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg al día.

La adnectina anti-GPC3 o AdxDC anti-GPC3 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, una vez cada tres semanas o mensualmente). Además, como se conoce en la técnica, ajustes según la edad así como el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la interacción de medicamentos y la gravedad de la enfermedad pueden ser necesarios, y será comprobable con la experimentación de rutina por parte de los expertos en la materia.

IX. Métodos terapéuticos

Las adnectinas anti-GPC3 y sus conjugados farmacológicos descritos en el presente documento son adecuados para su uso en el tratamiento de cánceres que tienen células tumorales que expresan GPC3, por ejemplo, altos niveles de GPC3, por ejemplo, en relación con los tejidos sanos. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular (CHC) o hepatoblastoma), melanoma, sarcoma, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón escamoso) y tumor de Wilm. Adicionalmente, las adnectinas de GPC3 descritas en el presente documento son adecuadas para su uso en el tratamiento de neoplasias malignas recurrentes o refractarias.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" pretende incluir seres humanos y animales no humanos. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos mediados por la actividad de GPC3 o células indeseables que expresan niveles altos de GPC3. Cuando las adnectinas anti-GPC3 o sus conjugados de fármacos se administran junto con otro agente, los dos se puede administrar en cualquier orden o simultáneamente.

Por ejemplo, las adnectinas anti-GPC3, las moléculas multiespecíficas o biespecíficas y sus conjugados farmacológicos pueden usarse para provocar *in vivo* o *in vitro* una o más de las siguientes actividades biológicas: para inhibir el crecimiento y/o matar una célula que expresa GPC3; para participar en la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa GPC3 en presencia de células efectoras humanas, o para modular potencialmente la actividad GPC3, por ejemplo, bloqueando la unión de ligando de GPC3 a GPC3.

En determinadas realizaciones, las adnectinas anti-GPC3 o AdxDC anti-GPC3 descritas en el presente documento se combinan con un agente inmunogénico, por ejemplo, una preparación de células cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidratos), células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas portadoras de antígenos asociados a tumores, y las células transfectadas con genes que codifican citocinas inmunoestimulantes (He et al, 2004). Los ejemplos no limitativos de vacunas tumorales que se pueden usar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MARTI y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citocina GM-CSF. El bloqueo de GPC3 también puede combinarse con tratamientos estándar contra el cáncer, incluidos regímenes quimioterapéuticos, radiación, cirugía, privación hormonal e inhibidores de la angiogénesis, así como otro agente inmunoterapéutico (por ejemplo, adnectinas o anticuerpos anti-PD-1, anti-CTLA-4 y anti-LAG-3).

En el presente documento se describen métodos de terapia combinada en los que se administra una adnectina anti-GPC3 y/o AdxDC anti-GPC3 (simultánea o sucesivamente) con uno o más agentes adicionales, por ejemplo, fármacos de molécula pequeña, anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos, que son eficaces en respuestas inmunitarias estimulantes para, de ese modo, potenciar, estimular o regular al alza las respuestas inmunitarias en un sujeto.

De forma general, una adnectina anti-GPC3 o AdxDC anti-GPC3, por ejemplo, descrita en el presente documento, también se puede combinar con un agente inmunooncológico, por ejemplo, (i) un agonista de una molécula estimuladora (por ejemplo, coestimuladora) (por ejemplo, receptor o ligando) y/o (ii) un antagonista de una señal o molécula inhibidora (por ejemplo, receptor o ligando) en células inmunitarias, tales como linfocitos T, los cuales dan como resultado la amplificación de las respuestas inmunitarias, tal como respuestas de linfocitos T específicas de antígeno. En determinados aspectos, un agente inmunooncológico es (i) un agonista de una molécula estimuladora (que incluye un coestimulador) (por ejemplo, receptor o ligando) o (ii) un antagonista de una molécula inhibidora (que incluye un co-inhibidor) (por ejemplo, receptor o ligando) en células implicadas en la inmunidad innata, por ejemplo, las células NK, y en las que el agente inmunooncológico mejora la inmunidad innata. Dichos agentes inmunooncológicos a menudo se denominan reguladores del punto de control inmunitario, por ejemplo, inhibidor del punto de control inmunitario o estimulador del punto de control inmunitario.

En determinadas realizaciones, se administra una adnectina anti-GPC3 o AdxDC anti-GPC3 con un agente dirigido a una molécula estimuladora o inhibidora que es miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF). Por ejemplo, las adnectinas anti-GPC3 y/o AdxDC anti-GPC3, por ejemplo, descritas en el presente documento, pueden administrarse a un sujeto con un agente que está dirigido a un miembro de la familia IgSF para aumentar la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, una adnectina anti-GPC3 o AdxDC anti-GPC3 se puede administrar con un agente que está dirigido (o se une específicamente a) un miembro de la familia B7 de ligandos unidos a membrana que incluye B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) y B7-H6 o un receptor coestimulador o co-inhibidor que se une específicamente a un miembro de la familia B7.

Una adnectina anti-GPC3 o AdxDC anti-GPC3 también se puede administrar con un agente que está dirigido a un miembro de la familia de moléculas TNF y TNFR (ligandos o receptores), tal como CD40 y CD40L, OX-40, GITR, GITRL, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDA1, EDA2, TNFR1, linfotóxina α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT β R, linfotóxina α β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY y NGFR (véase, por ejemplo, Tansey (2009) Drug Discovery Today 00:1).

Las respuestas de linfocitos T se pueden estimular administrando uno o más de los siguientes agentes:

(1) Un antagonista (agente inhibidor o bloqueante) de una proteína que inhibe la activación de linfocitos T (por ejemplo, inhibidores de los puntos de regulación inmune), tal como CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 y LAG-3, como se ha descrito anteriormente, y cualquiera de las siguientes proteínas: TIM-3, Galectina 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, Galectina-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 y TIM-4; y/o

(2) Un agonista de una proteína que estimula la activación de los linfocitos T, tal como B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, CD40, DR3 y CD28H.

Agentes ilustrativos que modulan una de las anteriores proteínas anterior y se pueden combinar con adnectinas anti-GPC3 y/o AdxDC anti-GPC3, por ejemplo, los descritos en el presente documento, para el tratamiento del cáncer, incluyen: Yervoy™ (ipilimumab) o Tremelimumab (para CTLA-4), galiximab (para B7.1), BMS-936558 (para PD-1), MK-3475 (para PD-1), AMP224 (para B7DC), BMS-936559 (para B7-H1), MPDL3280A (para B7-H1), MEDI-570 (para ICOS), AMG557 (para B7H2), MGA271 (para B7H3), IMP321 (para LAG-3), BMS-663513 (para CD137), PF-05082566 (para CD137), CDX-1127 (para CD27), anti-OX40 (Providence Health Services), huMAbOX40L (para OX40L), Atacicept (para TACI), CP-870893 (para CD40), Lucatumumab (para CD40), Dacetuzumab (para CD40), Muromonab-CD3 (para CD3), Ipilimumab (a CTLA-4) y/o MK4166.

Las adnectinas anti-GPC3 o AdxDC anti-GPC3 también pueden administrarse con pidilizumab (CT-011), aunque su especificidad para la unión a PD-1 se ha cuestionado.

Otras moléculas que pueden combinarse con adnectinas anti-GPC3 o AdxDC anti-GPC3 para el tratamiento del cáncer incluyen antagonistas de receptores inhibidores en células NK o agonistas de receptores activadores en células NK. Por ejemplo, los anticuerpos agonistas anti-GITR se pueden combinar con antagonistas de KIR (por ejemplo, lirilumab).

La activación de los linfocitos T también está regulada por citocinas solubles y las adnectinas anti-GPC3 o AdxDC anti-GPC3 se pueden administrar a un sujeto, por ejemplo, que tiene un cáncer, con antagonistas de citoquinas que inhiben la activación de linfocitos T o agonistas de citoquinas que estimulan la activación de linfocitos T.

En determinadas realizaciones, las adnectinas anti-GPC3 o AdxDC anti-GPC3 se pueden usar junto con (i) antagonistas (o agentes inhibidores o bloqueantes) de proteínas de la familia IgSF o la familia B7 o la familia del TNF que inhibe la activación de linfocitos T o antagonistas de citocinas que inhiben la activación de linfocitos T (por ejemplo, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF; ("citoquinas inmunosupresoras") y/o (ii) agonistas de receptores estimuladores de la familia IgSF, familia B7 o la familia TNF o de citoquinas que estimulan la activación de los linfocitos T, para estimular una respuesta inmunitaria, por ejemplo, para tratar enfermedades proliferativas, tal como cáncer.

Aún otros agentes para terapias de combinación incluyen agentes que inhiben o reducen macrófagos o monocitos, incluyendo, pero sin limitación, antagonistas de CSF-1R tales como anticuerpos antagonista de CSF-1R incluyendo RG7155 (WO11/70024, WO11/107553, WO11/131407, WO13/87699, WO13/119716, WO13/132044) o FPA-008 (WO11/140249; WO13169264; WO14/036357).

Las adnectinas anti-GPC3 o los AdxDC anti-GPC3 también se pueden administrar con agentes que inhiben la señalización de TGF- β .

Los agentes adicionales que se pueden combinar con una adnectina anti-GPC3 y/o AdxDC anti-GPC3 incluyen agentes que aumentan la presentación de antígeno tumoral, por ejemplo, vacunas de células dendríticas, vacunas

celulares secretoras de GM-CSF, Oligonucleótidos CpG, e imiquimod, o terapias que aumentan la inmunogenicidad de las células tumorales (por ejemplo, antraciclina).

5 Otras terapias más que se pueden combinar con una adnectina anti-GPC3 o AdxDC anti-GPC3 incluyen terapias que eliminan o bloquean los linfocitos Treg, por ejemplo, un agente que se une específicamente a CD25.

Otra terapia que se puede combinar con una adnectina anti-GPC3 o AdxDC anti-GPC3 es una terapia que inhibe una enzima metabólica tal como indolamina dioxigenasa (IDO), dioxigenasa, arginasa, o sintasa de óxido nítrico.

10 Otra clase de agentes que se pueden usar con una adnectina anti-GPC3 o AdxDC anti-GPC3 incluye agentes que inhiben la formación de adenosina o inhiben el receptor A2A de adenosina.

15 Otras terapias que se pueden combinar con una adnectina anti-GPC3 o AdxDC anti-GPC3 para tratar el cáncer incluyen terapias que invierten/previene la anergia o el agotamiento de linfocitos T y terapias que desencadenan una activación inmunitaria innata y/o la inflamación en un sitio tumoral.

20 Una adnectina anti-GPC3 o AdxDC anti-GPC3 se puede combinar con más de un agente inmunooncológico, y puede, por ejemplo, combinarse con una estrategia combinatoria que dirige elementos múltiples de la ruta inmunitaria, tal como uno o más de lo siguiente: una terapia que aumenta la presentación de antígenos tumorales (por ejemplo, vacuna de células dendríticas, vacunas celulares secretoras de GM-CSF, oligonucleótidos CpG, imiquimod); una terapia que inhibe la regulación inmunitaria negativa, por ejemplo, inhibiendo la ruta de CTLA-4 y/o PD1/PD-L1/PD-L2 y/o disminuyendo o bloqueando Treg u otras células supresoras inmunitarias; una terapia que estimula la regulación inmunitaria positiva, por ejemplo, con agonistas que estimulan la ruta de CD-137, OX-40 y/o GITR y/o estimulan la función efectora de linfocitos T; una terapia que incrementa sistémicamente la frecuencia de linfocitos T antitumorales;

25 una terapia que disminuye o inhibe Treg, tales como Treg en el tumor, por ejemplo, usando un antagonista de CD25 (por ejemplo, daclizumab) o por agotamiento de perlas anti-CD25 *ex vivo*; una terapia que afecta a la función de las células mieloides supresoras en el tumor; una terapia que aumenta la inmunogenicidad de las células tumorales (por ejemplo, antraciclina); transferencia de linfocitos T adoptivos o células NK incluyendo células modificadas genéticamente, por ejemplo, células modificadas por receptores de antígeno quiméricos (Terapia de CAR-T); una

30 terapia que inhibe una enzima metabólica tal como indoleamina dioxigenasa (IDO), dioxigenasa, arginasa, o sintasa de óxido nítrico; una terapia que invierte/evita la anergia o agotamiento de los linfocitos T; una terapia que desencadena la activación inmunitaria innata y/o la inflamación en un sitio tumoral; administración de citoquinas estimuladoras inmunitarias; o bloqueo de citocinas inmunopresoras.

35 Las adnectinas anti-GPC3 y/o AdxDC anti-GPC3 descritas en el presente documento se pueden usar junto con uno o más agentes agonistas que se ligan a receptores coestimulantes positivos, agentes de bloqueo que atenúan la señalización a través de receptores inhibidores, antagonistas, y uno o más agentes que incrementan de manera sistémica la frecuencia de células T antitumorales, agentes que superan distintas rutas supresoras inmunitarias dentro del microentorno tumoral (por ejemplo, bloquear la unión de receptor inhibidor (por ejemplo, interacciones PD-L1/PD-

40 1), disminuir o inhibir Tregs (por ejemplo, usando un anticuerpo monoclonal anti-CD25 (por ejemplo, daclizumab) o mediante agotamiento de perlas anti-CD25 *ex vivo*), inhibir enzimas metabólicas tales como IDO, o revertir/evitar la anergia o el agotamiento de células T) y agentes que disparan la activación inmunitaria innata y/o inflamación en sitios tumorales.

45 En el presente documento se desvela el uso de cualquier adnectina anti-GPC3 descrita en el presente documento para la preparación de un medicamento para el tratamiento de sujetos afectados de cáncer. La divulgación proporciona usos médicos de cualquier adnectina anti-GPC3 descrita en el presente documento correspondiente a todas las realizaciones de los métodos de tratamiento que emplean una adnectina anti-GPC3 descrita en el presente

50 documento.

XI. Marcadores detectables

55 Las adnectinas anti-GPC3 descritas en el presente documento también son útiles en diversas aplicaciones de diagnóstico e imagen. En determinadas realizaciones, una adnectina anti-GPC3 está marcada con un resto que es detectable *in vivo* y dichas adnectinas marcadas pueden usarse como agentes de obtención de imágenes *in vivo*, por ejemplo, para imágenes de todo el cuerpo. Por ejemplo, en una realización, un método para detectar un tumor positivo para GPC3 en un sujeto comprende administrar al sujeto una adnectina anti-GPC3 unida a un marcador detectable, y después de un tiempo apropiado, detectar el marcador en el sujeto.

60 Se puede usar un agente de obtención de imágenes de adnectina anti-GPC3 para diagnosticar un trastorno o enfermedad asociada con niveles elevados de GPC3, por ejemplo, un cáncer en el que un tumor sobreexpone selectivamente GPC3. De manera similar, se puede usar una adnectina anti-GPC3 para controlar los niveles de GPC3 en un sujeto, por ejemplo, un sujeto que está siendo tratado para reducir los niveles de GPC3 y/o células positivas para GPC3 (por ejemplo, células tumorales). Las adnectinas anti-GPC3 se pueden usar con o sin modificaciones y se

65 pueden marcar mediante unión covalente o no covalente con un resto detectable.

Los marcadores detectables pueden ser cualquiera de los diversos tipos usados actualmente en el campo del diagnóstico *in vitro*, incluyendo marcadores particulados que incluyen metal tal como oro coloidal, isótopos tales como ^{125}I o ^{99}Tc presentados por ejemplo con un agente quelante peptídico del tipo N_2S_2 , N_3S o N_4 , cromóforos incluyendo marcadores fluorescentes, biotina, marcadores luminiscentes, marcadores fosforescentes y similares, así como marcadores enzimáticos que convierten un sustrato dado en un marcador detectable, y marcadores de polinucleótidos que se revelan después de la amplificación tal como por reacción en cadena de la polimerasa. Por tanto, un FBS anti-GPC3 biotinilado será detectable por unión a avidina o estreptavidina. Marcadores enzimáticos adecuados incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y similares. Por ejemplo, el marcador puede ser la enzima fosfatasa alcalina, detectada midiendo la presencia o la formación de quimioluminiscencia después de la conversión de sustratos de 1,2 dioxetano tal como adamantil methoxi fosforiloxi fenil dioxetano (AMPPD), 3-(4-(metoxispiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo{3.3.1.1 3,7}decan}-4-il) fenil fosfato de disodio (CSPD), así como CDP y CDP-star® u otros sustratos luminiscentes bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, los quelatos de lantanidas adecuadas tales como Terbio(III) y Europio(III).

Los restos detectables que pueden usarse incluyen agentes radiactivos, tales como: metales pesados radiactivos, tales como quelatos de hierro, quelatos radiactivos de gadolinio o manganeso, emisores de positrones de oxígeno, nitrógeno, hierro, carbono o galio, ^{18}F , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{124}I , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{11}C , ^{111}In , $^{114\text{m}}\text{In}$, ^{114}In , ^{125}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{131}I , ^{123}I , $^{123}\text{C1}$, $^{33}\text{C1}$, $^{34}\text{C1}$, ^{74}Br , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{78}Br , ^{89}Zr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{99}Tc , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{212}Pb , ^{225}Ac o ^{153}Sm .

El medio de detección viene determinado por el marcador elegido. Se puede conseguir la aparición del marcador o de sus productos de reacción a simple vista, en el caso en el que el marcador está en forma de partículas y se acumula a niveles adecuados o usando instrumentos tales como un espectrofotómetro, un luminómetro, un fluorímetro y similares, todo de acuerdo con la práctica convencional.

Un resto detectable puede estar unido a una cisteína según los métodos conocidos en la técnica. Cuando el resto detectable es un agente radiactivo, por ejemplo, los descritos más adelante en el presente documento, el resto detectable está unido a un FBS a través de un agente quelante que es reactivo con cisteínas, tal como un agente quelante que contiene maleimida, tales como maleimida-NODAGA o maleimida-DBCO. Maleimida-NODAGA o maleimida-DBCO pueden hacerse reaccionar con una cisteína en el extremo C de un FBS (por ejemplo, a través del resto PmXn , en el que al menos una X es una cisteína), para producir FBS-NODAGA o FBS-DBCO, respectivamente. Se puede usar cualquiera de los siguientes agentes quelantes, siempre que comprenda o pueda modificarse para que comprenda, un resto reactivo que reacciona con las cisteínas: DFO, DOTA y sus derivados (CB-DO2A, 3p-C-DEPA, TCMC, Oxo-DO3A), TE2A, CB-TE2A, CB-TE1A1P, CB-TE2P, MM-TE2A, DM-TE2A, diamsar y derivados, NODASA, NODAGA, NOTA, NETA, TACN-TM, DTPA, 1B4M-DTPA, CHX-A"-DTPA, TRAP (PRP9), NOPO, AAZTA y derivados (DATA), H_2dedpa , H_4octapa , H_2azapa , H_5decapa , H_6fospa , HBED, SHBED, BPCA, CP256, PCTA, HEHA, PEPA, EDTA, Agentes quelantes basados en TETA y TRITA, y análogos cercanos y derivados de los mismos.

En determinadas realizaciones, un FBS se marca con un marcador de PET y se usa como agente de obtención de imágenes *in vivo*. Por ejemplo, se puede marcar un FBS con el marcador de PET ^{64}Cu . ^{64}Cu puede unirse a un FBS con una cisteína en C-terminal con un agente quelante, tal como maleimida-NODAGA.

También pueden usarse otros métodos reconocidos en la técnica para marcar polipéptidos con radionúclidos, tales como ^{64}Cu y ^{18}F , para sintetizar los agentes de obtención de imágenes basados en adnectina anti-GPC3 descritos en el presente documento. Véase, por ejemplo, el documento US2014/0271467; Gill et al., Nature Protocols 2011;6:1718-25; Berndt et al. Nuclear Medicine and Biology 2007;34:5-15, Inkster et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2013;23:3920-6.

En determinadas realizaciones, un agente de obtención de imagen de GPC3 comprende una molécula de PEG (por ejemplo, PEG de 5KDa, PEG de 6KDa, PEG de 7KDa, PEG de 8KDa, PEG de 9KDa o PEG de 10KDa) para aumentar la PK sanguínea del agente de obtención de imágenes en pequeños incrementos para mejorar el contraste de imagen o aumentar la avidéz del agente de obtención de imágenes basado en adnectina anti-GPC3.

XI. Detección de GPC3

Métodos de detección *in vivo*

En determinadas realizaciones, las adnectinas anti-GPC3 marcadas desveladas en el presente documento se pueden usar para obtener imágenes de células o tejidos positivos para GPC3, por ejemplo, tumores que expresan GPC3. Por ejemplo, la adnectina anti-GPC3 marcada se administra a un sujeto en una cantidad suficiente para absorber la adnectina marcada en el tejido de interés (por ejemplo, el tumor que expresa GPC3). A continuación, se toma una imagen del sujeto usando un sistema de imágenes, tal como PET, durante un periodo de tiempo apropiado para el radionúclido particular que se usa. Las células o tejidos que expresan GPC3 unido a adnectina anti-GPC3 marcada, por ejemplo, tumores que expresan GPC3, son detectadas a continuación por el sistema de imágenes.

La imagen PET con un agente de obtención de imágenes GPC3 se puede usar para detectar cualitativa o

cuantitativamente GPC3. Se puede usar un agente de obtención de imágenes de GPC3 como biomarcador, y la presencia o ausencia de una señal positiva para GPC3 en un sujeto puede ser indicativa de que, por ejemplo, el sujeto respondería a una terapia dada, por ejemplo, una terapia contra el cáncer, o que el sujeto está respondiendo o no a una terapia.

5 En determinadas realizaciones, la progresión o regresión de la enfermedad (por ejemplo, tumor) se puede representar en función del tiempo o del tratamiento. Por ejemplo, el tamaño del tumor se puede controlar en un sujeto que se somete a terapia contra el cáncer (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia) y el grado de regresión del tumor se pueden controlar en tiempo real en función de la detección de la adnectina anti-GPC3 marcada.

10 La cantidad efectiva para dar como resultado la absorción del agente de obtención de imágenes (por ejemplo, agente de obtención de imágenes de ¹⁸F-adnectina, agente de obtención de imágenes de ⁶⁴Cu-adnectina) en las células o el tejido de interés (por ejemplo, tumores) puede depender de diversos factores, incluyendo, por ejemplo, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del huésped; el tiempo de administración; la ruta de administración; la tasa de excreción de la sonda específica usada; la duración del tratamiento; la existencia de otros fármacos usados en combinación o coincidencia con la composición específica empleada; y otros factores.

15 En determinadas realizaciones, la obtención de imágenes de los tejidos que expresan GPC3 se efectúa antes, durante y después de la administración de la adnectina anti-GPC3 marcada.

20 En determinadas realizaciones, las adnectinas anti-GPC3 descritas en el presente documento son útiles para la obtención de imágenes PET de los pulmones, el corazón, los riñones, el hígado y la piel, y otros órganos o tumores asociados con estos órganos que expresan GPC3.

25 En determinadas realizaciones, los agentes de obtención de imágenes anti-GPC3 proporcionan un contraste de al menos el 50 %, 75 %, 2, 3, 4, 5 o más. Los ejemplos muestran que todas las adnectinas anti-GPC3 que se usaron proporcionaron un contraste de PET de 2 o más, y que la afinidad de las adnectinas no era importante.

30 Cuando se usa para obtener imágenes (por ejemplo, PET) con radionucleidos de semivida corta (por ejemplo, ¹⁸F), las adnectinas anti-GPC3 radiomarcadas se administran preferentemente por vía intravenosa. Otras vías de administración también son adecuadas y dependen de la semivida de los radionucleidos utilizados.

35 En determinadas realizaciones, los agentes de obtención de imágenes anti-GPC3 descritos en el presente documento se usan para detectar células positivas para GPC3 en un sujeto mediante la administración al sujeto de un agente de obtención de imágenes anti-GPC3 descrito en el presente documento, y la detección del agente de obtención de imágenes, el agente de obtención de imágenes detectado que define la ubicación de las células positivas GPC3 en el sujeto. En determinadas realizaciones, el agente de obtención de imágenes se detecta mediante tomografía por emisión de positrones.

40 En determinadas realizaciones, los agentes de obtención de imágenes anti-GPC3 descritos en el presente documento se usan para detectar tumores que expresan GPC3 en un sujeto mediante la administración al sujeto de un agente de obtención de imágenes anti-GPC3 desvelado en el presente documento y detectar el agente de obtención de imágenes, el agente de obtención de imágenes detectado que define la ubicación del tumor en el sujeto. En determinadas realizaciones, el agente de obtención de imágenes se detecta mediante tomografía por emisión de positrones.

45 En determinadas realizaciones, se obtiene una imagen de un agente de obtención de imágenes anti-GPC3 descrito en el presente documento administrando el agente de obtención de imágenes a un sujeto y obteniendo imágenes *in vivo* de la distribución del agente de obtención de imágenes mediante tomografía por emisión de positrones.

50 En consecuencia, en el presente documento se proporcionan métodos para obtener una imagen cuantitativa de tejidos o células que expresan GPC3, comprendiendo el método poner en contacto las células o el tejido con un agente de obtención de imágenes anti-GPC3 descrito en el presente documento y detectar o cuantificar el tejido que expresa GPC3 usando tomografía por emisión de positrones.

55 En el presente documento también se desvelan métodos para detectar un tumor que expresa GPC3 que comprende administrar una cantidad eficaz de imagen de un agente de obtención de imágenes anti-GPC3 descrito en el presente documento a un sujeto que tiene un tumor que expresa GPC3, y detectar las emisiones radiactivas de dicho agente de obtención de imágenes en el tumor utilizando tomografía por emisión de positrones, en el que las emisiones radiactivas se detectan en el tumor.

60 En el presente documento también se desvelan métodos para diagnosticar la presencia de un tumor que expresa GPC3 en un sujeto, comprendiendo el método

65 • administrar a un sujeto que lo necesite un agente de obtención de imágenes anti-GPC3 descrito en el presente documento; y

- obtener una imagen de radio de al menos una parte del sujeto para detectar la presencia o ausencia del agente de obtención de imágenes;
- en el que la presencia y ubicación del agente de obtención de imágenes sobre el fondo es indicativa de la presencia y ubicación de la enfermedad.

5 En el presente documento también se desvelan métodos para monitorización de la progresión de una terapia antitumoral contra tumores que expresan GPC3 en un sujeto, comprendiendo el método

- 10 • administrar a un sujeto que lo necesite un agente de obtención de imágenes anti-GPC3 descrito en el presente documento en un primer punto de tiempo y obtener una imagen de al menos una parte del sujeto para determinar el tamaño del tumor;
- administrar una terapia antitumoral al sujeto;
- administrar al sujeto el agente de obtención de imágenes en uno o más puntos de tiempo posteriores y obtener una imagen de al menos una parte del sujeto en cada punto de tiempo;
- 15 • en el que la dimensión y ubicación del tumor en cada punto de tiempo es indicativa de la progresión de la enfermedad.

Métodos de detección *in vitro*

20 Además de detectar GPC3 *in vivo*, las adnectinas anti-PDL1, tales como las descritas en el presente documento, pueden usarse para detectar una molécula diana en una muestra. Un método puede comprender poner en contacto la muestra con una adnectina anti-GPC3 descrita en el presente documento, en el que dicho contacto se lleva a cabo en condiciones que permiten la formación de complejos de adnectina-anti-GPC3 diana; y detectar dicho complejo, detectando de ese modo dicha diana en dicha muestra. La detección puede llevarse a cabo utilizando cualquier técnica reconocida en la materia, tal como, por ejemplo, radiografía, ensayo inmunológico, detección de fluorescencia, espectroscopía de masas o resonancia de plasmón superficial. La muestra puede ser de un humano u otro mamífero. Para fines diagnósticos, los agentes apropiados son marcadores detectables que incluyen radioisótopos, para la imagen completa, y radioisótopos, enzimas, marcadores fluorescentes y otros marcadores de anticuerpo adecuadas para el ensayo de muestra.

30 Los marcadores detectables pueden ser de los diversos tipos usados actualmente en el campo del diagnóstico *in vitro*, incluyendo marcadores particulados que incluyen metal tal como oro coloidal, isótopos tales como ^{125}I o Tc^{99} presentados por ejemplo con un agente quelante peptídico del tipo N_2S_2 , N_3S o N_4 , cromóforos incluyendo marcadores fluorescentes, biotina, marcadores luminiscentes, marcadores fosforescentes y similares, así como marcadores enzimáticos que convierten un sustrato dado en un marcador detectable, y marcadores de polinucleótidos que se revelan después de la amplificación tal como por reacción en cadena de la polimerasa. Por tanto, un FBS biotinilado será detectable por unión a avidina o estreptavidina. Marcadores enzimáticos adecuados incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y similares. Por ejemplo, el marcador puede ser la enzima fosfatasa alcalina, detectada midiendo la presencia o la formación de quimioluminiscencia después de la conversión de sustratos de 1,2 dioxetano tal como adamantil methoxi fosforiloxi fenil dioxetano (AMPPD), 3-(4-(metoxispiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo{3.3.1.1 3,7}decan)-4-il) fenil fosfato de disodio (CSPD), así como CDP y CDP-star® u otros sustratos luminiscentes bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, los quelatos de lantanidas adecuadas tales como Terbio(III) y Europio(III). Otros marcadores incluyen los expuestos anteriormente en la sección de obtención de imágenes. El medio de detección viene determinado por el marcador elegido. Se puede conseguir la aparición del marcador o de sus productos de reacción a simple vista, en el caso en el que el marcador está en forma de partículas y se acumula a niveles adecuados o usando instrumentos tales como un espectrofotómetro, un luminómetro, un fluorímetro, y similares, todo de acuerdo con la práctica convencional.

XII. Kits y artículos de fabricación

50 Las adnectinas anti-GPC3 y sus conjugados de fármacos descritos en el presente documento pueden proporcionarse en un kit, una combinación empaquetada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones de uso en los métodos terapéuticos o de diagnóstico descritos en el presente documento.

55 Por ejemplo, en determinadas realizaciones, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento o prevención de los trastornos o afecciones descritos en el presente documento, o para su uso en los métodos de detección descritos en el presente documento. El artículo de fabricación comprende un recipiente y un marcador. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los envases pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente puede contener una composición descrita en el presente documento para la obtención de imágenes *in vivo* y puede tener una vía de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es una adnectina anti-GPC3 o AdxDC anti-GPC3 descrita en el presente documento. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de

paquetes con instrucciones de uso.

5 La invención se describe a continuación por referencia a los siguientes ejemplos, que son solo ilustrativos y no pretenden limitar la presente invención. Mientras que se ha descrito la invención con detalle y con referencia a las realizaciones específicas de la misma, Será evidente para un experto en la materia que se pueden realizarse diversos cambios y modificaciones a los mismos dentro del alcance de la presente invención que se define en las reivindicaciones adjuntas.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: Selección, expresión y purificación de adnectinas de unión a anti-glipicano-3

15 Las adnectinas de unión a glipicano-3 (GPC3) se aislaron de una biblioteca de adnectina cribada con una proteína glipicano-3, o se maduraron por afinidad mediante PROfusión a partir de clones identificados en la biblioteca. Para una descripción detallada de la tecnología de ARN-proteínas y los métodos de detección de la biblioteca de proteínas de armazón basados en fibronectina, véase Szostak et al., Las patentes de Estados Unidos n.º 6,258,558; 6,261,804; 6,214,553; 6,281,344; 6,207,446; 6,518,018; las publicaciones PCT n.º WO 00/34784; documento WO 01/64942; documento WO 02/032925; y Roberts et al., Proc Natl. Acad. Sci., 94: 12297-12302(1997).

20 A continuación se proporcionan las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de 7 adnectinas con buenas propiedades de unión y biofísicas:

ADX 4578 F03

25 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHPHPNIVSYHIYGETGGNSPVQEFTVEGSKSTAK
ISGLKPGVDYTITVYAVAPEIEKYYQIWINYRTEGSGS* (SEQ ID NO: 10)

ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACTTGGAAGTGGTTGCCGCCACCCCCACCAGC
CTGCTGATCTCTTGGCATCCGCCGCATCCGAACATCGTTTCTTACCATATCTACTACG
GCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCCTGTGGAAGGTTCTAAATCT
ACTGCTAAAATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTACGCT
GTTGCTCCGAAATCGAAAAATACTACCAGATTTGGATTAATTACCGCACAGAAGG
CAGCGGTTCTCTAA (SEQ ID NO: 452)

ADX 4578 H08

30 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSGYDYGDSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPDGSNTA
TISGLKPGVDYTITVYAVEAYGKGYTRYTPISINYRTEIDKPSQ* (SEQ ID NO: 23)

ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGC
CTGCTGATCAGCTGGTCTGGTTACGACTACGGTGACTCTTATTACCGCATCACTTACG
GCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCCTGTGCCCTGACGGTTCTAAC
ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT
35 GTCGAAGCTTACGGTAAAGGTTACACTCGTTACACTCCAATTTCCATTAATTACCGC
ACAGAAATTGACAAACCATCCCAGTAA (SEQ ID NO: 452)

ADX 4578 B06

40 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWFDPDRYVYYITYGETGGNSPVQEFTVEGHKQTAYIS
GLKPGVDYTITVYAIYYYPDDFQGYQPISINYRTEGSGS* (SEQ ID NO: 36)

ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACTTGGAAGTGGTTGCCGCCACCCCCACCAGC
CTGCTGATCTCTTGGTTCCCGGACCGTTACGTTTACTACATCACTTACGGCGAAACA
GGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCCTGTGGAAGGTCATAAACAGACTGCTTA
CATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTACGCTATCTACTA
CTACCCGGACGACTTCCAGGGTTACCCGCAGCCGATTTCTATTAATTACCGCACAGA
AGGCAGCGGTTCTCTAA (SEQ ID NO: 454)

ADX 4606 F06

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWNSGHSQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRYGYTAT
ISGLKPGVDYTITVYAVAHSEASAPISINYRTEIDKPSQ*(SEQ ID NO: 49)

5

ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGC
CTGCTGATCAGCTGGAACCTCTGGTCATTCTGGTCAGTATTACCGCATCACTTACGGC
GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTCGTTACGGTTACACA
GCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTC
GCTCATTCTGAAGCTTCTGCTCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAA
CCATCCCAGTAA (SEQ ID NO: 455)

ADX 5273 C01

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDPYEEERYRITYGETGGNSPVQEFTVPAFHHTAT
ISGLKPGVDYTITVYAVTYKHKYAYYYPPISINYRTEIDKPSQ*(SEQ ID NO: 62)

10

ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGC
CTGCTGATCAGCTGGTCTGACCCGTACGAAGAAGAACGATATTACCGCATCACTTAC
GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGCTTCCATACT
ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT
GTCACTTACAAACATAAATACGCTTACTACTACCCGCCAATTTCCATTAATTACCGC
ACAGAAATTGACAAACCATCCCAGTAA (SEQ ID NO: 456)

ADX 5273 DO1

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWEPYSYKDDRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSFHQTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTYEPDEYYFYYPISINYRTEIDKPSQ* (SEQ ID NO: 75)

15

ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGC
CTGCTGATCAGCTGGGAACCGTCTTACAAAGACGACCGATATTACCGCATCACTTAC
GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTTCTTCCATCAG
ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT
GTCACTTACGAACCGGACGAATACTACTTCTACTACCCAATTTCCATTAATTACCGC
ACAGAAATTGACAAACCATCCCAGTAA (SEQ ID NO: 457)

20

ADX 5274

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSGDYHPHRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGEHETA
TISGLKPGVDYTITVYAVTYDGEKADKYPPISINYRTEIDKPSQ* (SEQ ID NO: 88)

ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGC
CTGCTGATCAGCTGGTCTGGTGACTIONACCATCCGCATCGATATTACCGCATCACTTAC
GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTGAACATGA
AACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGC
TGTCACTTACGACGGTGAAAAAGCTGACAAATACCCGCCAATTTCCATTAATTACCG
CACAGAAATTGACAAACCATCCCAGTAA (SEQ ID NO: 458)

25

Las características de unión de las 7 adnectinas de unión a GPC3 se determinaron mediante ELISA usando GPC3 recombinante y citometría de flujo, usando la línea celular CHO positiva a GPC3 y la línea celular de tumor humano HepG2. Para los experimentos de citometría de flujo, las células CHO-K1 o CHO-glicoproteína-3 o la línea de células tumorales HepG2 se trataron con Versene y se resuspendieron en tampón FACS (PBS al 2,5 % FBS). Las adnectinas diluidas en tampón FACS se incubaron con células durante 1 hora a 4 °C. Después de 1 lavado en tampón FACS, las células se incubaron con un anticuerpo anti-His a 2 µg/ml y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Después de 2 lavados en tampón FACS, las células se resuspendieron en tampón FIX (2,5 % de formaldehído en PBS). El análisis se realizó con BB Biosciences FACS Canto.

30

cola de 6xHis).

Para evitar dímeros unidos a disulfuro de las adnectinas no conjugadas que contienen uno o más restos de cisteína, el o los restos de cisteína de las adnectinas se carboximetilaron como sigue: Una solución de adnectina se trató con un agente reductor (DTT 5 mM o TCEP 5 mM) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió yodoacetamida (500 mM, Sigma P/N A3221-10VL) a una concentración final de 50 mM. Las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se dializaron frente a tampón PBS o de acetato de sodio.

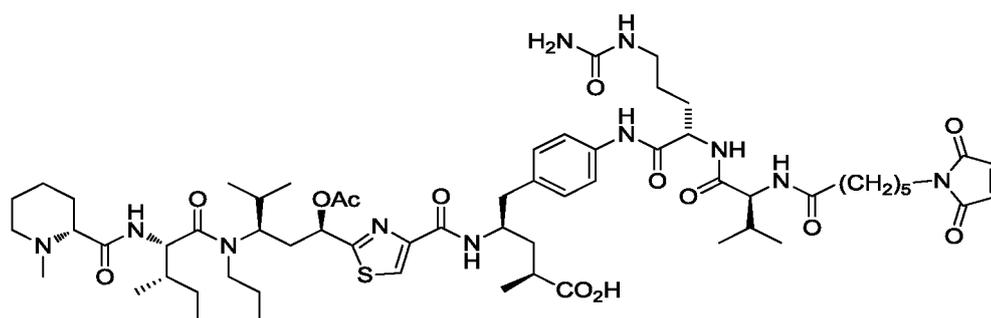
10 Ejemplo 3: Producción de conjugados de fármaco-GPC3-adnectina (GPC3-AdxDC)

Producción de adnectinas, por ejemplo, adnectinas de GPC3: Un ácido nucleico que codifica una adnectina, por ejemplo, SEQ ID NO: 459), que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos

15 MGVSVDVPRDLEVVAATPTSLISWSDDYHAHRYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGEHVTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTYDGEKAATDWSISINYRTPCHHHHHH (SEQ ID NO: 118; ADX_6077_F02), se clonó en un vector pET9d (EMD Biosciences, San Diego, CA) y se expresó en células *E. coli* BL21 DE3 pLys-S. Se usaron veinte ml de un cultivo de inóculo (generado a partir de una sola colonia en placa) para inocular 1 litro de medio de expresión Magic para *E. Coli* (Invitrogen, Catálogo K6803A/B) que contenía 50 ug/ml de kanamicina en un matraz Ultra Yield de 2,5 litros (Thomson Instruments Co. P/N 931136-B). La mezcla se cultivó a 37 °C durante 6 horas, seguido de 20 °C durante 18 horas con agitación a 225 RPM. Después del período de incubación, el cultivo se cosechó por centrifugación durante 30 minutos a ≥ 10.000 g a 4 °C. Los sedimentos celulares se congelaron a -80 °C. El sedimento celular se descongeló y se resuspendió en 25 ml de tampón de lisis (fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM, ditiotreitolo 5 mM, 1x cóctel de inhibidor de proteasa Complete™ sin EDTA (Roche) usando un homogeneizador Ultra-Turrax (IKA -Works) en hielo. La lisis celular se logró mediante homogeneización a alta presión (≥ 18.000 psi) usando un Microfluidizador Modelo M-110P (Microfluidics). La fracción insoluble se separó por centrifugación durante 30 minutos a 23.300 g a 4 °C y se desechó. La fracción soluble se filtró con un filtro de vacío de 0,2 micrómetros. El sobrenadante filtrado se cargó en una columna Histrap (GE Healthcare P/N 17-5248-02) equilibrada con fosfato de sodio 20 mM/cloruro de sodio 500 mM a pH 7,4 + tampón DTT 5 mM. Tras la carga, se lavó la columna con 10 VC de tampón de equilibrio, seguido de 10 VC de imidazol 40 mM en tampón de equilibrio, seguido de 10 VC 2,0M de cloruro de sodio en PBS. La proteína unida se eluyó con imidazol 500 mM en fosfato de sodio 20 mM/cloruro de sodio 500 mM a pH 7,4 + DTT 5 mM. El eluato de la columna HisTrap se cambió con tampón a acetato de sodio 50 mM/cloruro de sodio 10 mM a pH 5,5 usando cromatografía de filtración en gel G25. La muestra se aplicó después a una columna de cromatografía de intercambio catiónico (SP HP, GE Healthcare 17-1152-01). La proteína unida se eluyó en un gradiente de concentración creciente de cloruro de sodio en tampón de acetato de sodio 50 mM a pH 5,5. Las fracciones se agruparon para la conjugación con tubulisina.

Producción de análogo de tubulisina-enlazador: Se produjo un compuesto de análogo de tubulisina-enlazador que tiene la estructura de fórmula (IV) como se describe en el documento U.S. 8.394.922.

(IV)



40 Conjugación de adnectina-fármaco: La conjugación de un análogo de tubulisina-enlazador a las adnectinas que comprenden una cisteína en C terminal se realizó de la siguiente manera:

45 Una muestra de la adnectina a conjugar con el análogo de tubulisina se trató con TCEP 5 mM y se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Se eliminó el TCEP usando una columna de filtración en gel G25 (GE Healthcare) equilibrada con NaOAc 50 mM/NaCl 10 mM a pH 5,5. El análogo de tubulisina se disolvió en DMSO al 100 % y se añadió a una concentración final de 5x molar y la reacción se incubó durante 2 horas a TA seguido de una noche a 4 °C. Para eliminar el análogo de tubulisina sin reaccionar, la mezcla de reacción se volvió a aplicar a la columna de intercambio catiónico SP como se ha descrito anteriormente.

Las adnectinas, por ejemplo, adnectinas de GPC3, que contenían dos restos de cisteína cerca del extremo C se conjugaron con dos moléculas de análogo de tubulisina utilizando la misma metodología descrita anteriormente para

generar adnectinas DAR2 (relación fármaco-adnectina 2).

La concentración de proteína se determinó usando un espectrofotómetro Nanodrop 8000 (Thermo Scientific). El peso molecular de la adnectina conjugada y no conjugada se determinó mediante espectrometría de masas LC usando una LC-MS Q-ToF de masa exacta 6540 UHD de Agilent Technologies equipada con una columna Zorbax C8 RRHD.

Usando estas técnicas de expresión, purificación, conjugación y alquilación de adnectinas, se prepararon las adnectinas y los conjugados de adnectina-fármaco enumerados en la tabla 3.

10

Tabla 3 - Adnectinas de control y unión a anti-glipicano-3

ID de ADX	Elementos en C-term	Modificaciones	Secuencia de proteínas
ADX_6561_A01	Cys, His ₆		MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSGDYH PHRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGEHETA TISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKADKYPP ISINYRTPCHHHHHH* (SEQ ID NO: 94)
ADX_6077_F02	Cys, His ₆	ninguna	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYH AHRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGEHVT ATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKAATD WSISINYRTPCHHHHHH* (SEQ ID NO: 11)
ADX_6077_F02	Cys, His ₆	alquilada	
ADX_6077_F02	Cys, His ₆	Fármaco/enlazador DAR1	
ADX_6077_F02	Cys	ninguna	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHA HRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGEHVTAT ISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKAATDWSI SINYRTP* (SEQ ID NO: 104)
ADX_6912_G02	2Cys, His ₆	ninguna	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYH AHRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGEHVT ATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKAATD WSISINYRTPCPCPPPPCHHHHHH*(SEQ ID NO: 127)
ADX_6912_G02	2Cys, His ₆	alquilada (2x)	
ADX_6912_G02	2Cys, His ₆	Fármaco/enlazador (2x) DAR2	
ADX_6912_G02	2Cys	Ninguna	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYH AHRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGEHVT ATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKAATD WSISINYRTPCPCPPPPC* (SEQ ID NO: 126)
ADX_6093_A01	Cys, His ₆	ninguna	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAV TVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTA TISGLKPGVDYTTITVYAVTGRGESPASSKPI SINYRTPCHHHHHH* (SEQ ID NO: 348)
ADX_6093_A01	Cys, His ₆	alquilada	
ADX_6093_A01	His ₆ en C-term	Fármaco/enlazador DAR1	
ADX_6093_A01	Cys	ninguna	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVT VRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTAT ISGLKPGVDYTTITVYAVTGRGESPASSKPI NYRTPC* (SEQ ID NO: 349)
	2Cys, His ₆	ninguna	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAV TVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTA TISGLKPGVDYTTITVYAVTGRGESPASSKPI SINYRTPCPCPPPPCHHHHHH* (SEQ ID NO: 350)
	2Cys, His ₆	alquilada (2x)	
	2Cys, His ₆	Fármaco/enlazador (2x) DAR2	

Ejemplo 4: Caracterización *in vitro* de adnectinas anti-GPC3 y GPC3-AdxDC

Cromatografía de exclusión por tamaño: La cromatografía de exclusión por tamaño estándar (SEC) se realizó en las adnectinas candidatas resultantes del proceso a escala media. Se realizó una SEC de material de escala media usando un Superdex 200 10/30 o en una columna Superdex 75 10/30 (GE Healthcare) en un sistema HPLC Agilent 1100 o 1200 con detección UV a A214 nm y A280 nm y con detección de fluorescencia (excitación 280 nm, emisión 350 nm). Un tampón de sulfato de sodio 100 mM/fosfato de sodio 100 mM/cloruro de sodio 150 mM, a pH 6,8 se usó al caudal apropiado para la columna SEC empleada. Los patrones de filtración en gel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) se utilizaron para la calibración de peso molecular.

Termoestabilidad: El análisis de fluorescencia de barrido térmico (TSF) de las adnectinas HTPP se realizó para cribarlas mediante la relativa estabilidad térmica. Las muestras se normalizaron a 0,2 mg/ml en PBS. Se añadió 1 µl de colorante naranja Sypro diluido a 1:40 con PBS a 25 µl de cada muestra y la placa se selló con un sello adhesivo de microplaca transparente de 96 pocillos. Las muestras se escanearon utilizando una máquina BioRad RT-PCR aumentando la temperatura de 25 °C a 95 °C, a una velocidad de 2 grados por minuto. Los datos se analizaron utilizando el software BioRad CFX manager 2.0. Se ha demostrado que los valores de T_h obtenidos mediante TSF se correlacionan bien con los valores de T_m obtenidos mediante DSC en un intervalo de fusión de 40 °C a 70 °C. Esto se considera el intervalo de trabajo aceptable para esta técnica. Se obtiene un resultado de ND ("Sin datos") cuando la pendiente de la curva de transición es demasiado pequeña para permitir que su pico derivado (la tasa de cambio de fluorescencia con el tiempo) se distinga del ruido. Un resultado "ND" no puede interpretarse como una indicación de termoestabilidad. Se realizaron análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de AS adnectinas dializadas con HTPP y de escala media para determinar sus respectivas T_m . Se escaneó una solución de 0,5 mg/ml en un calorímetro de escaneo diferencial VP-capilar (Microcal GE) aumentando la temperatura de 15 °C a 110 °C, a una velocidad de 1 grado por minuto a 70 p.s.i de presión. Los datos se analizaron frente a una ejecución de control del tampón apropiado usando un mejor ajuste usando software Origin (OriginLab Corp).

Mediciones de la afinidad de SPR: La resonancia de plasmón superficial (SPR) se realizó para calcular las constantes de disociación (k_d) y las afinidades de unión de las adnectinas α -GPC3 y las AdxDC conjugadas con tubulicina utilizando un instrumento Biacore T100 (GE Healthcare). Las proteínas recombinantes humanas (aa 1-559) y murinas (aa 25-557) de glipicano-3 (R&D Systems) se diluyeron a 10 µg/ml en acetato de sodio 10 mM a pH 4,5 y se inmovilizaron individualmente en células de flujo activo de un biosensor CM5 después del protocolo de acoplamiento de amina del fabricante (GE Healthcare), dirigido a ~ 1000 UR de densidad de inmovilización de cada proteína por celda de flujo. Los experimentos SPR se realizaron a 37 °C utilizando HBS-P + (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, 0,05 % v/v de tensioactivo P20, a pH 7,4) tampón de carrera (GE Healthcare). Para las mediciones de afinidad, se prepararon una serie de concentraciones de 200-1,56 nM de adnectinas α -GPC3 y AdxDC en tampón de carrera y se inyectaron a 30 µl/min a través de las celdas de flujo del biosensor GPC3 humano y murino. Para las mediciones de las constantes de disociación, se inyectaron concentraciones únicas de adnectina/AdxDC 200 nM usando condiciones idénticas. Se usó una inyección de 30 segundos de glicina 10 mM a pH 1,7 para eliminar la adnectina unida y regenerar las superficies de GPC₃ entre ciclos de ensayo.

Las constantes de la velocidad k_a (k_{on}) y k_d (k_{off}) se derivaron de sensogramas restados de la referencia ajustados a un modelo de unión 1:1 en el software de evaluación Biacore T100 v2.0.4 (GE Healthcare). La constante de afinidad, K_D se calculó a partir de la relación de las constantes de velocidad k_d/k_a .

Ensayos de unión a células: La unión de las adnectinas GPC3 a las células positivas para huGPC3 Huh7 se evaluó mediante citometría de flujo esencialmente como sigue. Las células de carcinoma Huh7 cultivadas en medio DMEM con FBS al 10 %. Las células se cosecharon usando Versene, una solución de disociación celular EDTA de Lonza, n.º de cat 17-71 1E. Las células tumorales (células 1E5/reacción) se suspendieron en tampón FACS (PBS, BSA al 1 %, 0,05 % de azida de Na) y se mezclaron con una dilución en serie de AdxDC durante una hora en hielo. Las células se lavaron tres veces con tampón FACS y la AdxDC unida se detectó con un anticuerpo monoclonal anti-armazón interno y un anticuerpo conjugado con PE de (RnD Systems), n.º de cat. NL007, y se leyó en un citómetro de flujo. El análisis de datos se realizó con el software FlowJo y se determinó una CE_{50} del 50 % de la unión máxima con el software PRISM™, versión 5.0 (software GraphPad, La Jolla, CA, EE.UU.).

Ensayo de inhibición del crecimiento celular: Un ensayo de timidina ³H, en el que la inhibición de la incorporación de timidina ³H indica inhibición de la proliferación de la línea celular analizada, se utilizó para evaluar el efecto inhibitorio dependiente de la dosis de la AdxDC sobre la proliferación de células Hep3B, Huh7 y HepG2. Las líneas celulares tumorales humanas se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, EE. UU., y se cultivaron de acuerdo con las instrucciones de la ATCC. Las células se sembraron a $1,25 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos y se añadieron diluciones en serie 1:3 de AdxDC de GPC3 a los pocillos. Las placas se dejaron incubar durante 72 horas. Las placas se pulsaron con 1,0 µCi de ³H-timidina por pocillo durante las últimas 24 horas del período de incubación total, se recogieron y se leyeron en el contador de centelleo Top Count (Packard Instruments, Meriden, CT). Los valores de CE_{50} , la concentración de conjugado del fármaco-adnectina a la que se alcanzó el 50 % de la inhibición máxima de la proliferación celular, se determinaron utilizando el software PRISM™, versión 4.0 (software GraphPad, La Jolla, CA, EE.UU.).

En la Tabla 4 se proporciona un resumen de las propiedades *in vitro* de las formas DAR1 y DAR2 del conjugado de AdxDC.

Tabla 4: Caracterización *in vitro* de GPC3-Tubulisina-AdxDC

	Control de no unión	Unión a glicicano-3
ID de adnectina	ADX_6093_A01	ADX_6077_F02
Conjugado	DAR1 DAR2	DAR1 DAR2
% del monómero	100 %	100 %
DSC T_m (PBS)	86 °C	89 °C, 93 °C
K_D de SPR (37 °C)	No unión	12 nM (hu) 11 nM (mu)
k_{off} de SPR (37 °C)	No unión	9,8 x 10 ⁻⁴ s (hu) 7,7 x 10 ⁻⁴ s ⁻¹ (mu)
CE₅₀ de la unión celular a adnectina	No unión hasta ~ 200 nM ^{alq}	5 nM (hu; Huh7) ^{alq}
CI₅₀ de la muerte celular AdxDC	Sin efecto hasta ~ 25 nM	0,2 nM (hu; Huh7, HepG2)
^{alq} - medido para alquilada (adnectina protegida en el extremo); todas las demás medidas para DAR1 AdxDC (sin PEG)		

Ejemplo 5: Unión celular de GPC3-AdxDC a las células tumorales humanas Hep3B y H446

5

Las AdxDC de GPC3 se evaluaron mediante citometría de flujo para la unión a células de carcinoma hepatocelular Hep3B humano cultivadas en MEM con FBS al 10 % y células de carcinoma de pulmón de células pequeñas H446 cultivadas en RPMI con FBS al 10 %. Las células se cosecharon usando Cellstripper, una solución de disociación celular no enzimática de Mediatech (Corning: Manassas, VA 20109), n.º de cat. 25-056-CL. Las células tumorales (25.000/reacción) se suspendieron en tampón FACS (PBS + 5 % de FBS + 0,01 % de NaN₃) y se mezclaron con una dilución en serie de AdxDC durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron tres veces con tampón FACS, y la AdxDC unida se detectó con el anticuerpo conjugado a PE con marcador His de R&D System, n.º de cat. IC050P, y se leyó en un citómetro de flujo. El análisis de datos se realizó con el software FlowJo y se determinó una CE₅₀ del 50 % de la unión máxima con el software PRISM™, versión 5.0 (software GraphPad, La Jolla, CA, EE.UU.).

15

Los resultados, que se muestran en la figura 4A-D, muestran que ADX_6077_F02 AdxDC DAR1 y DAR2 se unen a ambos tipos de células tumorales humanas.

Ejemplo 6: AdxDC de GPC3 inhibe el crecimiento celular de las células tumorales Hep3B, H446 y HepG2

20

Este ejemplo muestra que las AdxDC de GPC3 DAR1 y DAR2 inhiben la proliferación celular de células Hep3B de CHC (niveles altos de glicicano 3), H446 de SCLC (niveles bajos de glicicano 3) y células tumorales HepG2. Los ensayos de incorporación de timidina se realizaron como se ha descrito anteriormente. Los resultados, que se muestran en las Figuras 5A-B y 6A-B muestran que las AdxDC de GPC3 DAR1 y DAR2 inhiben el crecimiento celular de las tres líneas celulares diferentes, pero que el conjugado de adnectina AdxDC de control no inhibe el crecimiento de estas células.

25

Ejemplo 7: Curso de tiempo del ensayo de unión a superficie celular para GPC3-AdxDC

30

Para garantizar el acoplamiento máximo a la diana antes de los estudios de internalización, la unión de ADX_6077_F02 DAR1 (es decir, con un "PC" terminal, pero no conjugado) a células Hep3B positivas para GPC-3 se determinó usando el siguiente ensayo de unión: Se usaron la adnectina ADX_6077_F02 marcada con fluorescencia AF-488 y el control negativo (NBC) ADX_6093_A01 en el ensayo de unión a células Hep3B. Para el análisis de unión, las células Hep3B se sembraron en una placa de 384 pocillos, se incubaron durante 16 horas para permitir que las células se adhirieran y luego las células se fijaron con 2 % de formaldehído. ADX_6077_F02 y ADX_6093_A01 a 100 nM se añadieron a la placa celular y se incubaron a temperatura ambiente durante 7 puntos de tiempo: 0 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 60 minutos, 120 minutos y 180 minutos. Después de la unión, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) dos veces y luego se midió la intensidad de fluorescencia celular total por célula usando análisis de alto contenido.

35

Los resultados, indican que ADX_6077_F02 demostró una asociación rápida en las superficies celulares. Se descubrió que dos horas eran suficientes para alcanzar una meseta de unión superior al 95 % usando 100 nM de adnectina.

40

Ejemplo 8: Internalización cinética de GPC3-AdxDC

5 Para cuantificar la internalización inducida por adnectina anti-glicicano 3, se aplicó un ensayo de inactivación Alexa de alto contenido. Las células Hep3B y H446 se sembraron en placas de 384 pocillos y se incubaron durante 16 horas a 37 °C. A continuación, se añadieron AF-488 ADX_6077_F02 DAR1 marcado con fluorescencia a 100 nM en las placas celulares y se incubaron a 37 °C durante el tiempo indicado antes de la fijación y la inactivación. La adnectina internalizada se midió como un aumento de la fluorescencia por encima de la señal inactivable. La fluorescencia total del "control no inactivado" en cada punto de tiempo se controló en paralelo para su uso como indicador de la cantidad de adnectina unida inicialmente a las células. Las imágenes de las células se tomaron mediante Arrayscan para 10 mostrar la localización de la adnectina, y se usaron para cuantificar la intensidad de fluorescencia celular.

15 Los estudios de cuantificación confirmaron altos niveles de expresión del receptor GPC3 en Hep3B (aproximadamente $1,1 \times 10^6$ copias de unión activa/célula) y niveles más bajos en células H446 (aproximadamente $2,6 \times 10^5$ copias de unión activa/célula). Después de la fijación, se determinó la FL total e intracelular y se usó para medir la internalización de las moléculas de adnectina.

20 Los resultados de estos ensayos indican que la adnectina anti-GPC3 es internalizada por las células Hep3B y H446 (Figura 7) a una velocidad media-lenta ($T_{1/2} > 1$ hora) y alcanza > 90 % de internalización después de 6 horas. Como se muestra en la figura 8, en el punto de tiempo de 15 minutos, la mayor parte de la adnectina anti-GPC3 está asociada a la membrana y en el punto de tiempo de 8 horas la mayor parte de la señal de GPC3-adnectina está dentro de las células.

Ejemplo 9: Farmacocinética *in vivo* de GPC3-AdxDC

25 Se determinó el perfil de exposición sistémica de AdxDC anti-GPC3 (DAR1) en ratones. A los ratones NOD/SCID hembra (13 semanas de edad) se les administraron dosis por vía intravenosa con una dosis única de alta (240 nmol/kg) y baja (24 nmol/kg) dosis de AdxDC de control de no unión y de unión a GPC3 (GPC3 DAR1 AdxDC y RGE AdxDC, respectivamente) según el diseño experimental siguiente. Los puntos de tiempo de sangre indicados fueron 30 extracciones en serie de la vena de la cola usando anticoagulante CPD (solución de citrato-fosfato-dextrosa, Sigma C7165). El plasma obtenido de estas muestras de sangre se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta que estuvo listo para el análisis.

Tabla 5 - Programa de dosificación para el modelo de xenoinjerto

Grupo	N	Artículo de prueba	Dosis (nmol/kg)
1 dosis baja	3	AdxDC de unión a glicicano-3	24
1 dosis alta	3		240
Puntos de tiempo: 5-20-40 min, 1 - 1.5 - 2- 3- 4 - 6- 8 - 24 h			

35 Los niveles plasmáticos de AdxDC se analizaron mediante ensayos de unión a ligando de mesoescala (MSD) con dos formatos diferentes. Los ensayos de MSD para niveles totales de ensayos de adnectina conjugada y no conjugada utilizados para capturar un anticuerpo monoclonal anti-His generado internamente (a 4 ug/ml), y para la detección de un anticuerpo policlonal anti-armazón de conejo generado internamente combinado a una dilución 1:10000 seguido por un anticuerpo de cabra anti-conejo marcado con azufre (a 1 ug/ml). Ensayos de MSD para la adnectina conjugada 40 intacta utilizada para capturar un anticuerpo monoclonal anti-His generado internamente (a 4 ug/ml) y para la detección de un anticuerpo anti-tubulisina de ratón marcado con azufre generado internamente (a 1 ug/ml).

45 Los resultados de este ensayo, que se resumen en la Tabla 6 (Análisis no compartimental Phoenix WinNonlin, modelo NCA) y en la Figura 9 (Ensayo MSD anti-tubulisina), indican además que la AdxDC tiene un perfil de exposición corta en ratones.

Tabla 6 - Resumen de parámetros de farmacocinética de AdxDC de GPC3

		NCA									
dosis	especie	HL-Lambda-z (h)	Cl_obs (ml/h/kg)	Vss_obs (ml/kg)	AUCtodos (h * nmol/l)	AUCINF_obs (h * nmol/l)	AUC_% Extrap_obs (%)	MRTINF_obs (h)	Cmáx (nmol/l)		
alta	total	0,74	288	136	835	836	0,11	0,47	2124		
	intactas	0,80	353	249	740	740	0,06	0,71	1870		
baja	total	0,59	344	192	69	70	1,12	0,56	165		
	intactas	0,63	445	233	58	59	0,48	0,52	145		

Ejemplo 10: Inhibición del crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto de roedores

La eficacia del conjugado de fármaco GPC3-tubulicina no PEGilado se probó en ratones CD1 y ratas Fischer.

5 Ratones hembra NOD-SCID y CD1 (13 semanas de edad, de Charles River Laboratories, Wilmington, MA) y ratas Fischer hembra (10 semanas de edad, de Charles River Laboratories, Wilmington, MA) se alojaron en una habitación con temperatura controlada con un ciclo inverso de luz/oscuridad de 12 horas. El agua y la comida estándar estaban disponibles *ad libitum*. Los animales para los estudios de seguridad fueron asignados al azar y distribuidos entre los grupos de tratamiento para recibir la AdxDC de control o de ensayo en función del peso corporal (aproximadamente
10 20-25 g).

Hep3B, un carcinoma hepatocelular humano, se mantuvo en cultivo usando EMEM n.º cat. en ATCC 30-2003 suplementado con 10 % de FBS (Thermo n.º cat. ATK-33398). Para estudios de eficacia, se generaron xenoinjertos por implantación subcutánea de 100 µl de células Hep3B 5×10^6 (suspensión celular al 50 % con fenol rojo Matrigel estándar, Corning n.º cat. 354234) en el flanco derecho de ratones NOD-SCID. Para demostrar la eficacia *in vivo*, las AdxDC se administraron por inyección intravenosa en NaOAc 50 mM/NaCl 150 mM/pH 5,5, o solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los controles se trataron con una AdxDC control de no unión. A los animales de prueba (n = 8 animales/grupo) se les administró por vía intravenosa cada tres días un total de seis dosis, con dosis variables de AdxDC. Las medidas del peso corporal se registraron antes de la aleatorización, el día de la aleatorización y dos veces a la semana durante los períodos de tratamiento y al final del estudio. El crecimiento tumoral se controló utilizando mediciones con compás digital dos veces a la semana. Los resultados se evaluaron mediante análisis pareado de dos colas t de Student. El diseño representativo del estudio y los resultados utilizando la administración de dosificación cada tres días se representan en la Tabla 7 y la Figura 10.
15
20

25

Tabla 7: Calendario de dosificación

AdxDC	DAR	Dosis µmol/kg	Calendario	T/C (d17) (%)
ADX_6093_A01-961 (control de no unión)	1	0,3	Cada 3 días	
ADX_6077_F02-961	1	0,1	Cada 3 días	96
ADX_6077_F02-961	1	0,3	Cada 3 días	95
ADX_6912_G02-961	2	0,3	Cada 3 días	96
ADX_6912_G02-961	2	0,3	Cada 5 días	96

La administración semanal se evaluó en xenoinjertos de Hep3B. Los resultados indican que la administración semanal de ADX_6077_F02-961 DAR1 y DAR2 a 0,1 µmol/kg inhibió de forma eficaz los xenoinjertos de HepG2 $TV_0 = 380-480^3$ (Figura 11), $TV_0=228-350 \text{ mm}^3$ (Figura 12), y $TV_0=514-673 \text{ mm}^3$ (Figura 13).
30

30

En resumen, la administración semanal de AdxDC de GPC3 inhibe el crecimiento de xenoinjertos tumorales de CHC, y AdxDC de GPC3 DAR1 y DAR2 demostraron una inhibición equivalente del crecimiento tumoral, que era dependiente de la diana. Además, la prevención de la pérdida de peso inducida por la carga tumoral se asoció con la actividad antitumoral de las AdxDC de GPC3.
35

35

En estudios de seguridad n ratones, los ratones CD1 tratados por vía intravenosa cada dos días para un total de 9 dosis a dosis variables hasta una dosis más alta de 0,5 µmol/kg, 5 veces la dosis eficaz (0,1 µmol/kg) tanto con GPC3 como con AdxDC de control de no unión. No se identificó la MTD en los estudios de seguridad en ratones CD1. No se observó toxicidad renal en ningún grupo, a ninguna dosis ni frecuencia. En ratones CD1, la semivida de la AdxDC fue de aproximadamente 20 minutos (ensayos de MSD como se ha descrito anteriormente). No se observó pérdida de peso corporal y todos los ratones sobrevivieron al tratamiento hasta la necropsia programada. La bioquímica y la hematología séricas se evaluaron a intervalos durante el período de dosificación utilizando instrumentos de diagnóstico veterinario Abaxis, VETSCAN VS2 y HM5, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en la bioquímica o hematología séricas en comparación con el valor basal. La histopatología se evaluó mediante tinción H&E de los tejidos de corazón, hígado, bazo y riñón recogidos al final del estudio. No se observaron toxicidades limitantes de la dosis en ninguno de los tejidos evaluados y se observó neuropatía epitelial tubular mínima/leve en todos los grupos.
40
45

45

En estudios de seguridad en ratas Fischer, la semivida de la AdxDC fue de aproximadamente 30 minutos (ensayos de MSD como se ha descrito anteriormente). Se observaron algunas tolerabilidades dependientes de la dosis y degeneración del músculo esquelético en la administración más frecuente (cada dos días) de dosis de 0,36 µmol/kg sin cambios en la histopatología de la médula ósea o el hígado o toxicidad cardíaca. Estos hallazgos no se observaron cuando se realizaron los mismos estudios en ratas utilizando administración semanal de AdxDC en el mismo intervalo de dosis.
50
55

55

En su conjunto, se observó una eficacia excelente a pesar de la corta semivida en plasma y la baja toxicidad fuera de

la diana, consistente con baja exposición sistémica, en ambas especies de roedores.

Ejemplo 11: Mapeo del sitio de unión a adnectina en GPC3 humano usando HDX-MS.

5 El sitio de unión a adnectina en GPC3 humano (secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 14) se evaluó usando espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX-MS). El método de espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX-MS) sondea la conformación de proteínas y la dinámica conformacional en solución al monitorizar la tasa de intercambio de deuterio y la extensión en los hidrógenos de amida del esqueleto. El nivel de HDX depende de la accesibilidad al disolvente de los hidrógenos de amida del esqueleto y la conformación de la proteína. El incremento de masa de la proteína en HDX puede medirse de forma precisa con MS. Cuando esta técnica se junta con la digestión enzimática, se pueden obtener las características estructurales al nivel de péptido, lo que permite la diferenciación de los péptidos expuestos en la superficie de los plegados en el interior o de los secuestrados en la interfaz de un complejo proteína-proteína. Normalmente, se realizan experimentos de marcaje con deuterio y la posterior inactivación, seguido de digestión con pepsina en línea, separación de péptido, y análisis MS.

20 Antes de mapear el sitio de unión a adnectina en GPC3 humano reconocido por ADX_6077_F02 mediante HDX-MS, se realizaron experimentos sin deuterio para generar una lista de péptidos pépticos comunes para las muestras de GPC3, logrando una cobertura de secuencia del 87,4 % para GPC3 (Figura 14). En este experimento, se usó tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) durante la etapa de marcaje, seguido de la adición de tampón de inactivación (tampón fosfato 200 mM con GdnCl 4 M y TCEP 0,4 M, pH 2,5, 1:1, v/v).

25 Para los experimentos de mapeo de sitios de unión a adnectina, se mezclaron 5 µl de cada muestra (GPC3 o GPC3 con ADX_6077_F02) con 55 µl de tampón de marcaje HDX (tampón fosfato 10 mM en D20, pD 7,0) para iniciar las reacciones de marcaje. Las reacciones se llevaron a cabo durante diferentes periodos de tiempo: 1 min, 10 min y 240 min. Al final de cada periodo de reacción de marcaje, la reacción se inactivó añadiendo tampón de inactivación (1:1, v/v) y la muestra enfriada se inyectó en el sistema de HDX-MS de Waters para el análisis. Los péptidos pépticos comunes observados se monitorizaron por sus niveles de captación de deuterio en ausencia/presencia de ADX_6077_F02 (Figuras 14 y 15).

30 Los datos experimentales obtenidos de las mediciones de HDX-MS indican que AADX_6077_F02 reconoce un sitio de unión a adnectina discontinuo compuesto por dos regiones peptídicas en GPC3 humano:

35 Región 1: HQVRSFF (restos de aminoácidos 36-42 de GPC3); SEQ ID NO: 356

Región 2: EQLLQSASM (restos de aminoácidos 90-98 de GPC3); SEQ ID NO: 346

Ejemplo 12: Generación de variantes DG

40 El análisis de la secuencia de aminoácidos de ADX_6077_F02 indicó que el DG en el bucle FG de la molécula podría tener un bajo riesgo de isomerización de aspartato.

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFT

VPGEHVTATISGLKPGVDYITVYAVTYDGEKAATDWSISINYRTPCHHHHHH
(SEQ ID NO: 118)

45 Se generaron ocho variantes de ADX_6077_F02 con mutaciones en el sitio DG. Las secuencias de estos mutantes se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8: Variantes de ADX 6077 F02

	Elementos en C-term	Modificación	Secuencia de proteínas
DG→mutante de EC	Cys	alquilada	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGEHVTATISGLKPGVDYITVYAVTYEGEKAATDWSISINYRTPC* (SEQ ID NO: 143)

(continuación)

	Elementos en C-term	Modificación	Secuencia de proteínas
DG→mutante de SG	Cys	alquilada	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAH RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGEHVTATIS GLKPGVDYTTITVYAVTYSGEKAATDWSISIN YRTPC* (SEQ ID NO: 169)
DG→mutante de AG	Cys	alquilada	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAH RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGEHVTATIS GLKPGVDYTTITVYAVTYAGEKAATDWSISIN NYRTPC* (SEQ ID NO: 197)
DG→mutante de GG	Cys	alquilada	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAH RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGEHVTATIS GLKPGVDYTTITVYAVTYGGEKAATDWSISIN NYRTPC* (SEQ ID NO: 224)
DC→mutante de DS	Cys	alquilada	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAH RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGEHVTATIS GLKPGVDYTTITVYAVTYDSEKAATDWSISIN YRTPC* (SEQ ID NO: 251)
DG→mutante de DA	Cys	alquilada	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAH RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGEHVTATIS GLKPGVDYTTITVYAVTYDAEKAATDWSISIN YRTPC* (SEQ ID NO: 278)
DG→mutante de DL	Cys	alquilada	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAH RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGEHVTATIS GLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISIN YRTPC* (SEQ ID NO: 305)
DC→mutante de DV	Cys	alquilada	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAH RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGEHVTATIS GLKPGVDYTTITVYAVTYDVEKAATDWSISIN YRTPC* (SEQ ID NO: 332)

Ejemplo 13: Caracterización biofísica de variantes de DG

- 5 Se produjeron entre cien y ciento cincuenta miligramos de cada uno de los ocho mutantes, se purificaron y se alquilaron como anteriormente. De Tres a cinco miligramos de cada una de las ocho variantes alquiladas a 1-3 mg/ml se sometieron a unión de SEC, DSC, GPC3 (constantes de disociación de SPR 1pt), MS y HIC. Los resultados se resumen en la Tabla 9.

10

Tabla 9: Propiedades biofísicas de las variantes ADX_6077_F02 DG

Mutante	Id. del clon	k _{off} de huGPC3 (mut/par)	k _{off} de muGPC3 (mut/par)	% mono (SEC)	T _m (DSC)
DG→ <u>EG</u>	P1-055673	5,4	5,1	96 %	88 °C
DG→ <u>SG</u>	P1-055668	5,2	4,8	96 %	85, 91 °C
DG→ <u>SG</u>	P1-055669	5,9	5,5	96 %	85, 91 °C
DG→ <u>GG</u>	P1-055670	14	12	96 %	84, 90 °C
DG→ <u>DS</u>	P1-055667	3,5	3,3	96 %	84 °C
DG→ <u>DA</u>	P1-055660	3,9	3,7	96 %	86, 98 °C
DG→ <u>DL</u>	P1-055671	3,6	3,1	96 %	84 °C
DG→ <u>DV</u>	P1-055672	7,9	7,0	96 %	84 °C

- 5 Seis de los ocho mutantes DG demostraron un aumento de 3-5 veces en la k_{off} en comparación con la adnectina parental y fueron monoméricos y termoestables. Mediante Biacore T100 se evaluaron adicionalmente las afinidades de unión de las adnectinas mutantes GPC3 DG alquiladas para GPC3 humano y murino usando tampón de carrera HBS-P + con inmovilización directa de proteínas GPC3 humanas y de ratón [Hu (Fc 2,3) y Mu (Fc 4) GPC3-His (R&D Systems)] con una serie 200-1,56 nM inyectada para la asociación de 180 s, disociación de 600 s. Los datos se ajustan a un modelo de unión 1: 1 en el software BiaEvaluation y se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10 - Cinética de unión de las adnectinas mutantes DG

Descripción	huGPC3				muGPC3			
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Diferencia de afinidad (KD) frente al parental alquilado	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Diferencia de afinidad (KD) frente al parental alquilado
ADX_6077_F02 alquilada	9,53E+04	5,34E-04	5,60E-09	1,0	1,3E+05	4,9E/-04	3,8E-09	1,0
6077_F02 DG-> DA	7,22E+04	1,83E-03	2,54E-08	4,5	1,0E+05	1,7E-03	1,6E/-08	4,3
6077_F02 DG-> DS	7,16E+04	1,66E-03	2,33E-08	4,2	1,0E+05	1,5E/-03	1,5E/-08	3,9
6077_F02 DG-> SG	9,40E+04	2,21E-03	2,35E-08	4,2	1,3E+05	2,0E-03	1,6E/-08	4,1
6077_F02 DG-> AG	1,03E+05	2,43E-03	2,37E-08	4,2	1,4E/+05	2,1E/-03	1,5E/-08	4,0
6077_F02 DG-> DL	7,26E+04	1,59E-03	2,19E-08	3,9	1,0E+05	1,5E/-03	1,5E/-08	3,8
6077_F02 DG-> DV	7,10E+04	3,09E-03	4,35E-08	7,8	8,5E/+04	2,5E/-03	3,0E-08	7,8
6077_F02 DG-> EG	7,63E+04	2,29E-03	3,00E-08	5,3	1,1E/+05	2,1E/-03	1,9E/-08	5,1

- 10 Los datos demostraron que estos mutantes GPC3 DG tenían una afinidad disminuida de aproximadamente 3-5 veces por GPC3 humano y murino en comparación con ADX_6077_F02 parental. Las diferencias en las afinidades eran impulsadas por constantes de disociación más rápidas, mientras que las constantes de asociación fueron consistentes con la adnectina parental (Figura 16).

15 Ejemplo 14: Evaluación de la unión celular y la inmunogenicidad de variantes de DG

- La unión de variantes DG a huGPC3 en mutantes DG GPC3 AdxDC se evaluó mediante citometría de flujo para la unión a células de carcinoma Huh7 cultivadas en medios DMEM con FBS al 10 %. Las células se cosecharon usando Versene, una solución de disociación celular EDTA de Lonza, n.º de cat 17-71 1E. Las células tumorales (células 20 1E5/reacción) se suspendieron en tampón FACS (PBS, BSA al 1 %, 0,05 % de azida de Na) y se mezclaron con una dilución en serie de AdxDC durante una hora en hielo. Las células se lavaron tres veces con tampón FACS y la AdxDC unida se detectó con un anticuerpo monoclonal anti-armazón interno y un anticuerpo conjugado con PE de (RnD Systems), n.º de cat. NL007, y se leyó en un citómetro de flujo. El análisis de datos se realizó con el software FlowJo y se determinó una CE_{50} del 50 % de la unión máxima con el software PRISM™, versión 5.0 (software GraphPad, La 25 Jolla, CA, EE.UU.).

Para la detección anti-His de (mutantes no DG), se utilizó el mismo protocolo, excepto que se usó el anticuerpo anti-His conjugado con APC generado internamente.

- 30 Los resultados, los cuales se muestran en la Tabla 11, indican que los mutantes tenían valores de CE_{50} similares a los de la adnectina parental.

Las variantes de DG para huGPC3 también se evaluaron por su potencial para provocar una respuesta inmunitaria en seres humanos usando un ensayo de proliferación de PBMC humanos. Se cultivaron PBMC de 40 donantes con haplotipos HLA de clase II que coincidían estrechamente con las frecuencias de la población mundial en presencia de variantes o controles de DG durante 7 días. Al final del ensayo, los linfocitos T CD4+ marcados con CFSE se analizaron con FACS para la proliferación. El porcentaje de donantes que mostraron proliferación de linfocitos T CD4+ se analizó como una lectura del riesgo de inmunogenicidad humana. Los resultados del ensayo indican que el mutante de DG a DA (PI-055660) tiene un riesgo significativamente menor de inmunogenicidad (IMG) (18 % de los donantes respondieron positivo) en comparación con los otros mutantes de DG (36-54 % de respuestas positivas) como se resume en la Tabla 11.

Tabla 11 - Cinética de unión celular de variantes DG

Mutante	ID del clon: P1-	CE ₅₀ de huGPC3 en células(mutante/parental)	IMG: % de respondedores + ve
DG→EG	055673	1,6	49 %
DG→SG	055668	1,1	41 %
DG→AG	055669	1,1	54 %
DG→DS	055667	1,4	36 %
DG→DA	055660	1,3	18 %
DG→DL	055671	1,7	54 %

En la Tabla 12 se presenta un resumen de las características de la variante DA AdxDC DAR1 ("GPC3_AdxDC DA variante-DAR1" o "variante de DA AdxDC DAR1"):

Tabla 12: Características de la variante DA de AdxDC DAR1

% del monómero	100 %
DSC T _m (PBS)	79, 87 °C
K _d de SPR	25 nM (hu, 37 °C) 23 nM (mu, 37 °C)
K _{off} de SPR	2,1 x 10 ⁻³ s ⁻¹ (hu, 37 °C) 9,5 x 10 ⁻⁴ s ⁻¹ (mu, 37 °C)
CE ₅₀ de unión a célula (Huh7)	2,2 nM *
CI ₅₀ de muerte celular (Huh7)	0,2 nM
*Medido para proteínas no conjugadas	

15 Ejemplo 15: Adnectinas anti-GPC3 marcadas y PEGiladas con FITC

Marcaje con FITC: ADX_6077_F02 y la adnectina de control de no unión se redujeron con DTT o TCEP, seguido de cromatografía de filtración en gel G25 o diálisis. A continuación se añadió un exceso de reactivo de fluoresceína-5-maleimida (Thermo Scientific) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas seguido de cromatografía de filtración en gel G25 o diálisis extensa (3-4 cambios de tampón). El grado resultante de marcaje se midió por absorbancia siguiendo las instrucciones del fabricante y/o por espectrometría de masas. Las afinidades de unión de GPC3 marcada con FITC y PEGilada para GPC3 humano y murino se evaluaron como se describe en los Ejemplos anteriores y los resultados se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13 - Cinética de las adnectinas modificadas con GPC3

Adnectina	huGPC3			muGPC3		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
ADX_6077_F02 alquilada	8,90E+04	5,24E-04	5,88E-09	1,23E+05	4,53E-04	3,69E-09
6077_F02-FITC	8,15E+04	4,98E-04	6,11E-09	1,12E+05	4,46E-04	3,97E-09

(continuación)

Adnectina	huGPC3			muGPC3		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
RGE-FITC	No unión			No unión		
6077_F02.dPEG	7,35E+04	6,02E-04	8,19E-09	1,03E+05	5,59E-04	5,43E-09
6077_F02.dPEG	7,50E+04	6,07E-04	8,10E-09	1,06E+05	5,57E-04	5,26E-09
6077_F02-PEG3.4	7,18E+04	5,84E-04	8,14E-09	1,02E+05	5,23E-04	5,12E-09

Los datos demostraron que las adnectinas anti-GPC3 marcadas con FITC y PEGiladas retuvieron la afinidad de unión a GPC3 humano y murino.

5

Ejemplo 16: Características adicionales de las moléculas GPC3_AdxDC DA y DG

Se demostró que la variante DARI de GPC3_AdxDC DA es química y biofísicamente estable a pH 6,0, en estudios de estabilidad acelerada. Además, su afinidad por el GPC3 humano (por SPR) no cambió después de 4 semanas a 40 °C.

10

La isomerización del aspartato de la variante DA fue aproximadamente 4 veces menor que la de la molécula DG original. El porcentaje de isomerización de D80 de la molécula DG, después de la incubación durante 3 semanas a 40 °C a pH 6 o pH 7 fue de 3,6 y 2,4, respectivamente.

15

El GPC3_AdxDC (DG) muestra un perfil de toxicidad favorable bajo dosis semanales en ratas CDF (Q7Dx4) (Tabla 14). No se observaron respuestas adversas en los perfiles de hematología o bioquímica del suero en ratas CDF bajo administración semanal de AdxDC de GPC3 (Q7Dx4).

20

Tabla 14: Perfil de toxicidad de GPC3_AdxDC (DG)

Tratamiento (umol/kg)		Corazón (degeneración)	Hígado (↑ mitosis)	Músculo esquelético (regeneración)	Riñón (↑ mitosis)
NBC* AdxDC	0,28	mínima	ninguna	ninguna	mínima
AdxDC de GPC3	0,093	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
	0,28	ninguna	ninguna	ninguna	mínima

**NBC" se refiere a AdxDC de no unión (conjugado de adnectina-fármaco)

Ejemplo 17: Los conjugados de fármaco-adnectina de GPC3 se unen al tejido de xenoinjerto de GPC3 humano *in vivo*

Se incubó tejido de xenoinjerto de Hep3B de alta expresión de GPC3 humano con una molécula de adnectina DG de unión a GPC3 conjugada con FITC ("GPC3_AdxDC (DG)") DAR1 a una concentración de 0,04 µg/ml o con una adnectina no de unión a GPC3 a 0,2 µg/ml. Los resultados indican que la molécula GPC3_AdxDC (DG) se une al tejido de xenoinjerto de Hep3B, mientras que la adnectina de no unión no se unió significativamente.

También se evaluó la unión de otros tejidos y los resultados indican que existe una unión no específica de GPC3_AdxDC (DG) a la placenta. Sin embargo, la molécula no se une significativamente a los tejidos de estómago, corazón, riñón, hígado, piel o amígdalar.

El GPC3_AdxDC (DA) DAR1 muestra una unión similar pero más débil en xenoinjerto de Hep3B. La unión saturada se logró a 0,2 µg/ml.

35

Ejemplo 18: GPC3_AdxDC (DA) es altamente eficaz en xenoinjertos derivados de líneas celulares con alta expresión de glipicano-3

Se usaron xenoinjertos de Hep3B (carcinoma hepatocelular; 260.000 moléculas de GPC3/célula) en ratones NSG. GPC3_AdxDC (DA) DAR1 o una adnectina de control de no unión se administraron i.v. semanalmente, 3 veces, a las dosis indicadas en la Tabla 15.

40

Tabla 15: Dosis e inhibición del crecimiento tumoral de xenoinjertos de Hep3B en ratones NSG

AdxDC	Dosis		TGI _{D26} * (%)
	mpk	µmol/kg	
GPC3_AdxDC (DA)	1,4	0,12	109
	0,5	0,04	103
	0,1	0,01	62
	0,05	0,004	20
Adnectina de no unión (RGE; control -ve)	1,4	0,12	-
TGI _{D26} *: Inhibición del crecimiento tumoral el día 26			

5 Los resultados, que se muestran en la tabla 15 y en la figura 17, indican que GPC3_AdxDC (DA) es eficaz para inhibir el crecimiento tumoral de Hep3B *in vivo*.

Se realizó un experimento similar con xenoinjertos derivados de líneas celulares con baja expresión de glipicano-3 (H446). Las células H446 son células de carcinoma de pulmón microcítico con aproximadamente 40.000 moléculas/célula de PC3 humano. Las células se inyectaron en ratones CB17 SCID.

10

Tabla 16: Dosis e inhibición del crecimiento tumoral de células H446 en ratones CB17 SCID

AdxDC	Dosis (Q3Dx4)		TGI _{D21} (%)
	mpk	µmol/kg	
Unión a GPC3 (BMT-279771)	12	1,0	
	8	0,67	53
	4	0,33	
	2	0,17	16
RGE (control -ve)	1,4	0,12	-

15

Los resultados, que se muestran en la tabla 16 y en la figura 18, indican que GPC3_AdxDC (DA) ralentiza el crecimiento de estos tumores.

Ejemplo 19: Captación preferente de GPC3_AdxDC a tumor Hep3B en relación con tejidos normales

20

A los ratones se les administró GPC3_AdxDC marcado con ³H a 0,015 o 0,22 µmol/kg, y la radiactividad se midió por autorradiografía de cuerpo entero (QWBA) después de 0,17 horas, 1 hora, 5 horas y 168 horas.

Los resultados, que se muestran en las Figuras 19 y 20, indican lo siguiente:

25

- Distribución rápida a tumores y tejidos altamente perfundidos;
- La radiactividad de alto nivel permaneció en los tumores 168 horas después de la dosificación, sin radiactividad o radiactividad baja en otros tejidos;
- Radiactividad significativa en el riñón: aproximadamente el 30 % de la radiactividad se excretó en la orina; y
- Patrones de expresión similares entre los grupos de dosis alta y baja.

30

En un experimento similar, a los ratones se les administró GPC3_AdxDC marcado con ³H o AdxDC de control no de unión a 0,22 µmol/kg, y la radiactividad se midió por QWBA después de 0,17 horas, 1 hora, 5 horas y 168 horas.

35

Los resultados, que se muestran en las Figuras 21 y 22, indican que hay una captación más alta del tumor Hep3B con GPC3_AdxDC en relación con el control de unión (RGE AdxDC). El perfil de distribución en otros tejidos es comparable para GPC3_AdxDC y el control AdxDC de no unión.

40

La concentración de radiactividad total de GPC3_AdxDC en tumor y tejidos se representa en la Figura 23. La figura muestra la presencia de un nivel mucho más alto de GPC3_AdxDC en los tumores que en otros tejidos (excepto el

rión).

Ejemplo 20: Barrido posicional de adnectinas anti-GPC3

5 Este ejemplo describe el barrido posicional de 6077_F02 en que EIDKPSQ (SEQ ID NO: 369) se retiró y se añadió PC y en el que el aminoácido 79 (es decir, la "D" de "DG") es G (como en el clon original) o A.

10 Las dos proteínas, diferentes solo en el aminoácido 79, se mezclaron durante la construcción de la biblioteca. La unión a glipicano-3-biotina humano se determinó a 100 nM, 10 nM y 1 nM. Para cada lote, la elución de selección 10 nM se comparó con la elución de marca y la elución de selección 1 nM también se comparó con la elución de marca. Esto generó 4 mapas de calor para cada bucle: 10 nM cuando 79 es G; 1 nM cuando 79 es G; 10 nM cuando 79 es A y 1 nM cuando 79 es A.

15 Para el bucle FG, los tres segmentos se combinaron para mostrar el mapa de calor completo. Para la posición 79, en el mapa de calor se generó donde se normalizó a la G y un mapa de calor donde se normalizó a la A.

20 Los resultados, en forma de mapas de calor, se muestran en las Figuras 24-31. En los mapas de calor, un número > 1 indica una sustitución favorable, sin embargo, cualquier número > 0,2 también es aceptable como sustitución. Cuanto mayor sea el número, más favorable es la sustitución. Por ejemplo, los mapas de calor indican lo siguiente para la adnectina DG parental:

- En el bucle BC (es decir, la secuencia SDDYHAH (aminoácidos 15-21 de la SEQ ID NO:98)):
 - o S23 puede estar sustituido con cualquier aminoácido;
 - o D24, preferentemente no está sustituido con ningún otro aminoácido, aunque S y E pueden ser aceptables.
 - o Otras sustituciones aceptables pueden derivarse de los mapas de calor, en las que cualquier sustitución que tenga un número > 0,2 es aceptable y un número > 1 es preferente.

Equivalentes

35 Los expertos en la materia reconocerán o serán capaces de determinar, usando únicamente experimentación de rutina, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Se pretende que tales equivalentes estén abarcados por las siguientes reivindicaciones.

Tabla 1 – Sumario de las secuencias

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
1	Dominio ¹⁰ Fn3 humano completo de tipo silvestre	VSDVPRDLEVVAAATP T S L L I S W D A P A V T V R Y Y R I T Y G E T G G N S P V Q E F T V P G S K S T A T I S G L K P G V D Y T I T V Y A V T G R G D S P A S S K P I S I N Y R T
2	Dominio ¹⁰ Fn3 del núcleo humano de tipo silvestre	EVVAAATP T S L L I S W D A P A V T V R Y Y R I T Y G E T G G N S P V Q E F T V P G S K S T A T I S G L K P G V D Y T I T V Y A V T G R G D S P A S S K P I S I N Y R T
3	Secuencias de seis bucles del dominio ¹⁰ Fn3 humano definidas genéricamente	VSDVPRDLEVVAA (X) _u L L I S W (X) _v Y Y R I T Y (X) _w F T V (X) _x A T I S G (X) _y T I T V Y A V (X) _z I S I N Y R T
4	Enlazador flexible en C terminal del dominio ¹⁰ Fn3 humano de tipo silvestre	VSDVPRDLEVVAAATP T S L L I S W D A P A V T V R Y Y R I T Y G E T G G N S P V Q E F T V P G S K S T A T I S G L K P G V D Y T I T V Y A V T G R G D S P A S S K P I S I N Y R T E I D K P S Q
5	ADX_4578_F03 central	EVVAAATP T S L L I S W H P P H P N I V S Y H I Y Y G E T G G N S P V Q E F T V E G S K S T A K I S G L K P G V D Y T I T V Y A V A P E I E K Y Y Q I W I N Y R T
6	Bucle BC de ADX_4578_F03	HPPHPNIVS
7	Bucle DE de ADX_4578_F03	EGSKST
8	Bucle DE de ADX_4578_F03	VAPEIEKYYQ

ES 2 809 125 T3

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
9	ADX_45708_F03 de longitud completa	VSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGRG DSPASSKPI SIN YRT
10	ADX_4578_F03 de longitud completa con líder en N-terminal y cola en C-terminal	EVVAATPTSLLI SWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGS KSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGRG DSPASSKPI SIN YRT
11	ADX_4578_F03 de longitud completa con P _m X _n C-terminal	VSDVPRDLEVVA (X) ₁ LLISW (X) ₂ YRITY (X) ₃ FTV (X) ₄ ATI SG (X) ₅ YITITVYAV (X) ₆ ISIN YRT
12	ADX_4578_F03 de longitud completa con P _m CX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGRG DSPASSKPI SIN YRTEIDKPSQ
13	ADX_4578_F03 de longitud completa con P _m CX _n en C-terminal (m=0; n=0)	EVVAATPTSLLI SWHPPHPNIVSYHIYYGETGGNSPVQEFTV EGS KSTAKISGLKPGVDYITITVYAVAPEIEKYYQ IWIN YRT
14	ADX_4578_F03 de longitud completa con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=1) y marcador de His ₆	HPPHPNIVS
15	ADX_4578_F03 de longitud completa con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	EGSKST
16	ADX_4578_F03 de longitud completa con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1, n1=5, n2=0)	VAPEIEKYYQ
17	ADX_4578_F03 de longitud completa con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1, n1=5, n2=0) y marca de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWHPPHPNIVSYHIYYGETGGNSPV QEFTVEGSKSTAKISGLKPGVDYITITVYAVAPEIEKYYQ IWIN YRTPCPPPPCHHHHHH
18	ADX_4578_H08 central	EVVAATPTSLLI SWSGDYGDSYRITYGETGGNSPVQEFTV PDG SNTATISGLKPGVDYITITVYAVEAYGKGYTRYTP ISIN YRT
19	Bucle BC de ADX_4578_H08	SGDYGDSY
20	Bucle DE de ADX_4578_H08	PDGSNT
21	Bucle FG de ADX_4578_H08	VEAYGKGYTRYTP
22	ADX_4578_H08 de longitud completa	VSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSGDYGDSYRITYGETGGNSPV QEFTVDPGSNTATISGLKPGVDYITITVYAVEAYGKGYTRYTP ISIN YRT
23	ADX_4578_H08 de longitud completa con líder en N-terminal y cola en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSGDYGDSYRITYGETGGNS PVQEFTVDPGSNTATISGLKPGVDYITITVYAVEAYGKGYTRYTP ISIN YRTEIDKPSQ
24	ADX_4578_H08 de longitud completa con P _m X _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSGDYGDSYRITYGETGGNSPV QEFTVDPGSNTATISGLKPGVDYITITVYAVEAYGKGYTRYTP ISIN YRTP _m X _n
25	ADX_4578_H08 de cuerpo entero con P _m CX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSGDYGDSYRITYGETGGNSPV QEFTVDPGSNTATISGLKPGVDYITITVYAVEAYGKGYTRYTP ISIN YRTP _m CX _n
26	ADX_4578_H08 de longitud completa con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSGDYGDSYRITYGETGGNSPV QEFTVDPGSNTATISGLKPGVDYITITVYAVEAYGKGYTRYTP ISIN YRTPC
27	ADX_4578_H08 de longitud completa con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0) y marcador de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSGDYGDSYRITYGETGGNSPV QEFTVDPGSNTATISGLKPGVDYITITVYAVEAYGKGYTRYTP ISIN YRTPCHHHHHH

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
28	ADX_4578_H08 de longitud completa con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSGYDYGDSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPDGSNTATISGLKPGVDYITVYAVEAYGKGYTRYTPISINRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
29	ADX_4578_H08 de longitud completa con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1, n1=5, n2=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSGYDYGDSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPDGSNTATISGLKPGVDYITVYAVEAYGKGYTRYTPISINRTPCPPPPPC
30	ADX_4578_H08 de longitud completa con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1, n1=5, n2=0) y marca de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSGYDYGDSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPDGSNTATISGLKPGVDYITVYAVEAYGKGYTRYTPISINRTPCPPPPPPCHHHHHH
31	ADX_4578_B06 central	EVVAATPTSLLLISWFPDRYVYYITYGETGGNSPVQEF TVEGHKQT AYISGLKPGVDYITVYAAAYISGLISINRYT
32	Bucle BC de ADX_4578_B06	FPDRYV
33	Bucle DE de ADX_4578_B06	EGHKQT
34	Bucle FG de ADX_4578_B06	AYISGL
35	ADX_4578_B06 de longitud completa	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWFPDRYVYYITYGETGGNSPVQEF TVEGHKQTAYISGLKPGVDYITVYAIYYYPDDFQGYQPISINRYT
36	ADX_4578_B06 de longitud completa con líder en N-terminal y cola en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWFPDRYVYYITYGETGGNSPVQEFTVEGHKQTAYISGLKPGVDYITVYAIYYYPDDFQGYQPISINRYRTEGSGS
37	ADX_4578_B06 de longitud completa con PmX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWFPDRYVYYITYGETGGNSPVQEF TVEGHKQTAYISGLKPGVDYITVYAIYYYPDDFQGYQPISINRYRTP _m X _n
38	ADX_4578_B06 de cuerpo entero con PmCX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWFPDRYVYYITYGETGGNSPVQEF TVEGHKQTAYISGLKPGVDYITVYAIYYYPDDFQGYQPISINRYRTP _m CX _n
39	ADX_4578_B06 de longitud completa con PmCX _n en C-terminal (m=1; n=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWFPDRYVYYITYGETGGNSPVQEF TVEGHKQTAYISGLKPGVDYITVYAIYYYPDDFQGYQPISINRYRTPC
40	ADX_4578_B06 de longitud completa con PmCX _n en C-terminal (m=1; n=0) y marcador de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWFPDRYVYYITYGETGGNSPVQEF TVEGHKQTAYISGLKPGVDYITVYAIYYYPDDFQGYQPISINRYRTPCHHHHHH
41	ADX_4578_B06 de longitud completa con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWFPDRYVYYITYGETGGNSPVQEF TVEGHKQTAYISGLKPGVDYITVYAIYYYPDDFQGYQPISINRYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
42	ADX_4578_B06 de longitud completa con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1, n1=5, n2=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWFPDRYVYYITYGETGGNSPVQEF TVEGHKQTAYISGLKPGVDYITVYAIYYYPDDFQGYQPISINRYRTPCPPPPPC
43	ADX_4578_B06 de longitud completa con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1, n1=5, n2=0) y marca de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWFPDRYVYYITYGETGGNSPVQEF TVEGHKQTAYISGLKPGVDYITVYAIYYYPDDFQGYQPISINRYRTPCPPPPPPCHHHHHH
44	ADX_4606_F06 central	EVVAATPTSLLLISWNSGHSQYFPDRYVYYITYGETGGNSPVQEF PRYGYTAYISGLKPGVDYITVYVAHSEASAPISINRYT
45	Bucle BC de ADX_4606_F06	NSGHSQY
46	Bucle DE de ADX_4606_F06	PRYGYT
47	Bucle FG de ADX_4606_F06	VAHSEASAP

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
48	ADX_4606_F06 de longitud completa	VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWNSGHSQYYRITYGETGGNSPVQ EFTVPRYGYTATISGLKPGVDYTTITVYAVAHSEASAPISINYRT
49	ADX_4606_F06 de longitud completa con líder en N-terminal y cola en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLSWNSGHSQYYRITYGETGGNSP VQEFVTPRYGYTATISGLKPGVDYTTITVYAVAHSEASAPISINYR TEIDKPSQ
50	ADX_4606_F06 de longitud completa con PmX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWNSGHSQYYRITYGETGGNSPVQ EFTVPRYGYTATISGLKPGVDYTTITVYAVAHSEASAPISINYRTP mX _n
51	ADX_4606_F06 de cuerpo entero con PmCX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWNSGHSQYYRITYGETGGNSPVQ EFTVPRYGYTATISGLKPGVDYTTITVYAVAHSEASAPISINYRTP mCX _n
52	ADX_4606_F06 de longitud completa con PmCX _n en C-terminal (m=1; n=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWNSGHSQYYRITYGETGGNSPVQ EFTVPRYGYTATISGLKPGVDYTTITVYAVAHSEASAPISINYRTP C
53	ADX_4606_F06 de longitud completa con PmCX _n en C-terminal (m=1; n=0) y marcador de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWNSGHSQYYRITYGETGGNSPVQ EFTVPRYGYTATISGLKPGVDYTTITVYAVAHSEASAPISINYRTP CHHHHHH
54	ADX_4606_F06 de longitud completa con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWNSGHSQYYRITYGETGGNSPVQ EFTVPRYGYTATISGLKPGVDYTTITVYAVAHSEASAPISINYRTP mCX _{n1} CX _{n2}
55	ADX_4606_F06 de longitud completa con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1, n1=5, n2=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWNSGHSQYYRITYGETGGNSPVQ EFTVPRYGYTATISGLKPGVDYTTITVYAVAHSEASAPISINYRTP C P P P P P C
56	ADX_4606_F06 de longitud completa con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1, n1=5, n2=0) y marca de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWNSGHSQYYRITYGETGGNSPVQ EFTVPRYGYTATISGLKPGVDYTTITVYAVAHSEASAPISINYRTP C P P P P P C H H H H H H H
57	ADX_5273_C01 central	VVAATPTSLLSWSDPYEEERYRITYGETGGNSPVQEFVPAFHTTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYKHKYAYYYPPISINYRT
58	Bucle BC de ADX_5273_C01	SDPYEEERY
59	Bucle DE de ADX_5273_C01	PAFHTT
60	Bucle FG de ADX_5273_C01	VTYKHKYAYYYPP
61	ADX_5273_C01 de longitud completa	VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWSDPYEEERYRITYGETGGNSPV QEFVPAFHTTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYKHKYAYYYPPISIN YRT
62	ADX_5273_C01 de longitud completa con líder en N-terminal y cola en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLSWSDPYEEERYRITYGETGGNS PVQEFVPAFHTTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYKHKYAYYYPP SINYRTEIDKPSQ
63	ADX_5273_C01 de longitud completa con PmX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWSDPYEEERYRITYGETGGNSPV QEFVPAFHTTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYKHKYAYYYPPIS INYRTPmX _n
64	ADX_5273_C01 de cuerpo entero con PmCX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWSDPYEEERYRITYGETGGNSPV QEFVPAFHTTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYKHKYAYYYPPIS INYRTPmCX _n
65	ADX_5273_C01 de longitud completa con PmCX _n en C-terminal (m=1; n=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWSDPYEEERYRITYGETGGNSPV QEFVPAFHTTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYKHKYAYYYPPIS NYRTPC
66	ADX_5273_C01 de longitud completa con PmCX _n en C-terminal (m=1; n=0) y marcador de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWSDPYEEERYRITYGETGGNSPV QEFVPAFHTTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYKHKYAYYYPPIS NYRTPCHHHHHH

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
67	ADX_5273_C01 de longitud completa con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSDPYEEERYRITYGETGGNSPV QEF TVPAFH TTATISGLKPGVDY TITVYAVTYKHKYAYYYPPIS I NYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
68	ADX_5273_C01 de longitud completa con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1, n1=5, n2=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSDPYEEERYRITYGETGGNSPV QEF TVPAFH TTATISGLKPGVDY TITVYAVTYKHKYAYYYPPIS I NYRTPC P P P P P C
69	ADX_5273_C01 de longitud completa con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1, n1=5, n2=0) y marca de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSDPYEEERYRITYGETGGNSPV QEF TVPAFH TTATISGLKPGVDY TITVYAVTYKHKYAYYYPPIS I NYRTPC P P P P P C H H H H H H
70	ADX_5273_D01 central	EVVAATPTSLLLISWEP EPSYKDDRY YRITYGETGGNSPVQEF TVPSF HQTATISGLKPGVDY TITVYAVTYEPDEYYFYYP ISINYRT
71	Bucle BC de ADX_5273_D01	EPSYKDDRY
72	Bucle DE de ADX_5273_D01	PSFHQT
73	Bucle FG de ADX_5273_D01	VTYEPDEYYFYYP
74	ADX_5273_D01 de longitud completa	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWEP SYKDDRYRITYGETGGNSPV QEF TVPSFHQTATISGLKPGVDY TITVYAVTYEPDEYYFYYPIS I NYRT
75	ADX_5273_D01 de longitud completa con líder en N-terminal y cola en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWEP SYKDDRYRITYGETGGNS PVQEF TVPSFHQTATISGLKPGVDY TITVYAVTYEPDEYYFYYP I SINYTEIDKPSQ
76	ADX_5273_D01 de longitud completa con PmX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWEP SYKDDRYRITYGETGGNSPV QEF TVPSFHQTATISGLKPGVDY TITVYAVTYEPDEYYFYYPIS I NYRTP _m X _n
77	ADX_5273_D01 de cuerpo entero con PmCX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWEP SYKDDRYRITYGETGGNSPV QEF TVPSFHQTATISGLKPGVDY TITVYAVTYEPDEYYFYYPIS I NYRTP _m CX _n
78	ADX_5273_D01 de longitud completa con PmCX _n en C-terminal (m=1; n=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWEP SYKDDRYRITYGETGGNSPV QEF TVPSFHQTATISGLKPGVDY TITVYAVTYEPDEYYFYYPIS I NYRTPC
79	ADX_5273_D01 de longitud completa con PmCX _n en C-terminal (m=1; n=0) y marcador de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWEP SYKDDRYRITYGETGGNSPV QEF TVPSFHQTATISGLKPGVDY TITVYAVTYEPDEYYFYYPIS I NYRTPC H H H H H H
80	ADX_5273_D01 de longitud completa con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWEP SYKDDRYRITYGETGGNSPV QEF TVPSFHQTATISGLKPGVDY TITVYAVTYEPDEYYFYYPIS I NYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
81	ADX_5273_D01 de longitud completa con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1, n1=5, n2=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWEP SYKDDRYRITYGETGGNSPV QEF TVPSFHQTATISGLKPGVDY TITVYAVTYEPDEYYFYYPIS I NYRTPC P P P P P C
82	ADX_5273_D01 de longitud completa con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1, n1=5, n2=0) y marca de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWEP SYKDDRYRITYGETGGNSPV QEF TVPSFHQTATISGLKPGVDY TITVYAVTYEPDEYYFYYPIS I NYRTPC P P P P P C H H H H H H
83	ADX_5274_E01 central	EVVAATPTSLLLISW SGDYHPHRY YRITYGETGGNSPVQEF TVPGE HETAATISGLKPGVDY TITVYAVTYDGEKADKYPP ISINYRT
84	Bucle BC de ADX_5274_E01	SGDYHPHRY
85	Bucle DE de ADX_5274_E01	PGEHET
86	Bucle FG de ADX_5274_E01	VTYDGEKADKYPP

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
87	ADX_5274_E01 de longitud completa	VSDVPRDLEVVAATPTSLLIWSGDYHPHRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGEHETATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKADKYPPISI NYRT
88	ADX_5274_E01 de longitud completa con líder en N-terminal y cola en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIWSGDYHPHRYRITYGETGGNS PVQEFTVPGEHETATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKADKYPP SINYRTEIDKPSQ
89	ADX_5274_E01 de longitud completa con P _m X _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLIWSGDYHPHRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGEHETATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKADKYPPISI NYRTP _m X _n
90	ADX_5274_E01 de longitud completa con P _m CX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLIWSGDYHPHRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGEHETATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKADKYPPISI NYRTP _m CX _n
91	ADC_5274_E01 central con modificación de P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0); también conocido como ADX_6561_A01 central	EVVAATPTSLLIWSGDYHPHRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGE HETATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKADKYPPISINYRTPC
92	ADX_5274_E01 de longitud completa con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)]	VSDVPRDLEVVAATPTSLLIWSGDYHPHRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGEHETATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKADKYPPISI NYRTPC
93	ADX_5274_E01 de longitud completa con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0) y marcador de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLIWSGDYHPHRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGEHETATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKADKYPPISI NYRTPCHHHHHH
94	ADX_5274_A01 de longitud completa con líder en N terminal, P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0) y marcador de His ₆	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIWSGDYHPHRYRITYGETGGNS PVQEFTVPGEHETATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKADKYPP SINYRTPCHHHHHH
95	ADX_5274_E01 de longitud completa con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLIWSGDYHPHRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGEHETATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKADKYPPISI NYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
96	ADX_5274_E01 de longitud completa con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLIWSGDYHPHRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGEHETATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKADKYPPISI NYRTPCPCPPPPC
97	ADX_5274_E01 de longitud completa con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0) y marca de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLIWSGDYHPHRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGEHETATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKADKYPPISI NYRTPCPCPPPPCHHHHHH
98	ADX_6077_A01 central	EVVAATPTSLLIWSGDYHPHRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGE HVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKAATDWSISINYRT
99	Bucle BC de ADX_6077_F02	SDDYHAHRY
100	Bucle DE de ADX_6077_F02	PGEHVT
101	Bucle FG de ADX_6077_F02	VTYDGEKAATDWS
102	ADX_6077_F02 de longitud completa	VSDVPRDLEVVAATPTSLLIWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKAATDWSISI NYRT
103	ADX_6077_F02 de longitud completa con cola C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLIWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKAATDWSISI NYRTEIEKPCQ
104	ADX_6077_F02 de longitud completa con líder en N terminal (G)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLIWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFTVPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDGEKAATDWSIS INYRT

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
105	ADX_6077_F02 de longitud completa con líder en N terminal (MG)	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDGEKAATDWSISINRYRT
106	ADX_6077_F02 núcleo con P _m X _n en C-terminal	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDGEKAATDWSISINRYRTP _m X _n
107	ADX_6077_F02 de longitud completa con P _m X _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDGEKAATDWSISINRYRTP _m X _n
108	ADX_6077_F02 de longitud completa con líder en N-terminal (G) y P _m X _n en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDGEKAATDWSISINRYRTP _m X _n
109	ADX_6077_F02 de longitud completa con líder en N-terminal (MG) y P _m X _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDGEKAATDWSISINRYRTP _m X _n
110	ADX_6077_F02 del núcleo con P _m CX _n en C-terminal	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDGEKAATDWSISINRYRTP _m CX _n
111	ADX_6077_F02 de longitud completa con P _m CX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDGEKAATDWSISINRYRTP _m CX _n
112	ADX_6077_F02 de longitud completa con líder en N-terminal (G) y P _m CX _n en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDGEKAATDWSISINRYRTP _m CX _n
113	ADX_6077_F02 de longitud completa con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDGEKAATDWSISINRYRTP _m CX _n
114	ADX_6077_F02 del núcleo con P _m CX _n C-terminal (m=1; n=0)	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDGEKAATDWSISINRYRTPC
115	ADX_6077_F02 de longitud completa con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	VSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDGEKAATDWSISINRYRTPC
116	ADX_6007_F02 de longitud completa con líder en N terminal (G) y modificación de P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	GVSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDGEKAATDWSISINRYRTPC
117	ADX_6077_F02 de longitud completa con líder en N-terminal (MG) y modificación P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDGEKAATDWSISINRYRTPC
118	ADX_6077_F02 de longitud completa con modificación de P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0) y marcador de His ₆	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDGEKAATDWSISINRYRTPCHHHHHH
119	ADX_6077_F02 del núcleo con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDGEKAATDWSISINRYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
120	ADX_6077_F02 de longitud completa con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	VSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDGEKAATDWSISINRYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
121	ADX_6077_F02 de longitud completa con líder en N-terminal (G) y P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDGEKAATDWSISINRYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
122	ADX_6077_F02 de longitud completa con líder en N-terminal (MG) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDGEKAATDWSISIN YRTP _{mCX_{n1}CX_{n2}}
123	ADX_6077_F02 del núcleo con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDGEKAATDWSISIN YRTPCPPPPC
124	ADX_6077_F02 de longitud completa con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5, n2=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDGEKAATDWSISIN YRTPCPPPPPC
125	ADX_6077_F02 de longitud completa con líder en N-terminal (G) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5, n2=0)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDGEKAATDWSISIN YRTPCPPPPPC
126	ADX_6077_F02 de longitud completa con líder en N terminal (MG) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5, n2=0)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDGEKAATDWSISIN YRTPCPPPPPC
127	ADX_6077_F02 de longitud completa con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5, n2=0) y marcado con His ₆	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDGEKAATDWSISIN YRTPCPPPPPCHHHHH
128	ADX_6977_F02 DG→EG núcleo mutante	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYEGEKAATDWSISIN YRT
129	ADX 6077 F02 DG→bucle FG de EG mutante	VTYE <u>GE</u> KAATDWS
130	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante	VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYEGEKAATDWSISIN YRT
131	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con líder en N-terminal (G)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYEGEKAATDWSISIN YRT
132	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con líder en N-terminal (MG)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYEGEKAATDWSISIN YRT
133	ADX_6077_F02 DG→núcleo de EG mutante con PmX _n en C-terminal	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYEGEKAATDWSISIN YRTP _{mX_n}
134	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con PmX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYEGEKAATDWSISIN YRTP _{mX_n}
135	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con líder en N-terminal (G) y PmX _n en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYEGEKAATDWSISIN YRTP _{mX_n}
136	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con líder en N-terminal (MG) y PmX _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYEGEKAATDWSISIN YRTP _{mX_n}
137	ADX_6077_F02 DG→núcleo de EG mutante con P _m CX _n en C-terminal	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYEGEKAATDWSISIN YRTP _{mCX_n}
138	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con PmCX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYEGEKAATDWSISIN YRTP _{mCX_n}

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
139	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con líder en N-terminal (G) y P _m CX _n en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYEGEKAATDWSIS INRTP _m CX _n
140	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYEGEKAATDWSI SINRTP _m CX _n
141	ADX_6077_F02 DG→núcleo del EG mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGE HVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYEGEKAATDWSISINRTPC
142	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYEGEKAATDWSISI NYRTPC
143	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con líder en N-terminal (G) y modificación de P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYEGEKAATDWSIS INRTPC
144	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con líder en N-terminal (MG) y modificación P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYEGEKAATDWSI SINRTPC
145	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0) y marcador de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYEGEKAATDWSISI NYRTPCHHHHHH
146	ADX_6077_F02 DG→núcleo de EG mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGE HVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYEGEKAATDWSISINRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
147	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYEGEKAATDWSISI NYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
148	ADX_6077_F02 DG→longitud de completa de EG mutante con líder en N-terminal (G) y P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYEGEKAATDWSIS INRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
149	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYEGEKAATDWSI SINRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
150	ADX_6077_F02 DG→núcleo de EG mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGE HVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYEGEKAATDWSISINRTPCPP PPPC
151	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYEGEKAATDWSISI NYRTPC P P P P P C
152	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con líder en N-terminal (G) y P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPMGGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYEGEKAATDWS ISINRTPC P P P P P C
153	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYEGEKAATDWSI SINRTPC P P P P P C

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
154	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de EG mutante con P _m CX _n 1CX _n 2 en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0) y marca de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYEGEKAATDWSIS I NYRTPC <i>PPPPPCHHHHH</i>
155	ADX_6077_F02 DG→núcleo de SG mutante	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGE HVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYEGEKAATDWSISINYRT
156	ADX_6077_F02 DG→Bucle de FG de mutante SG	VTYS <u>GE</u> KAATDWS
157	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSIS I INYRT
158	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con líder en N-terminal (G)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFTVPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSIS INYRT
159	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con líder en N-terminal (MG)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFTVPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWS I SINYRT
160	ADX_6077_F02 DG→núcleo de SG mutante con P _m X _n en C-terminal	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGE HVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSISINYRTP _m X _n
161	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con P _m X _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSIS I INYRTP _m X _n
162	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con líder en N-terminal (G) y P _m X _n en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFTVPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSIS INYRTP _m X _n
163	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m X _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFTVPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWS I SINYRTP _m X _n
164	ADX_6077_F02 DG→núcleo de SG mutante con P _m CX _n en C-terminal	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGE HVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSISINYRTP _m CX _n
165	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con P _m CX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSIS I NYRTP _m CX _n
166	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con líder en N-terminal (G) y P _m CX _n en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFTVPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSIS INYRTP _m CX _n
167	ADX_6077_F02 DG→SG de longitud completa con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFTVPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWS I SINYRTP _m CX _n
168	ADX_6077_F02 DG→núcleo de SG mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGE HVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSISINYRTPC
169	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSIS I NYRTPC
170	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con líder y P _m CX _n en N-terminal (m=1; n=0)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFTVPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSIS INYRTPC

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
171	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con líder en N-terminal (MG) y modificación PmCX _n en C-terminal (m=1; n=0)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSISINRYRTPC
172	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con PmCX _n en C-terminal (m=1; n=0) y marcador de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSISINRYRTPCHHHHHH
173	ADX_6077_F02 DG→núcleo de SG mutante con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSISINRYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
174	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSISINRYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
175	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con líder en N-terminal (G) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSISINRYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
176	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con líder en N-terminal (MG) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSISINRYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
177	ADX_6077_F02 DG→núcleo de SG mutante con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSISINRYRTPCPPPPC
178	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSISINRYRTPCPCPPPPC
179	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con líder en N-terminal (G) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSISINRYRTPCPCPPPPC
180	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con líder en N-terminal (MG), y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSISINRYRTPCPCPPPPC
181	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de SG mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0) y marca de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYSGEKAATDWSISINRYRTPCPCPPPPCHHHHHH
182	ADX_6077_F02 DG→núcleo de AG mutante	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYAGEKAATDWSISINRYRTP
183	ADX_6077_F02 DG→bucle FG de AG mutante	VTYAGEKAATDWS
184	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYAGEKAATDWSISINRYRTP
185	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con líder en N-terminal (G)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYAGEKAATDWSISINRYRTP
186	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con líder en N-terminal (MG)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYAGEKAATDWSISINRYRTP

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
187	ADX_6077_F02 DG→núcleo de mutante AG con PmX _n en C-terminal	LEVVAATPTSLLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYAGEKAATDWSISINRTP _{mX_n}
188	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con PmX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYAGEKAATDWSISINRTP _{mX_n}
189	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con líder en N-terminal (G) y PmX _n en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYAGEKAATDWSISINRTP _{mX_n}
190	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con líder en N-terminal (MG) y PmX _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYAGEKAATDWSISINRTP _{mX_n}
191	ADX_6077_F02 DG→núcleo de AG mutante con P _m CX _n en C-terminal	EVVAATPTSLLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYAGEKAATDWSISINRTP _{mCX_n}
192	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con PmCX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYAGEKAATDWSISINRTP _{mCX_n}
193	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con líder en N-terminal (G) y P _m CX _n en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYAGEKAATDWSISINRTP _{mCX_n}
194	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYAGEKAATDWSISINRTP _{mCX_n}
195	ADX_6077_F02 DG→núcleo de AG mutante con PmCX _n en C-terminal (m=1; n=0)	EVVAATPTSLLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYAGEKAATDWSISINRTPC
196	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con PmCX _n en C-terminal (m=1; n=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYAGEKAATDWSISINRTPC
197	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con líder en N-terminal (G) y modificación PmCX _n en C-terminal (m=1; n=0)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYAGEKAATDWSISINRTPC
198	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con líder en N-terminal (MG) y modificación PmCX _n en C-terminal (m=1; n=0)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYAGEKAATDWSISINRTPC
199	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con PmCX _n en C-terminal (m=1; n=0) y marcador de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYAGEKAATDWSISINRTPCHHHHHH
200	ADX_6077_F02 DG→núcleo de AG mutante con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	EVVAATPTSLLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYAGEKAATDWSISINRTP _{mCX_{n1}CX_{n2}}
201	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYAGEKAATDWSISINRTP _{mCX_{n1}CX_{n2}}
202	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con líder en N-terminal (G) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYAGEKAATDWSISINRTP _{mCX_{n1}CX_{n2}}

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
203	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYAGEKAATDWSISINYRTP _m CX _{n1} CX ₂
204	ADX_6077_F02 DG→núcleo de AG mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYAGEKAATDWSISINYRTPCPPPPPC
205	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYAGEKAATDWSISINYRTPCPPPPPPC
206	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con líder en N-terminal (G) y P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5, n2=0)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYAGEKAATDWSISINYRTPCPPPPPPC
207	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de AG mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5, n2=0)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYAGEKAATDWSISINYRTPCPPPPPPC
208	ADX_6077_F02 AG→longitud completa de AG mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0) y marca de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYAGEKAATDWSISINYRTPCPPPPPPCHHHHHH
209	ADX_6077_F02 DG→núcleo de GG mutante	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYGGEKAATDWSISINYRT
210	ADX_6077_F02 DG→bucle FG de GG mutante	TYGGEKAATDWS
211	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante	VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYGGEKAATDWSISINYRT
212	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante con líder en N-terminal (G)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYGGEKAATDWSISINYRT
213	ADX_6077_F02 DG→GG mutante de longitud completa con líder en N-terminal (MG)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYGGEKAATDWSISINYRT
214	ADX_6077_F02 DG→núcleo de GG mutante con P _m X _n en C-terminal	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYGGEKAATDWSISINYRTP _m X _n
215	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante con P _m X _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYGGEKAATDWSISINYRTP _m X _n
216	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante con líder en N-terminal (G) y P _m X _n en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYGGEKAATDWSISINYRTP _m X _n
217	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m X _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYGGEKAATDWSISINYRTP _m X _n
218	ADX_6077_F02 DG→núcleo de GG mutante con P _m CX _n en C-terminal	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYGGEKAATDWSISINYRTP _m CX _n

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
219	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante con P _m CX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYGGEKAATDWSISIN YRTP _m CX _n
220	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante con líder en N-terminal (G) y P _m CX _n en C-terminal	MVSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYGGEKAATDWSISIN YRTP _m CX _n
221	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYGGEKAATDWSISIN YRTP _m CX _n
222	ADX_6077_F02 DG→núcleo de GG mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYGGEKAATDWSISIN YRTPC
223	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	VSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYGGEKAATDWSISIN YRTPC
224	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante con líder en N-terminal (G) y P _m CX _n en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYGGEKAATDWSISIN YRTPC
225	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYGGEKAATDWSISIN YRTPC
226	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0) y marcador de His ₆	VSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYGGEKAATDWSISIN YRTPCHHHHHH
227	ADX_6077_F02 DG→núcleo de GG mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYGGEKAATDWSISIN YRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
228	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante con P _m CX _{n1} CX ₂ en C-terminal	VSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYGGEKAATDWSISIN YRTP _m CX _{n1} CX ₂
229	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante con líder en N-terminal (G) y P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYGGEKAATDWSISIN YRTP _m CX _{n1} CX ₂
230	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYGGEKAATDWSISIN YRTP _m CX _{n1} CX ₂
231	ADX_6077_F02 DG→núcleo de GG mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} e C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYGGEKAATDWSISIN YRTPCPPPPC
232	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	VSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYGGEKAATDWSISIN YRTPCPPPPPC
233	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante con líder en N-terminal (G) y P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5, n2=0)	GVSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYGGEKAATDWSISIN YRTPCPPPPPC

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
234	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _n ₁ CX _n ₂ en C-terminal (m=1; n ₁ =5, n ₂ =0)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYGGEKAATDWSI SINYRTPCPPPPPC
235	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de GG mutante con P _m CX _n ₁ CX _n ₂ en C-terminal (m=1; n ₁ =5; n ₂ =0) y marca de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYGGEKAATDWSISI NYRTPCPPPPPCHHHHH
236	ADX_6677_F02 DG→núcleo de DS mutante	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGE HVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSISINYRT
237	ADX_6077_F02 DG→bucle FG de DS mutante	VTYDSEKAATDWS
238	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSISI NYRT
239	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con líder en N-terminal (G)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSIS INYRT
240	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con líder en N-terminal (MG)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSI SINYRT
241	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DS mutante con P _m X _n en C-terminal	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGE HVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSISINYRTP _m X _n
242	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con P _m X _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSISI NYRTP _m X _n
243	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con líder en N-terminal (G) con P _m X _n en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSIS INYRTP _m X _n
244	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m X _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSI SINYRTP _m X _n
245	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DS mutante con P _m CX _n en C-terminal	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGE HVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSISINYRTP _m CX _n
246	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con P _m CX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSISI NYRTP _m CX _n
247	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con líder en N-terminal (G) y P _m CX _n en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSIS INYRTP _m CX _n
248	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSI SINYRTP _m CX _n
249	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DS mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGE HVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSISINYRTPC
250	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSISI NYRTPC

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
251	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con líder en N-terminal (G) y modificación PmCXn en C-terminal (m=1; n=0)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSIS INRYRTPC
252	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con líder en N-terminal (MG) y modificación PmCXn en C-terminal (m=1; n=0)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSI SINRYRTPC
253	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con PmCXn en C-terminal (m=1; n=0) y marcador de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSISI NYRTPCHHHHHH
254	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DS mutante con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGE HVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSISINRYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
255	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con P _m CX _{n1} CX ₂ en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSISI NYRTP _m CX _{n1} CX ₂
256	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con líder en N-terminal (G) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSIS INRYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
257	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con líder en N-terminal (MG) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSI SINRYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
258	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DS mutante con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGE HVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSISINRYRTPC PPPPC
259	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSISI NYRTPC PPPPPC
260	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con líder en N-terminal (G) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5, n2=0)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSIS INRYRTPC PPPPPC
261	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con líder en N-terminal (MG) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5, n2=0)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSI SINRYRTPC PPPPPC
262	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DS mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0) y marca de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDSEKAATDWSISI NYRTPC PPPPPC CHHHHHH
263	ADX_6Q77_F02 DG→DA mutante	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGE HVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDAEKAATDWSISINRYRTPC
264	ADX_6077_F02 DG→Bucle FG de DA mutante	VTYDAEKAATDWS
265	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDAEKAATDWSISI INRYRTPC
266	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con líder en N-terminal (G)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITITVYAVTYDAEKAATDWSIS INRYRTPC

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
267	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con líder en N-terminal (MG)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDAEKAATDWSISINRYRT
268	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DA mutante con P _m X _n en C-terminal	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDAEKAATDWSISINRYRTP _m X _n
269	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con P _m X _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDAEKAATDWSISINRYRTP _m X _n
270	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con líder en N-terminal (G) con P _m X _n en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDAEKAATDWSISINRYRTP _m X _n
271	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m X _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDAEKAATDWSISINRYRTP _m X _n
272	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DA mutante con P _m CX _n en C-terminal	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDAEKAATDWSISINRYRTP _m CX _n
273	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con P _m CX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDAEKAATDWSISINRYRTP _m CX _n
274	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con líder en N-terminal (G) y P _m CX _n en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDAEKAATDWSISINRYRTP _m CX _n
275	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDAEKAATDWSISINRYRTP _m CX _n
276	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DA mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDAEKAATDWSISINRYRTPC
277	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDAEKAATDWSISINRYRTPC
278	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con líder en N-terminal y modificación P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDAEKAATDWSISINRYRTPC
279	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con líder en N-terminal (MG) y modificación P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDAEKAATDWSISINRYRTPC
280	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0) y marcador de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDAEKAATDWSISINRYRTPCHHHHHH
281	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DA mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	EVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDAEKAATDWSISINRYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
282	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDAEKAATDWSISINRYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
283	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con líder en N-terminal (G) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDAEKAATDWSIS INRTP _m CX _{n1} CX ₂
284	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con líder en N-terminal (MG) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDAEKAATDWSI SINRTP _m CX _{n1} CX ₂
285	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DA mutante con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGE HVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDAEKAATDWSISINRTPC PPPC
286	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDAEKAATDWSISI NYRTPC PPPPPC
287	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con líder en N-terminal (G) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5, n2=0)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDAEKAATDWSIS INRTPC PPPPPC
288	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con líder en N-terminal (MG) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5, n2=0)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDAEKAATDWSI SINRTPC PPPPPC
289	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DA mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0) y marca de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDAEKAATDWSISI NYRTPC PPPPPC HHHHHH
290	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DL mutante	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGE HVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISINRTP C PPPPPC
291	ADX_6077_F02 DG→bucle FG de DL mutante	VTYDLEKAATDWS
292	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISI NYRT
293	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con líder en N-terminal (G)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSIS INRTP
294	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con líder en N-terminal (MG)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSI SINRTP
295	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DL mutante con PmX _n en C-terminal	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGE HVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISINRTP _m X _n
296	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con PmX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISI NYRTP _m X _n
297	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con líder en N-terminal (G) con PmX _n en C-terminal	MVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSIS INRTP _m X _n
298	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con líder en N-terminal (MG) y PmX _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSI SINRTP _m X _n
299	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DL mutante con P _m CX _n en C-terminal	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGE HVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISINRTP _m CX _n

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
300	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con P _m CX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISIN YRTP _m CX _n
301	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con líder en N-terminal (G) y P _m CX _n en C-terminal	MVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISIN YRTP _m CX _n
302	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISIN YRTP _m CX _n
303	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DL mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISIN YRTPC
304	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISIN YRTPC
305	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con líder en N-terminal y modificación P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISIN YRTPC
306	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con líder en N-terminal (MG) y modificación P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISIN YRTPC
307	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0) y marcador de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISIN YRTPCHHHHHH
308	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DL mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISIN YRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
309	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISIN YRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
310	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con líder en N-terminal (G) y P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISIN YRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
311	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISIN YRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
312	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DL mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISIN YRTPCPPPPC
313	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISIN YRTPCPPPPPPC
314	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con líder en N-terminal (G) y P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDLEKAATDWSISIN YRTPCPPPPPPC

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
315	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5, n2=0)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDLEKAATDWSISINRYRTPCFFFFPC
316	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DL mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0) y marca de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDLEKAATDWSISINRYRTPCFFFFPCHHHHHH
317	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DV mutante	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDVEKAATDWSISINRYRTPC
318	ADX_6077_F02 DG→bucle FG de DV mutante	VTYDVEKAATDWS
319	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDVEKAATDWSISINRYRTPC
320	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con líder en N-terminal (G)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDVEKAATDWSISINRYRTPC
321	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con líder en N-terminal (MG)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDVEKAATDWSISINRYRTPC
322	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DV mutante con P _m X _n en C-terminal	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDVEKAATDWSISINRYRTP _m X _n
323	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con P _m X _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDVEKAATDWSISINRYRTP _m X _n
324	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con líder en N-terminal (G) y P _m CX _n en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDVEKAATDWSISINRYRTP _m X _n
325	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m X _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDVEKAATDWSISINRYRTP _m X _n
326	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DV mutante con P _m CX _n en C-terminal	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDVEKAATDWSISINRYRTP _m CX _n
327	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DB mutante con P _m CX _n en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDVEKAATDWSISINRYRTP _m CX _n
328	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con líder en N-terminal (G) y P _m CX _n en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDVEKAATDWSISINRYRTP _m CX _n
329	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con líder en N-terminal (MG) y P _m CX _n en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDVEKAATDWSISINRYRTP _m CX _n
330	ADX_6077_F02 DG→núcleo del DV mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDVEKAATDWSISINRYRTPC
331	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con P _m CX _n en C-terminal (m=1; n=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYITIVYAVTYDVEKAATDWSISINRYRTPC

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
332	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con líder en N-terminal (G) y modificación PmCXn en C-terminal (m=1; n=0)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDVEKAATDWSIS INRYRTPC
333	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con líder en N-terminal (MG) y modificación PmCXn en C-terminal (m=1; n=0)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDVEKAATDWSI SINRYRTPC
334	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con PmCXn en C-terminal (m=1; n=0) y marcador de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDVEKAATDWSISI NYRTPCHHHHHH
335	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DV mutante con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGE HVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDVEKAATDWSISINRYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
336	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDVEKAATDWSISI NYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
337	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con líder en N-terminal (G) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDVEKAATDWSIS INRYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
338	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con líder en N-terminal (MG) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDVEKAATDWSI SINRYRTP _m CX _{n1} CX _{n2}
339	ADX_6077_F02 DG→núcleo de DV mutante con PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	EVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPVQEFVTPGE HVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDVEKAATDWSISINRYRTPC PPPPC
340	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDVEKAATDWSISI NYRTPC PPPPPC
341	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con líder en N-terminal (G) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5, n2=0)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSP VQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDVEKAATDWSIS INRYRTPC PPPPPC
342	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con líder en N-terminal (MG) y PmCX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5, n2=0)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNS PVQEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDVEKAATDWSI SINRYRTPC PPPPPC
343	ADX_6077_F02 DG→longitud completa de DV mutante con P _m CX _{n1} CX _{n2} en C-terminal (m=1; n1=5; n2=0) y marca de His ₆	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSDDYHAHRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGEHVTATISGLKPGVDYTTITVYAVTYDVEKAATDWSISI NYRTPC PPPPPC CHHHHHH

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
344	GPC3 humano	MAGTVRTACLVVAMLLSLDFPGQAQPPPPPPDATCHQVRSFFQRL QPGLKWVPETPVPGSDLQVCLPKGPTCCSRKMEEKYQLTARLNME QLLQSASMELKFLIIQNAAVFQEAFEIVVRHAKNYTNAMFKNNYP SLTPQAFEFVGEFFTDVSLYILGSDINVDDMVNELFDSLFPVIYT QLMNPGLPDSALDINECLRGARRDLKVFGNFPKLIQTQVSKSLQV TRIFLQALNLGIEVINTTDHLKFSKDCGRMLTRMWYCSYCQLMM VKPCGGYCNVVMQGCMAGVVEIDKYWREYILSLEELVNGMYRIYD MENVLLGLFSTIHDSIQYVQKNAGKLTITIGKLCASQQRQYRSA YYPEDLFDKVKLVKVAHVEHEETLSSRRRELIQKLSFISFYALS PGYICSHSPAENDTLCWNGQELVERYSQKAARNGMKNQFNHLEL KMKGPEPVVSQIIDKCLKHINQLLRTMSMPKGRVLDKNLDEEGFES GDCGDEDECEIGSGDGMIVKKNQLRFLAELAYDLVDVDDAPGNSQ QATPKDNEISTFHNLGNVHSPKLLTSMASVVCFFFLVH
345	Región 1 de unión a adnectina de GPC3 humano	HQVSFF
346	Región 2 de unión a adnectina de CPC3 humano	EQLLQSASM
347	ADX_6093_A01 núcleo (control de no unión)	sEVVAATPTSLLLISW DAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFVPG SKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGRGESPASSKPI SINRYT
348	ADX_6093_A01 de longitud completa con N-líder, modificación PmCXn en C-terminal (m=1; n=0), y marca de His ₆	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNS PVQEFVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGRGESPASSKPI SINRYT <i>PCHHHHH</i>
349	ADX_6093_A01 de longitud completa con N-líder, modificación PmCXn en C-terminal (m=1; n=0)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSP VQEFVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGRGESPASSKPI INRYT <i>PC</i>
350	ADX_6093_A01 de longitud completa con N-líder, modificación PmCXn en C-terminal (m=1; n=7), y marca de His ₆	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNS PVQEFVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGRGESPASSKPI SINRYT <i>PCPPPPCHHHHH</i>
351	Líder en N-terminal	MGVSDVPRD
352	Líder en N-terminal	GVSDVPRD
353	Líder en N-terminal	X _n SDVPRD
354	Líder en N-terminal	X _n DVPRD
355	Líder en N-terminal	X _n VPRD
356	Líder en N-terminal	X _n PRD
357	Líder en N-terminal	X _n RD
358	Líder en N-terminal	X _n D
359	Líder en N-terminal	MASTSG
360	Cola en C-terminal	EIEK
361	Cola en C-terminal	EGSGC
362	Cola en C-terminal	EIEKPCQ
363	Cola en C-terminal	EIEKPSQ
364	Cola en C-terminal	EIEKP
365	Cola en C-terminal	EIEKPS
366	Cola en C-terminal	EIEKPC
367	Cola en C-terminal	EIDK
368	Cola en C-terminal	EIDKPCQ
369	Cola en C-terminal	EIDKPSQ
370	Cola de 6X His	HHHHHH

ES 2 809 125 T3

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
371	Cola en C-terminal	EIEPKSS
372	Cola en C-terminal	EIDKPC
373	Cola en C-terminal	EIDKP
374	Cola en C-terminal	EIDKPS
375	Cola en C-terminal	EIDKPSQLE
376	Cola en C-terminal	EIEDEDEDEDED
377	Cola en C-terminal	EGSGS
378	Cola en C-terminal	EIDKPCQLE
379	Cola en C-terminal	EIDKPSQHMMMMH
380	Cola en C-terminal	GSGCHMMMMH
381	Cola en C-terminal	EGSGCHMMMMH
382	Cola en C-terminal	PIDK
383	Cola en C-terminal	PIEK
384	Cola en C-terminal	PIDKP
385	Cola en C-terminal	PIEKP
386	Cola en C-terminal	PIDKPS
387	Cola en C-terminal	PIEKPS
388	Cola en C-terminal	PIDKPC
389	Cola en C-terminal	PIEKPC
390	Cola en C-terminal	PIDKPSQ
391	Cola en C-terminal	PIEKPSQ
392	Cola en C-terminal	PIDKPCQ
393	Cola en C-terminal	PIEKPCQ
394	Cola en C-terminal	PHMMMMH
395	Cola en C-terminal	PCHMMMMH
396	Cola en C-terminal	PPID
397	Cola en C-terminal	PPIE
398	Cola en C-terminal	PPIDK
399	Cola en C-terminal	PPIEK
400	Cola en C-terminal	PPIDKP
401	Cola en C-terminal	PPIEKP
402	Cola en C-terminal	PPIDKPS
403	Cola en C-terminal	PPIEKPS
404	Cola en C-terminal	PPIDKPC
405	Cola en C-terminal	PPIEKPC
406	Cola en C-terminal	PPIDKPSQ
407	Cola en C-terminal	PPIEKPSQ
408	Cola en C-terminal	PPIDKPCQ
409	Cola en C-terminal	PPIEKPCQ
410	Cola en C-terminal	PPHHMMMMH
411	Cola en C-terminal	PPCHMMMMH
412	Cola en C-terminal	PCGC
413	Cola en C-terminal	PCPC
414	Cola en C-terminal	PCGSGC
415	Cola en C-terminal	PCPPPC

ES 2 809 125 T3

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
453	ADX_4578_H08	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCC ACCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTGGTTACGACTACGGT GACTCTTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGC CCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGACGGTCTAACACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTAT GCTGTCGAAGCTTACGGTAAAGGTTACACTCGTTACACTCCAATT TCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGTAA
454	ADX_4578_B06	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACTTGGAAAGTGGTTGCCGCC ACCCCCACCAGCCTGCTGATCTCTTGGTTCCCGGACCGTTACGTT TACTACATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCAGTGTGGAAGGTCATAAACAGACTGCTTACATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTACGTATCTAC TACTACCCGGACGACTTCCAGGGTTACCCGCAGCCGATTTCTATT AATTACCGCACAGAAGGCAGCGGTTCCCTAA
455	ADX_4606_F06	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCC ACCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGAACCTGGTCACTTCTGGT CAGTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTCGTTACGGTTACACAGCTACCATC AGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT GTCGCTCATTTCTGAAGCTTCTGCTCCAATTTCCATTAATTACCGC ACAGAAATTGACAAACCATCCCAGTAA
456	ADX_5273_C01	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCC ACCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTGACCCGTACGAAGAA GAACGATATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGC CCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGCTTTCCATACTACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTAT GCTGTCACTTACAAACATAAATACGCTTACTACTACCCGCCAATT TCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGTAA
457	ADX_5273_D01	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCC ACCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAACCGTCTTACAAAGAC GACCGATATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGC CCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTTCTTTCCATCAGACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTAT GCTGTCACTTACGAACCGGACGAATACTACTTCTACTACCCAATT TCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGTAA
458	ADX_5274_E01	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCC ACCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTGGTGACTACCATCCG CATCGATATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGC CCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTGAACATGAAACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTAT GCTGTCACTTACGACGGTGAAAAAGCTGACAAATACCCGCCAATT TCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGTAA
459	ADX_6077_F02	ATGGGAGTTT CTGATGTGCC GCGCGACCTG GAAGTGGTTG CTGCCACCCC CACCAGCCTG CTGATCAGCT GGTCTGATGA CTACCATGCG CATCGATATT ACCGCATCAC TTACGGCGGAA ACAGGAGGCA ATAGCCCTGT CCAGGAGTTC ACTGTGCCTG GTGAACATGT GACAGCTACC ATCAGCGGCC TAAACCTGG CGTTGATTAT ACCATCACTG TGTATGCTGT CACTTACGAC GGTGAAGAGG CTGCCACAGA TTGGTCAATT TCCATTAATT ACCGCACACC GTGCCACCAT CACCACCACC ACTGA

(continuación)

SEQ ID	Descripción	SECUENCIA
460	ADX_6077_F02 sin marca de His e incluyendo secuencia líder	GGTGTT AGTGATGTTG CGCGTGATCT GGAAGTTGTT GCAGCAACCC CGACCAGCCT GCTGATTAGC TGGTCAGATG ATTATCATGC CCATCGTTAT TATCGCATTAC CCTATGGTGA AACCGGTGGT AATAGTCCGG TTCAAGAATT CACCGTTCCG GGTGAACATG TTACCGCAAC CATTAGCGGT CTGAAACCGG GTGTTGATTA CACCATTACC GTTTATGCAG TTACCTACGA TGGTGAAAAA GCAGCAACCG ATTGGAGCAT TAGCATTAA TATCGTACCC CGTGTTAA
461	ADX_6077_F02 con secuencia líder y PCPPPPPC	ATGAAAAAAATC TGGCTGGCAC TGGCAGGTCT GGTTCCTGGCA TTTAGCGCTA GCGCCGGTGT TAGTGATGTT CCGCGTGATC TGGAAGTTGT TGCAGCAACC CCGACCAGCC TGCTGATTAG CTGGTCAGAT GATTATCATG CCCATCGTTA TTATCGCATT ACCTATGGTG AAACCGGTGG TAATAGTCCG GTTCAAGAAT TCACCGTCC GGGTGAACAT GTTACCGCAA CCATTAGCGG TCTGAAACCG GGTGTTGATT ACACCATTAC CGTTTATGCA GTTACCTACG ATGGTGAAAA AGCAGCAACC GATTGGAGCA TTAGCATTAA CTATCGTACC CCGTGTCCGC CGCCACCGCC GTGTTGATAA
462	ADX_6077_F02 con secuencia líder y PCPPPPCH6	ATGGGAGTTT CTGATGTGCC GCGCGACCTG GAAGTGGTTG CTGCCACCCC CACCAGCCTG CTGATCAGCT GGTCTGATGA CTACCATGCG CATCGATATT ACCGCATCAC TTACGGCGAA ACAGGAGGCA ATAGCCCTGT CCAGGAGTTC ACTGTGCCTG GTGAACATGT GACAGCTACC ATCAGCGGCC TAAACCTGG CGTTGATTAT ACCATCACTG TGTATGCTGT CACTTACGAC GGTGA AAAAGG CTGCCACAGA TTGGTCAATT TCCATTAATT ACCGCACACC GTGCCCGCCG CCACCGCCGT GTCACCATCA CCACCACCAC TGA
463	ADX_6093_A01 longitud completa	VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPV QEFVTPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGRGESPASSKPI SI NYRT
464	Enlazador	(GS) ₅₋₁₀
465	Enlazador	(G ₄ S) ₂₋₅
466	Enlazador	(G ₄ S) ₂ G
467	Enlazador	PVGVV

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende un décimo dominio de fibronectina humana de tipo III (¹⁰Fn3) que comprende los bucles BC, DE y FG, en donde el polipéptido se une específicamente al glipicano-3 humano (GPC3) con una K_D de 1 μM o menos, y en donde
- 5
- (a) los bucles BC, DE y FG comprenden las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente;
 - (b) los bucles BC, DE y FG comprenden las SEQ ID NO: 19, 20 y 21, respectivamente;
 - (c) los bucles BC, DE y FG comprenden las SEQ ID NO: 32, 33 y 34, respectivamente;
 - 10 (d) los bucles BC, DE y FG comprenden las SEQ ID NO: 45, 46 y 47, respectivamente;
 - (e) los bucles BC, DE y FG comprenden las SEQ ID NO: 58, 59 y 60, respectivamente;
 - (f) los bucles BC, DE y FG comprenden las SEQ ID NO: 71, 72 y 73, respectivamente;
 - (g) los bucles BC, DE y FG comprenden las SEQ ID NO: 84, 85 y 86, respectivamente; o
 - 15 (h) los bucles BC, DE y FG comprenden las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente.
2. Un polipéptido que comprende un décimo dominio de fibronectina humana de tipo III (¹⁰Fn3), en donde el polipéptido se une específicamente al glipicano-3 humano (GPC3) con una K_D de 1 μM o menos, en donde el dominio humano ¹⁰Fn3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3 y en donde los bucles BC, DE y FG representados por (X)v, (X)x y (X)z, respectivamente, y comprenden
- 20
- (a) los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 129, respectivamente;
 - (b) los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 156, respectivamente;
 - 25 (c) los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 183, respectivamente;
 - (d) los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 210, respectivamente;
 - 30 (e) los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 237, respectivamente;
 - (f) los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 264, respectivamente;
 - (g) los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 291, respectivamente; o
 - 35 (h) los bucles BC, DE y FG que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 318, respectivamente.
3. El polipéptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el dominio ¹⁰Fn3 humano comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 18, 31, 44, 57, 70, 83, 98, 128, 155, 182, 209, 236, 263, 290 y 317.
- 40
4. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el dominio ¹⁰Fn3 humano comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 18, 31, 44, 57, 70, 83, 98, 128, 155, 182, 209, 236, 263, 290 y 317.
- 45
5. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el dominio ¹⁰Fn3 humano comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 98 y 102-127.
- 50
6. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el dominio ¹⁰Fn3 humano comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 263 y 265-289.
7. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además una proteína heteróloga.
8. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además uno o más restos farmacocinéticos (PK) seleccionados del grupo que consiste en polietilenglicol, ácido siálico, Fc, fragmento de Fc, transferrina, albúmina sérica, una proteína de unión a la seroalbúmina y una proteína de unión a la inmunoglobulina sérica.
- 55
9. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el extremo C del dominio ¹⁰Fn3 humano está unido a un resto que consiste en la secuencia de aminoácidos P_mX_n, en la que 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, preferentemente en donde m es 1 o 2, y n es un número entero de 1-10.
- 60
10. El polipéptido de la reivindicación 9, en el que el resto unido al extremo C del dominio ¹⁰Fn3 humano comprende cisteína, preferentemente en donde el resto consiste en la secuencia de aminoácidos P_mCX_n, en donde C es una cisteína, y cada X es independientemente cualquier aminoácido.
- 65

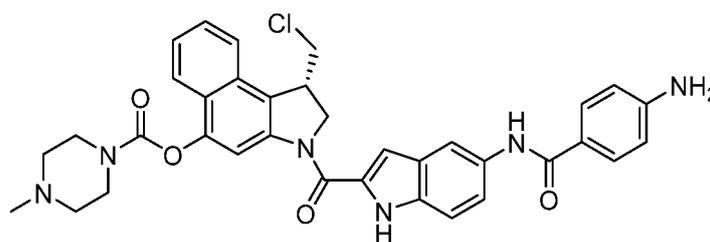
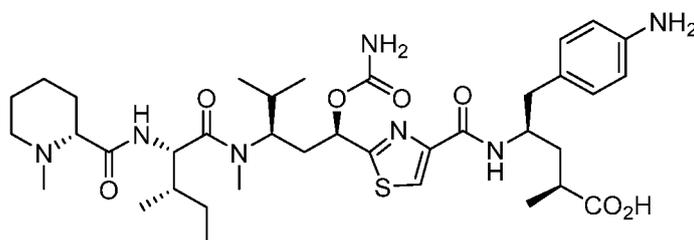
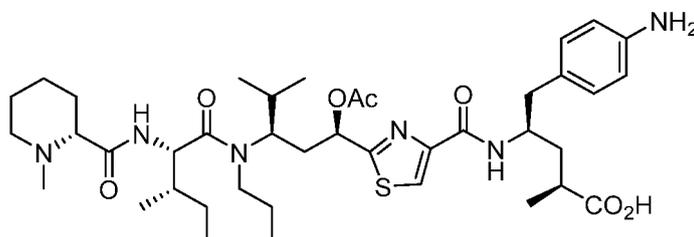
11. El polipéptido de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que la cisteína en el resto en C-terminal está conjugado con un resto heterólogo.

5 12. El polipéptido de la reivindicación 11, en el que el resto heterólogo es un resto detectable, o el resto heterólogo es un resto de fármaco, en donde el dominio ¹⁰Fn3 humano y el resto de fármaco forman un conjugado de fármaco-FBS.

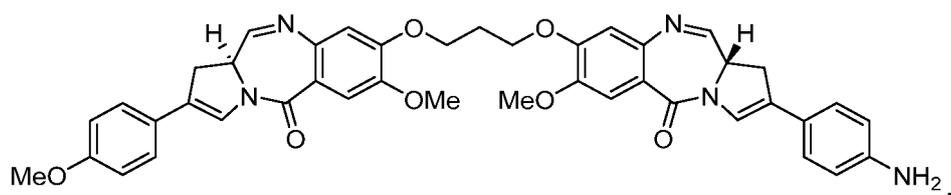
13. El conjugado FBS-fármaco de la reivindicación 12, en el que el resto heterólogo es un resto de fármaco conjugado al dominio ¹⁰Fn3 humano por una hidrazona, tioéter, éster, enlazador que contiene disulfuro o péptido, preferentemente un enlazador de peptidilo seleccionado del grupo que consiste en Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 467), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser o Glu.

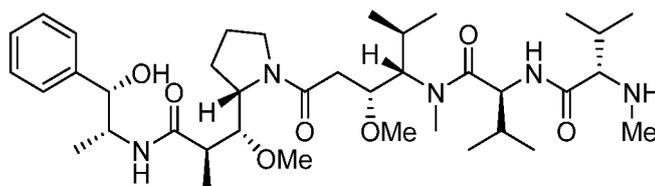
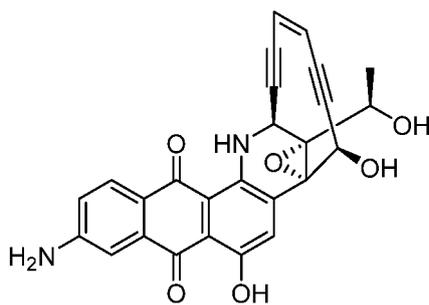
14. El conjugado FBS-fármaco de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde el resto de fármaco es un fármaco citotóxico, preferentemente un fármaco citotóxico seleccionado del grupo que consiste en enediinas tales como caliqueamicina y uncialamicina; tubulinas; alquilantes de ADN tales como análogos de CC-1065 y duocarmicina; epotilonas; auristatinas; dímeros de pirrolobenzodiazepina (PBD); (g) maitansinoides tales como DM1 y DM4; y análogos y derivados de los mismos.

15 20 15. El conjugado FBS-fármaco de la reivindicación 14, en el que el resto de fármaco es:

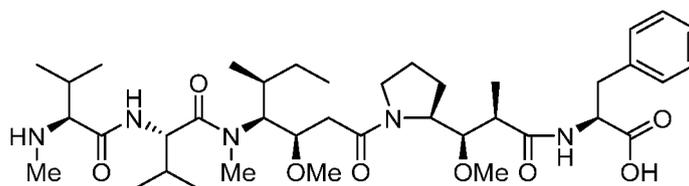


25



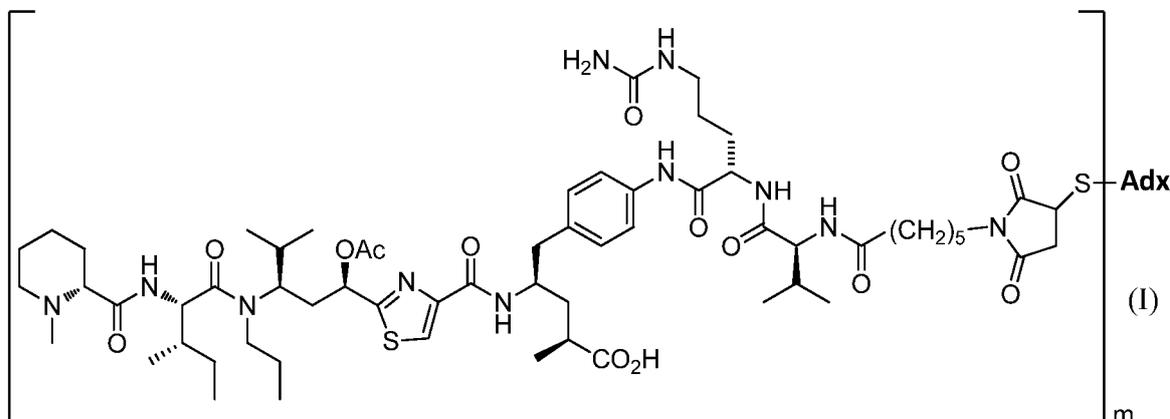


5 o



10

16. El conjugado FBS-fármaco de la reivindicación 13, que tiene una estructura representada por la fórmula (I)



15

en la que m es 1, 2, 3 o 4 y Adx es el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, y en la que el átomo de azufre que está unido a Adx es un átomo de azufre de un grupo sulfhidrilo de una cisteína del polipéptido.

20

17. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, o el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 11-16.

25

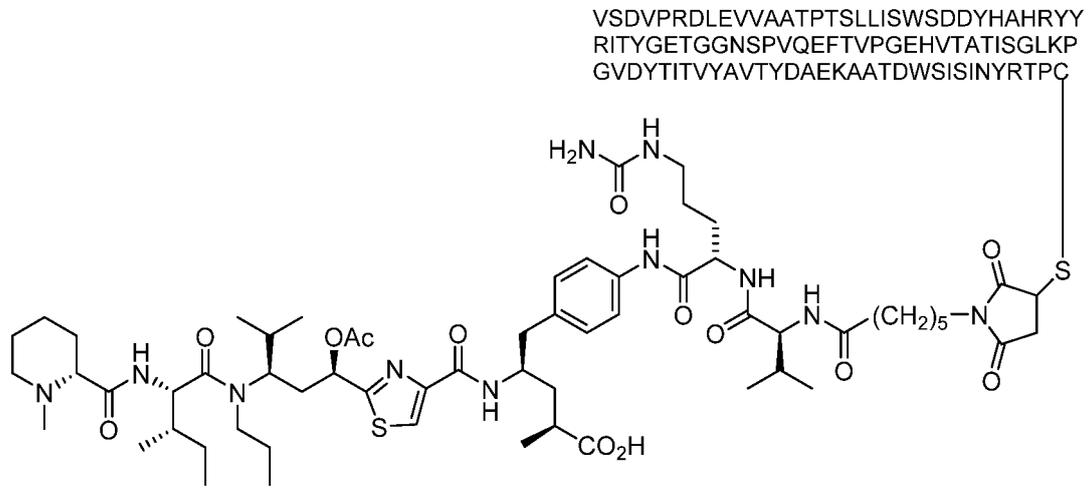
18. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

19. La composición farmacéutica de la reivindicación 17 para su uso en un método para atenuar o inhibir una enfermedad o un trastorno de glipicano-3 en un sujeto, en donde la enfermedad o el trastorno de glipicano-3 es cáncer, preferentemente en donde el cáncer es carcinoma hepatocelular, melanoma, tumor de Wilm, hepatoblastoma, cáncer de ovarios o cáncer de pulmón escamoso.

30

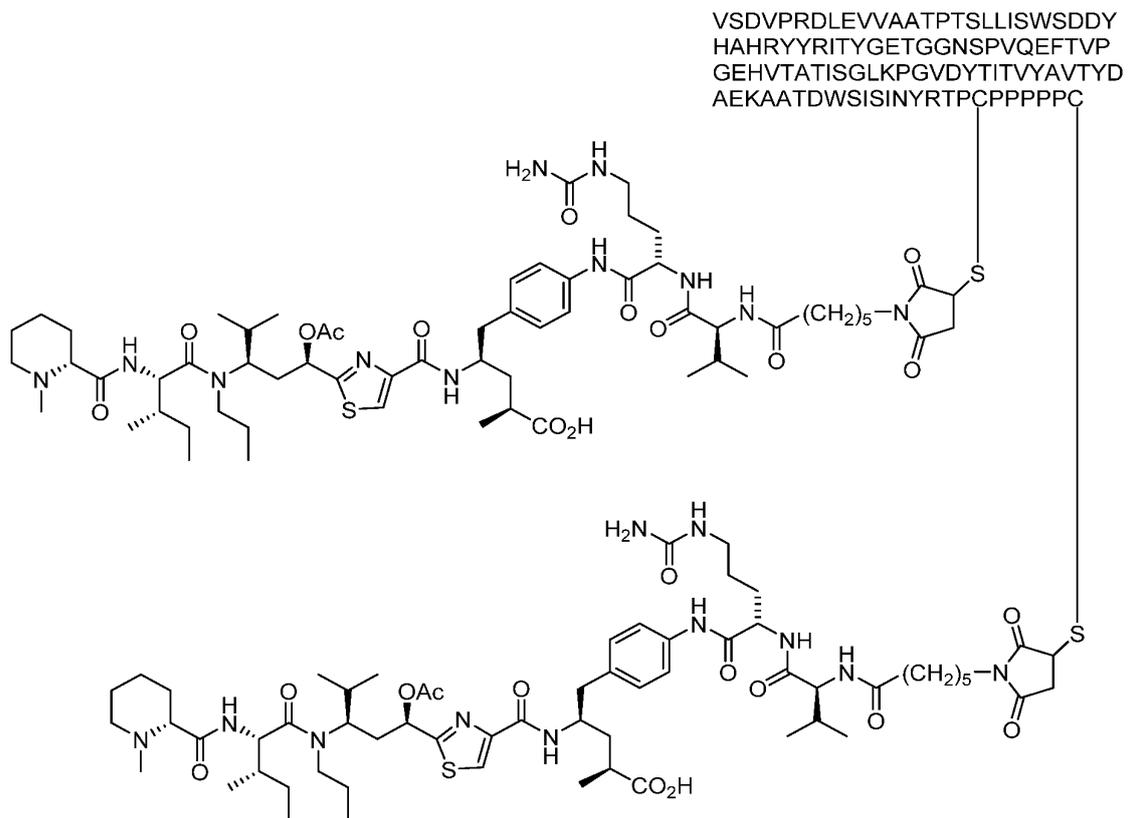
21. El conjugado FBS-fármaco de la reivindicación 13, que tiene una estructura representada por la fórmula (VI)

(VI)



- 5 en la que el átomo de azufre unido a la cisteína es el átomo de azufre del grupo sulfhidrilo de la cisteína, o que tiene una estructura representada por la fórmula (VII):

(VII)



- 10 en la que el átomo de azufre unido a las cisteínas es el átomo de azufre del grupo sulfhidrilo de las cisteínas.

SEQ ID NO:3	AB (X) _u	BC (X) _v	CD (X) _w	DE (X) _x	EF (X) _y	FG (X) _z					
WT	VSDVPRDLEWAA	LLISW	YRITY	GETGNSPVQE	FTV	PGSKST	ATISGL	ATISGL	YTIIVYA	VTGRGSPASSKP	ISINYRT
4578F03	VSDVPRDLEWAA	LLISW	YRITY	GETGNSPVQE	FTV	PGSKST	ATISGL	ATISGL	YTIIVYA	VTGRGSPASSKP	ISINYRT
4578H08	VSDVPRDLEWAA	LLISW	YRITY	GETGNSPVQE	FTV	PGSKST	ATISGL	ATISGL	YTIIVYA	VAPEIEKYYQ	IWINYRT
4578B06	VSDVPRDLEWAA	LLISW	YRITY	GETGNSPVQE	FTV	PGSKST	ATISGL	ATISGL	YTIIVYA	VEAYGKYTRYTP	ISINYRT
4606F06	VSDVPRDLEWAA	LLISW	YRITY	GETGNSPVQE	FTV	PGSKST	ATISGL	ATISGL	YTIIVYA	VAHSEASAP	ISINYRT
5273C01	VSDVPRDLEWAA	LLISW	YRITY	GETGNSPVQE	FTV	PGSKST	ATISGL	ATISGL	YTIIVYA	VTYKHAYYPP	ISINYRT
5273D01	VSDVPRDLEWAA	LLISW	YRITY	GETGNSPVQE	FTV	PGSKST	ATISGL	ATISGL	YTIIVYA	VTYEPDEYFYPP	ISINYRT
5274E01	VSDVPRDLEWAA	LLISW	YRITY	GETGNSPVQE	FTV	PGSKST	ATISGL	ATISGL	YTIIVYA	VTYDGEKADKYP	ISINYRT
6561A01	VSDVPRDLEWAA	LLISW	YRITY	GETGNSPVQE	FTV	PGSKST	ATISGL	ATISGL	YTIIVYA	VTYDGEKADKYP	ISINYRT
6077F02	VSDVPRDLEWAA	LLISW	YRITY	GETGNSPVQE	FTV	PGSKST	ATISGL	ATISGL	YTIIVYA	VTYDGEKAAIDWS	ISINYRT
6093A01	VSDVPRDLEWAA	LLISW	YRITY	GETGNSPVQE	FTV	PGSKST	ATISGL	ATISGL	YTIIVYA	VTGRGSPASSKP	ISINYRT

FIG. 1

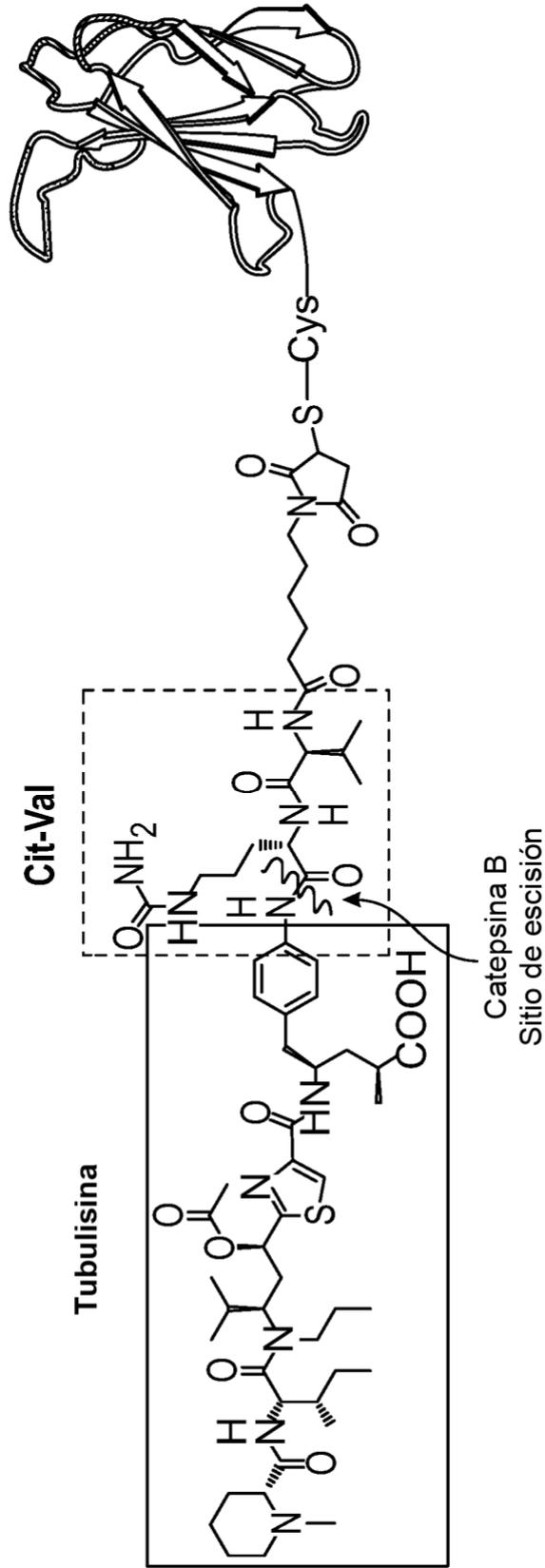


FIG. 2A

Conjugado directo, DAR2

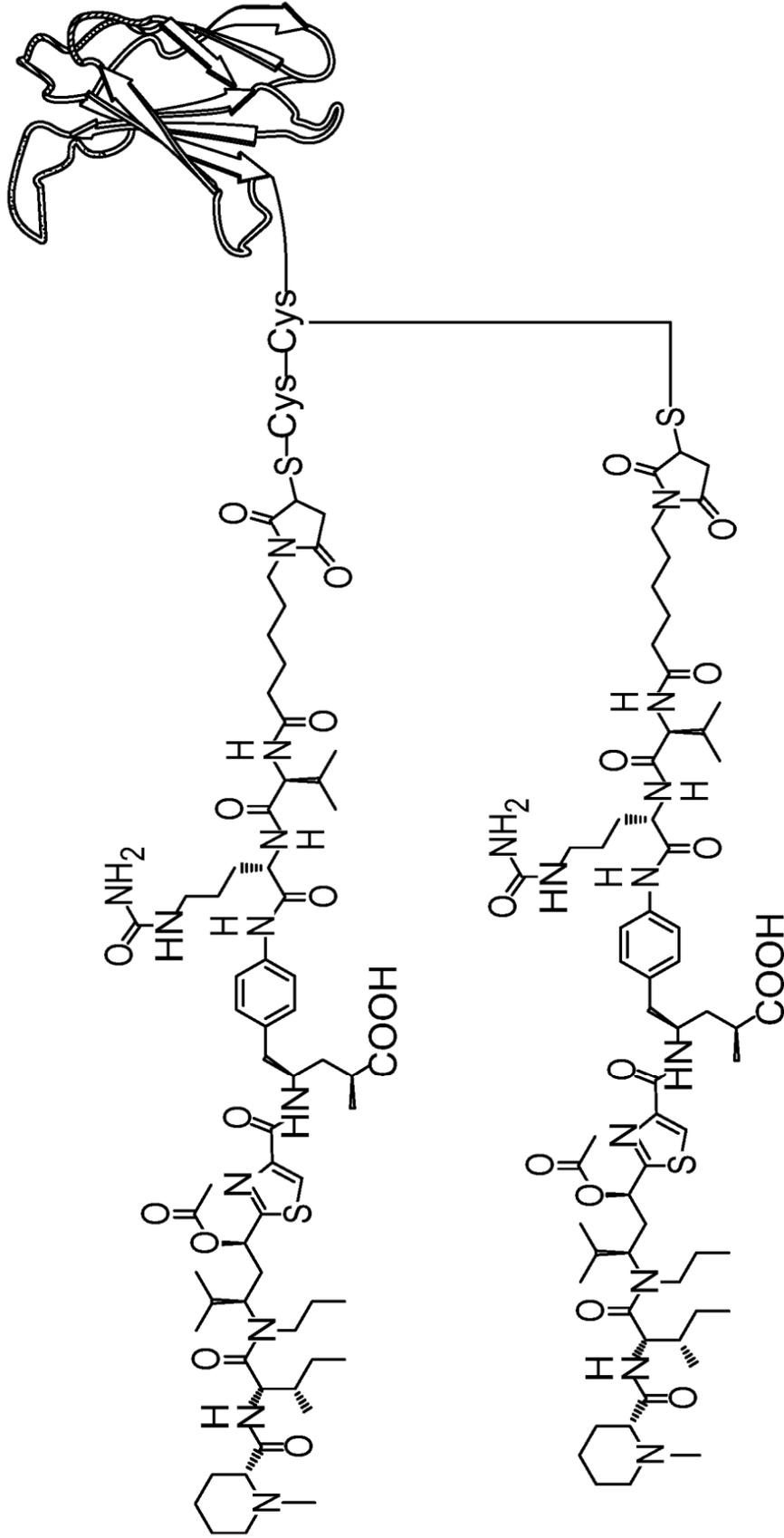


FIG. 2B

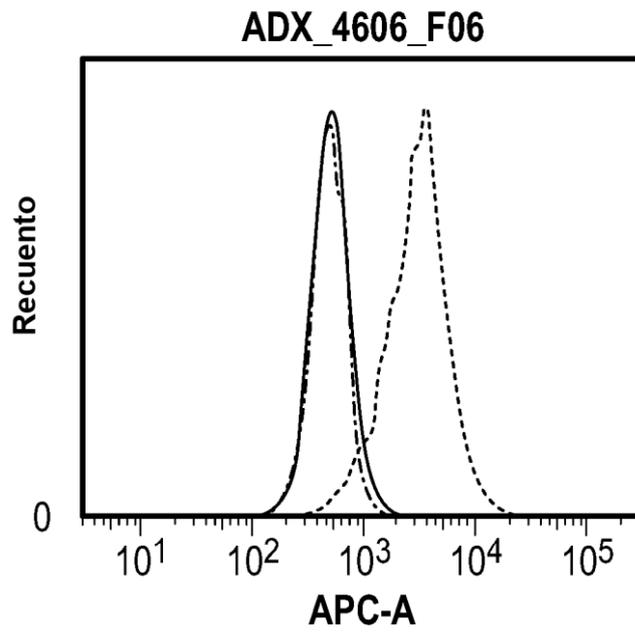


FIG. 3A

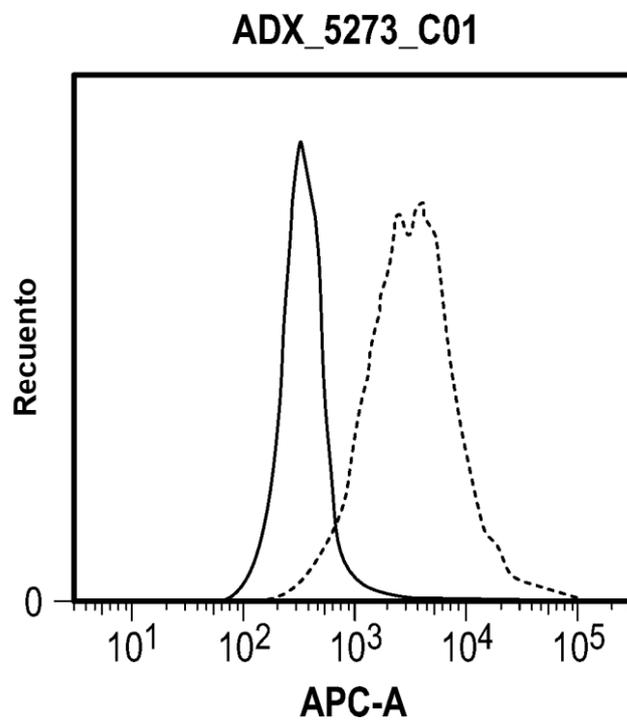


FIG. 3B

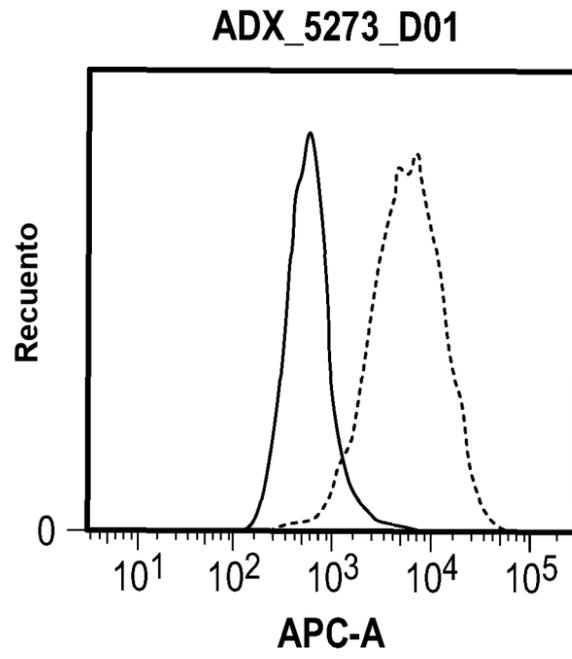


FIG. 3C

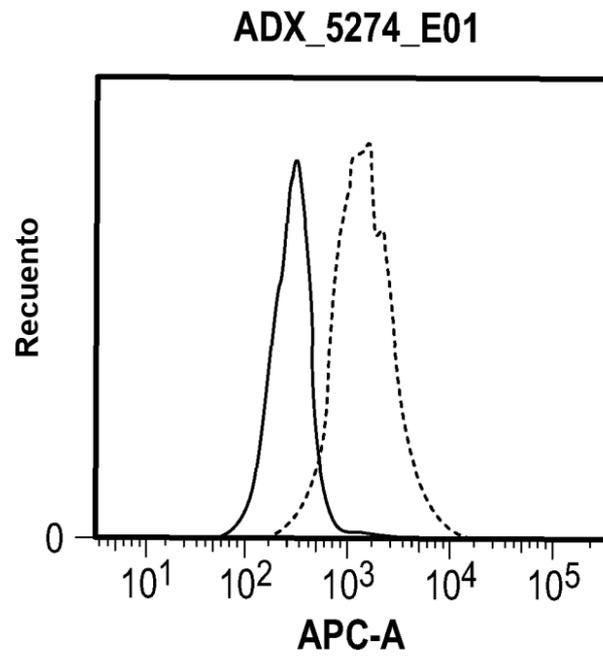


FIG. 3D

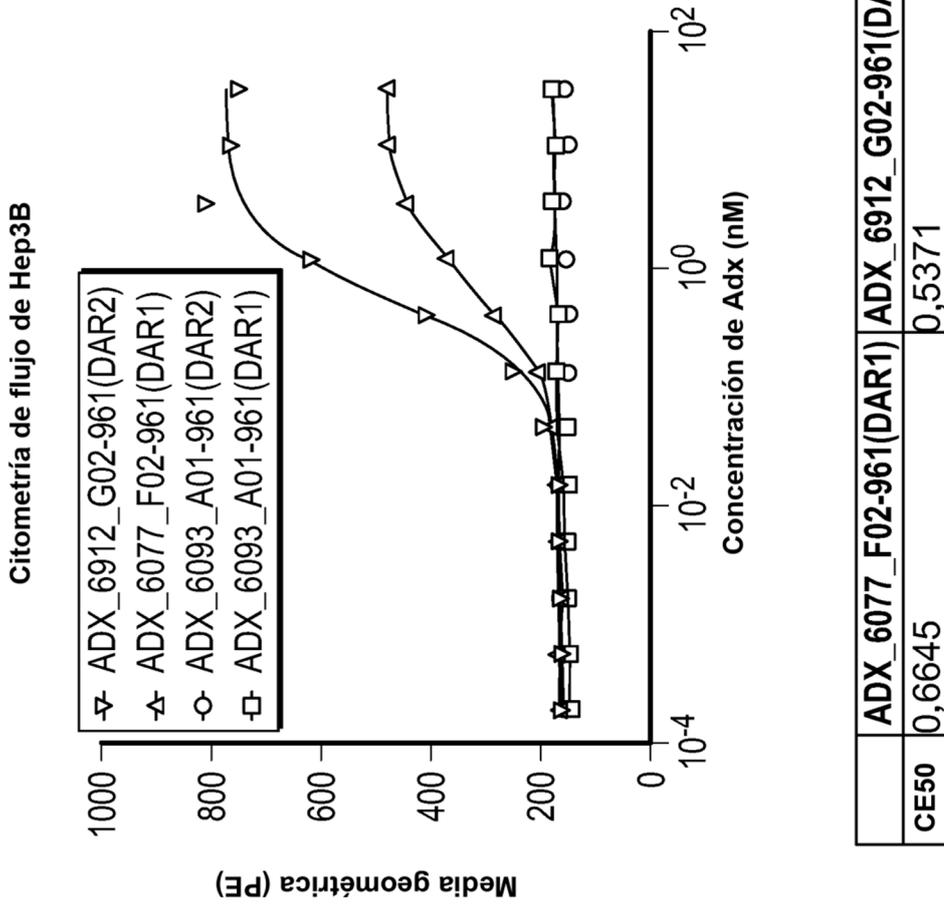


FIG. 4A

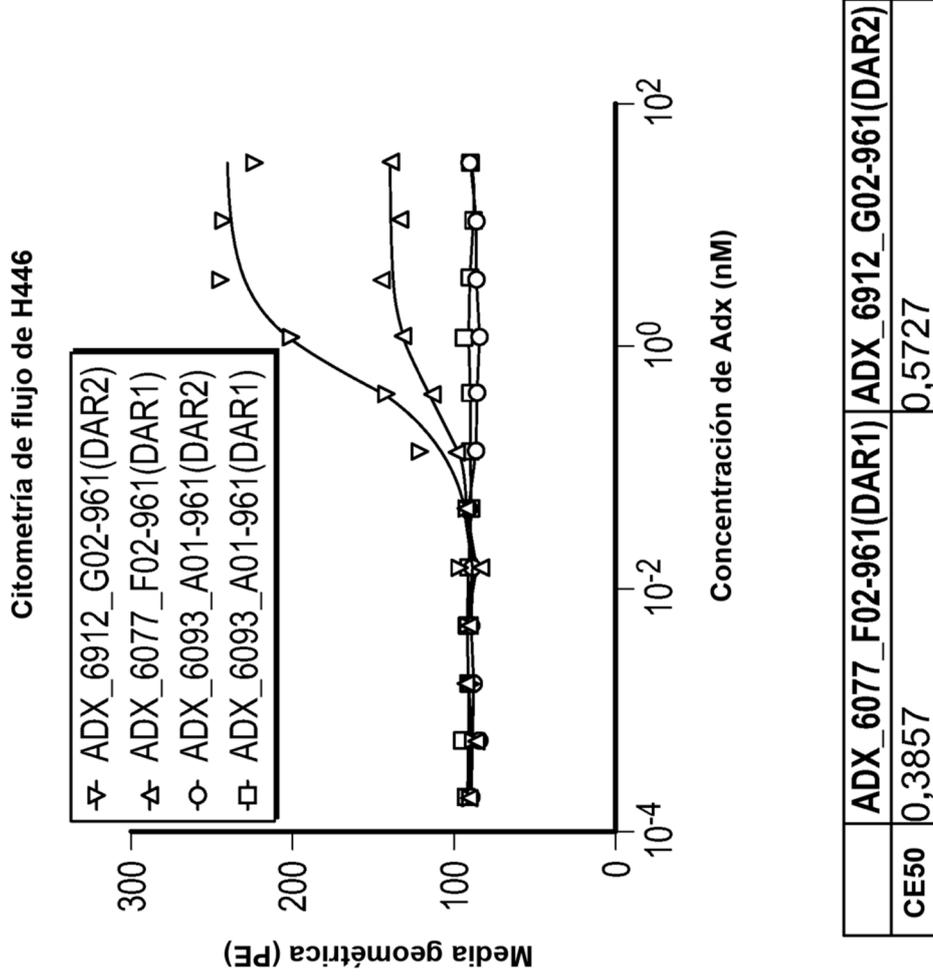


FIG. 4B

Proliferación ³H de Hep3B a 72 h

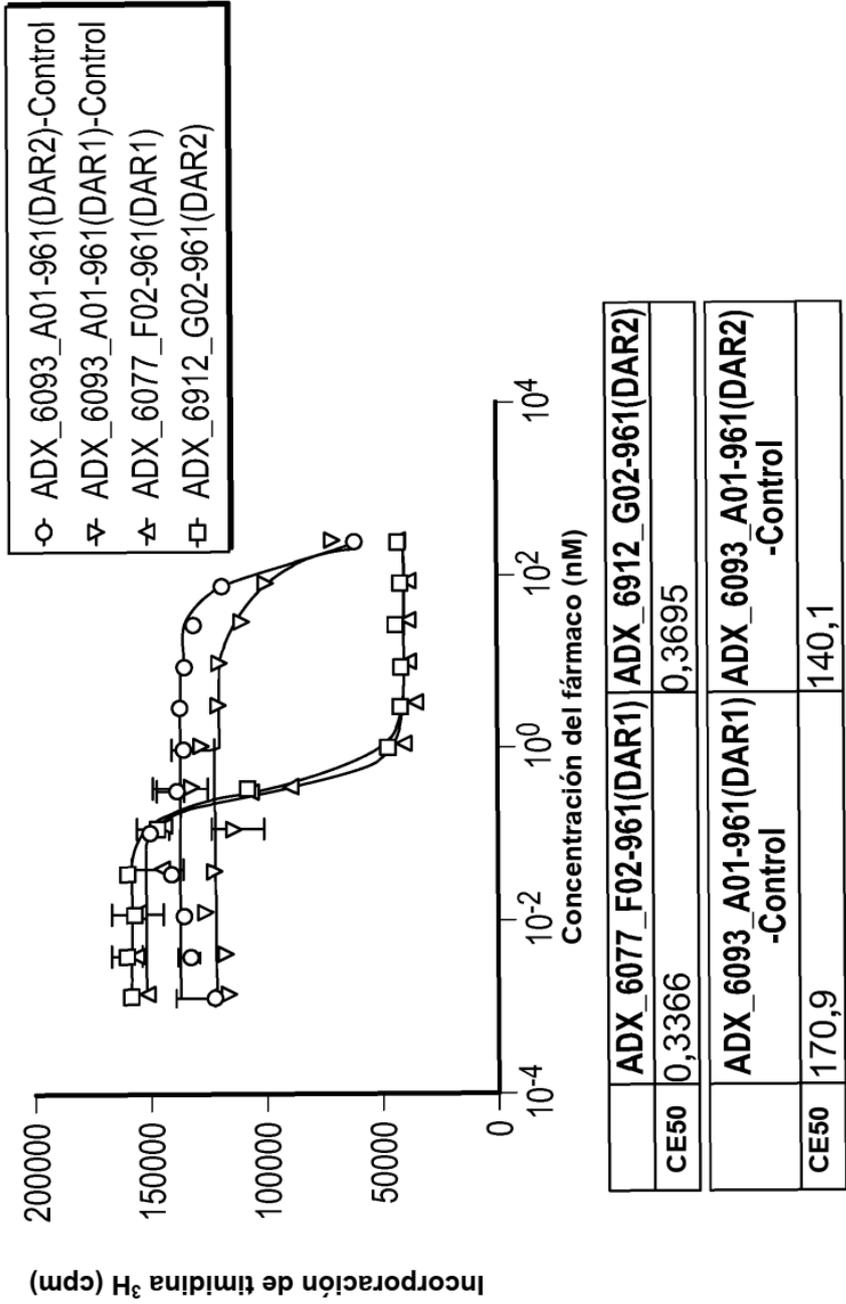


FIG. 5A

	ADX_6077_F02-961(DAR1)	ADX_6912_G02-961(DAR2)
CE50	0,3366	0,3695
	ADX_6093_A01-961(DAR1)	ADX_6093_A01-961(DAR2)
	-Control	-Control
CE50	170,9	140,1

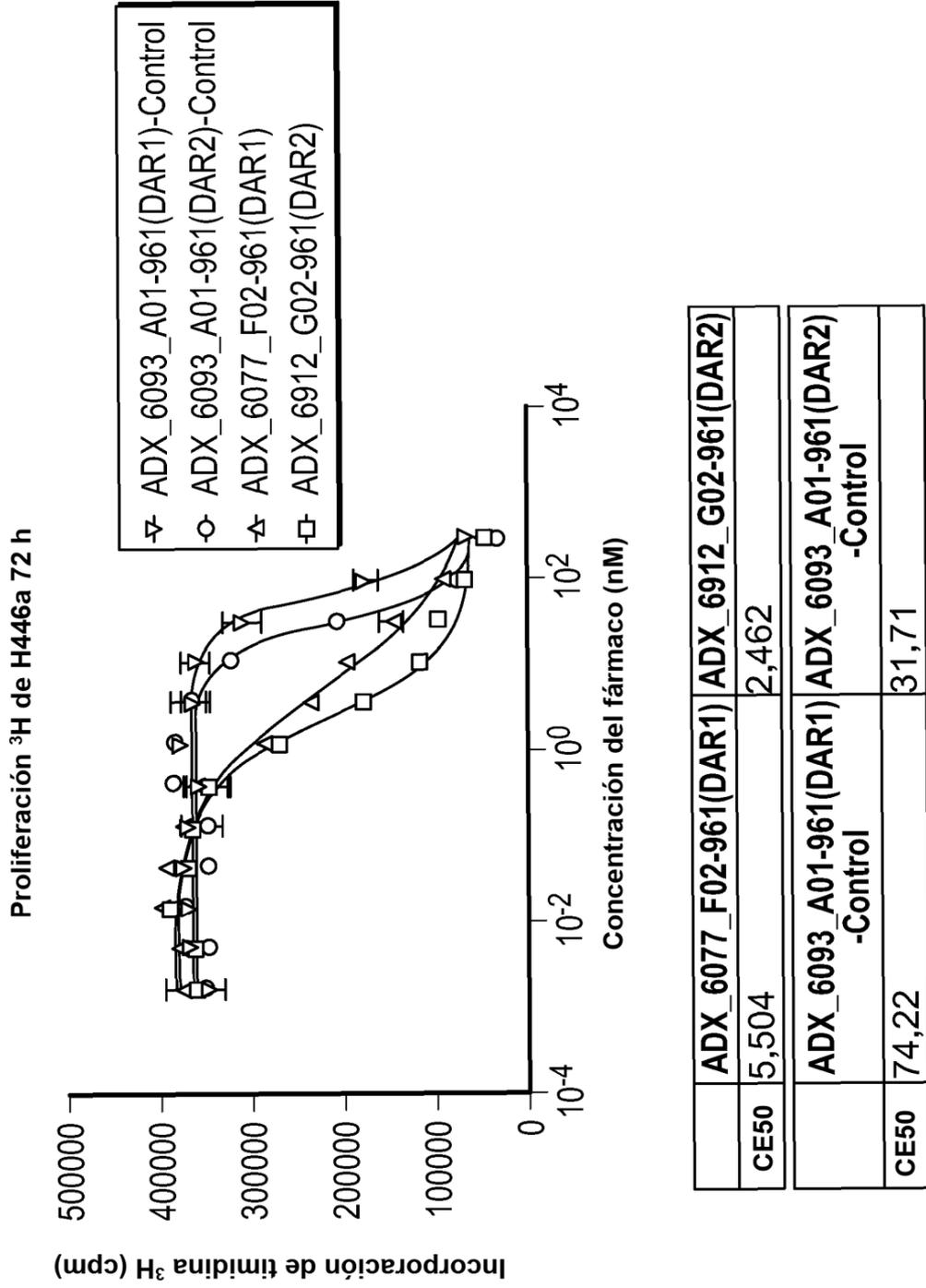


FIG. 5B

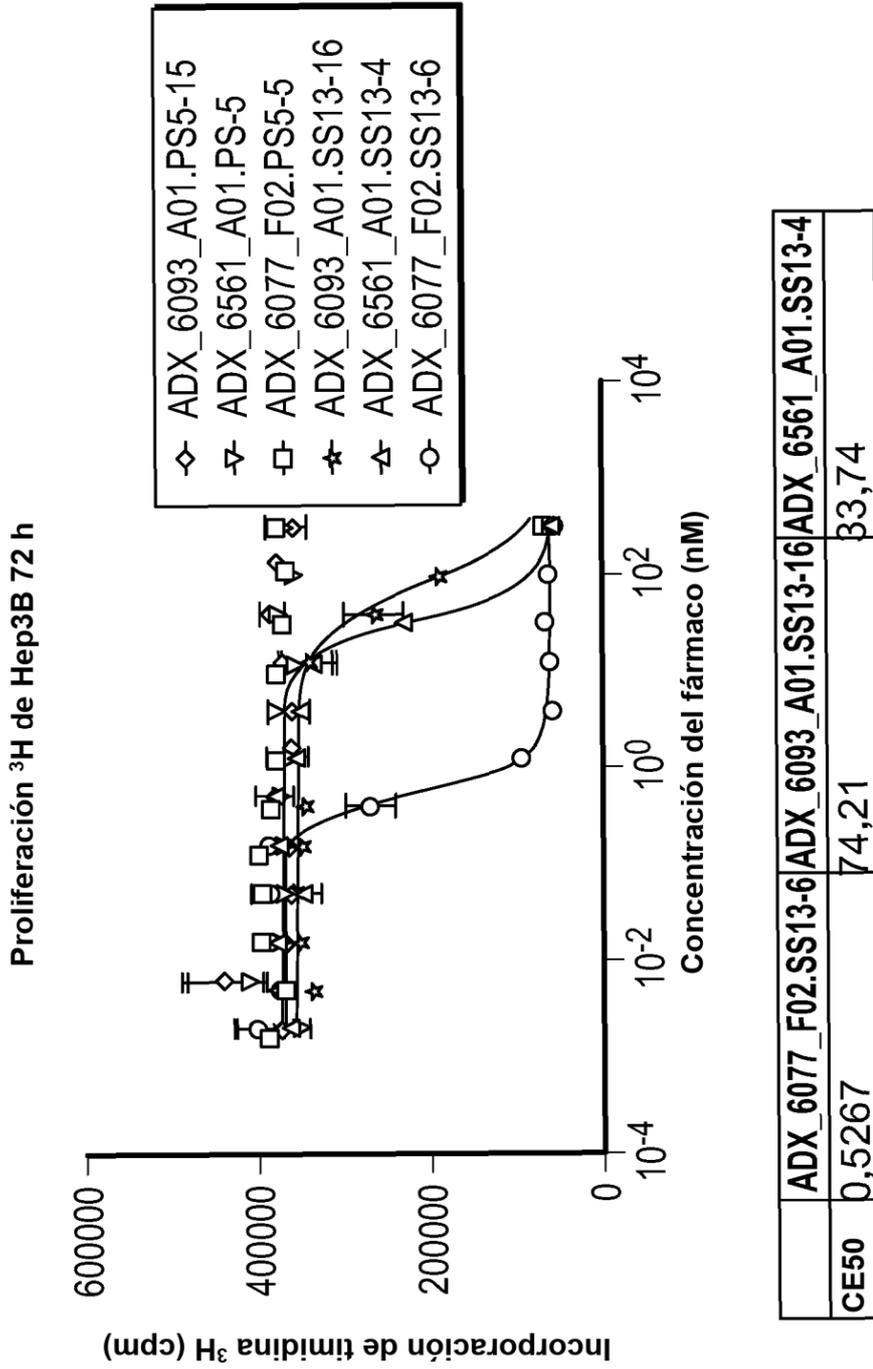


FIG. 6A

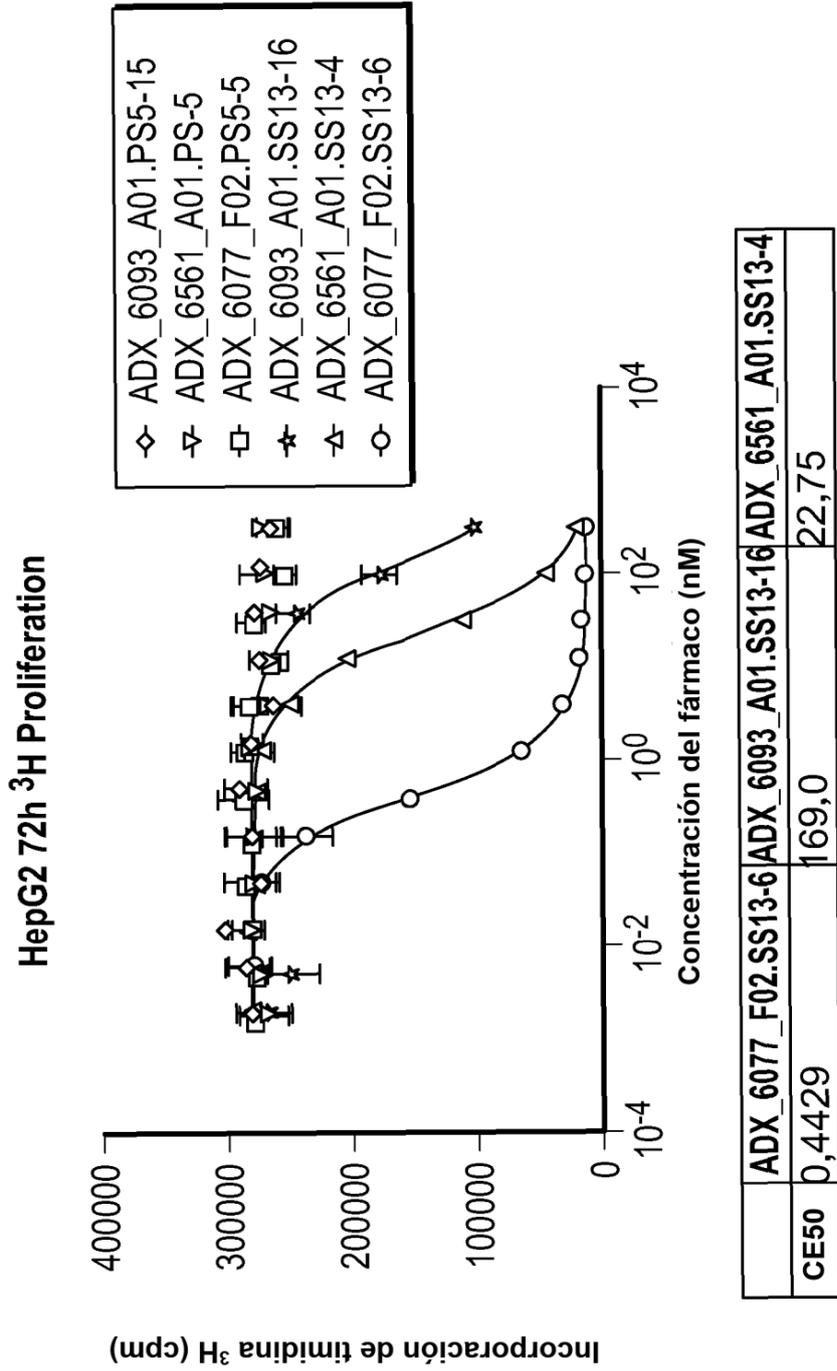


FIG. 6B

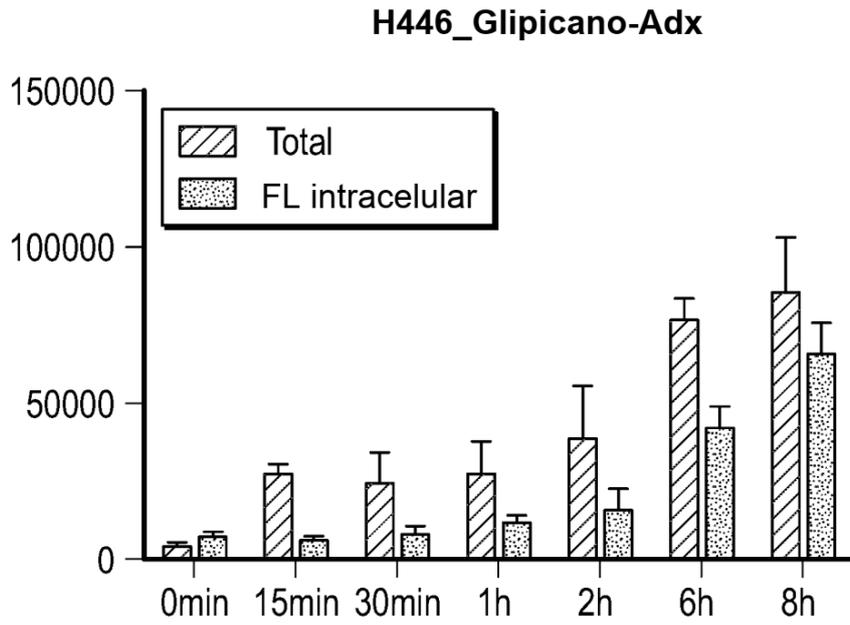


FIG. 7A

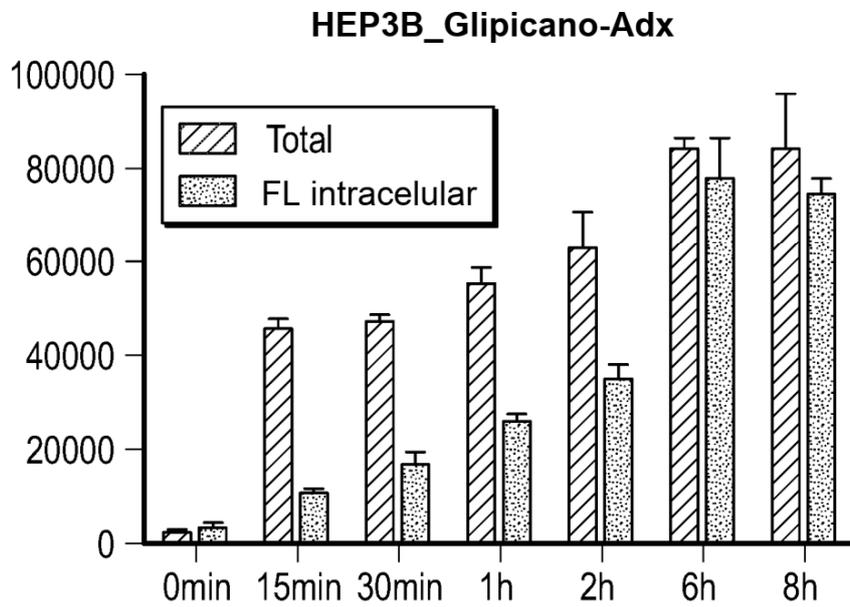


FIG. 7B

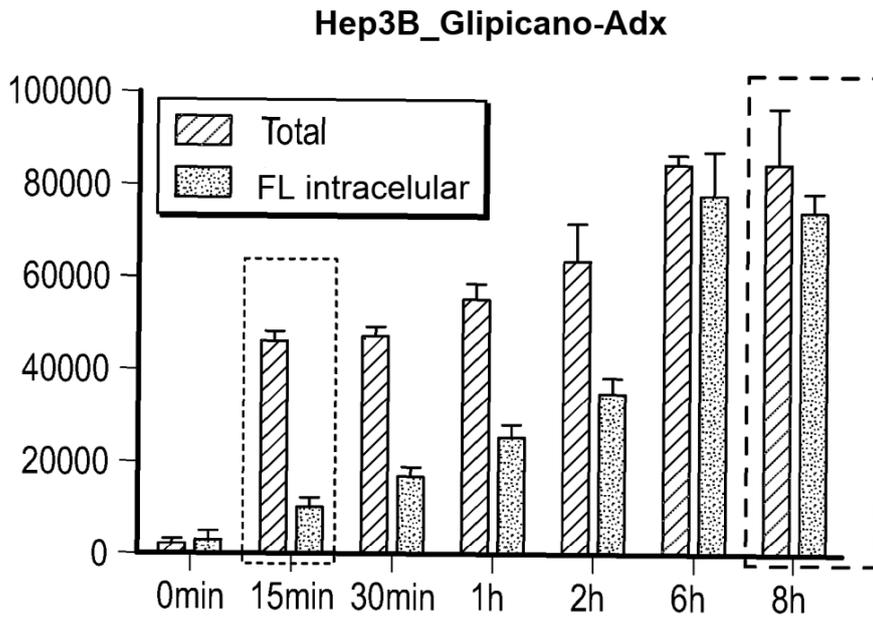


FIG. 8A

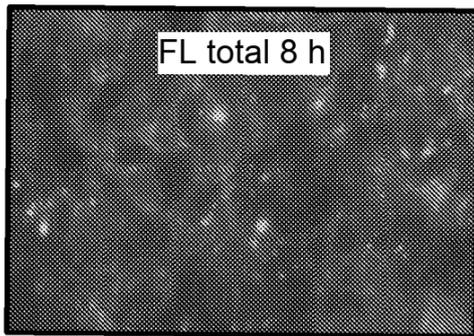


FIG. 8B

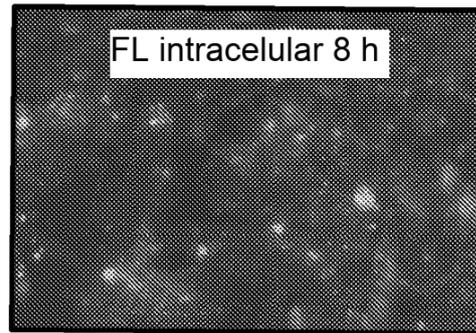


FIG. 8C

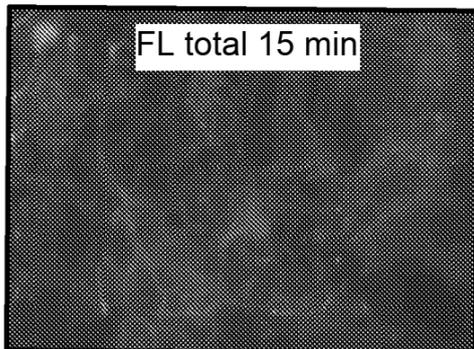


FIG. 8D

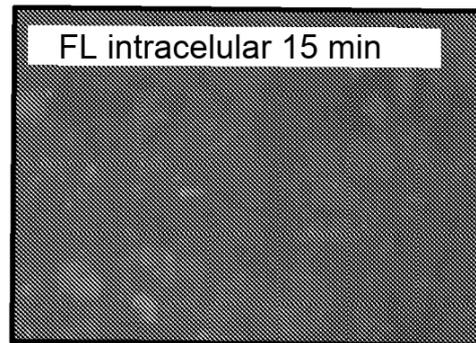


FIG. 8E

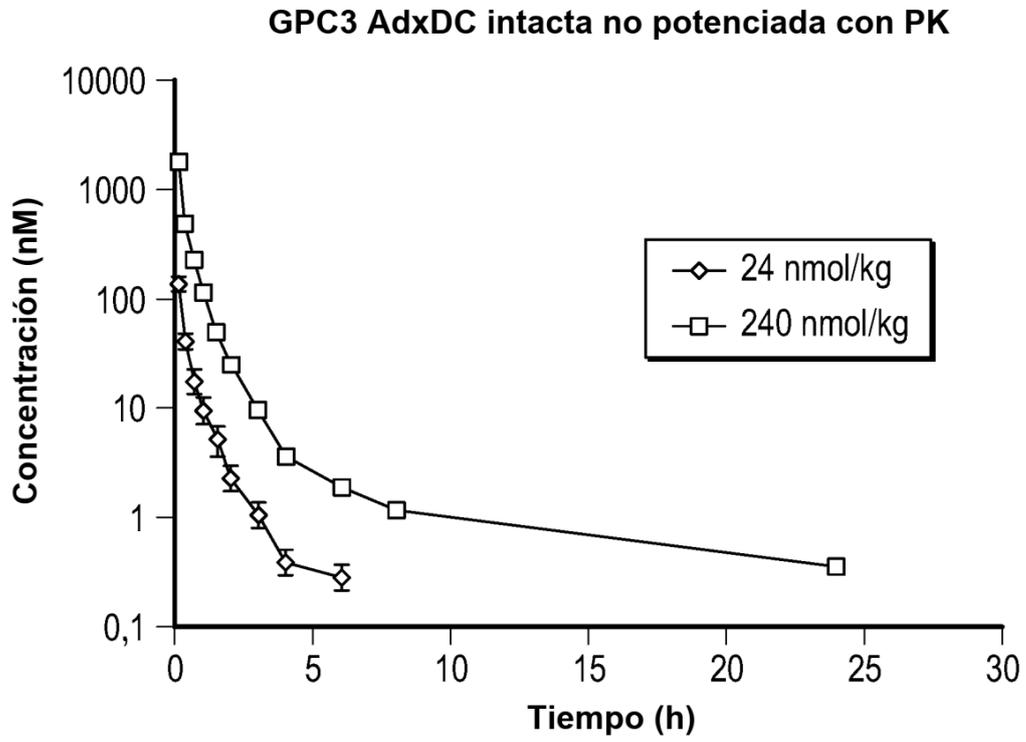


FIG. 9

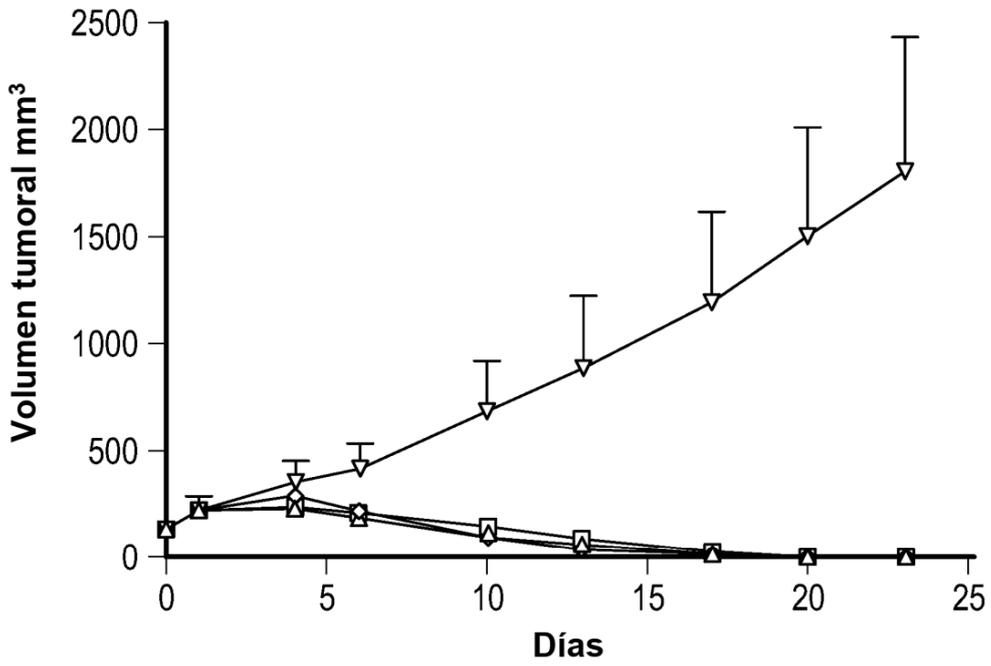


FIG. 10A

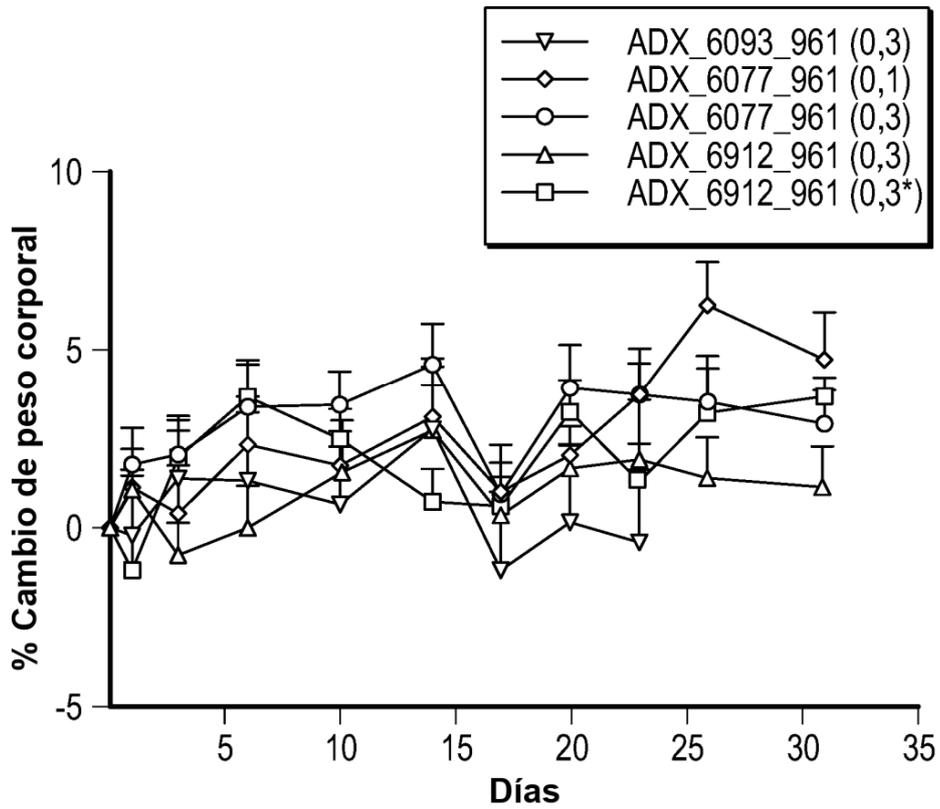
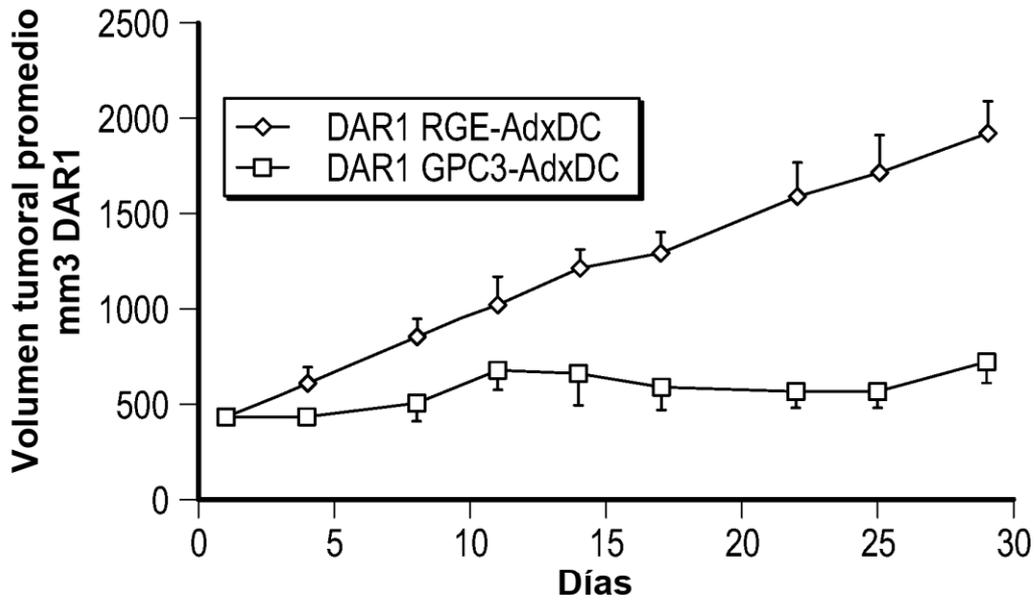
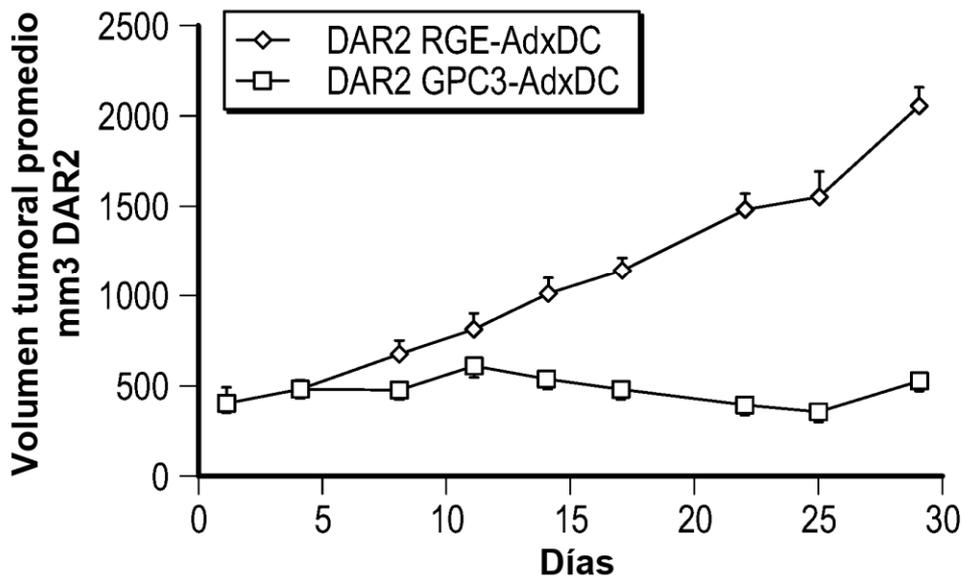


FIG. 10B



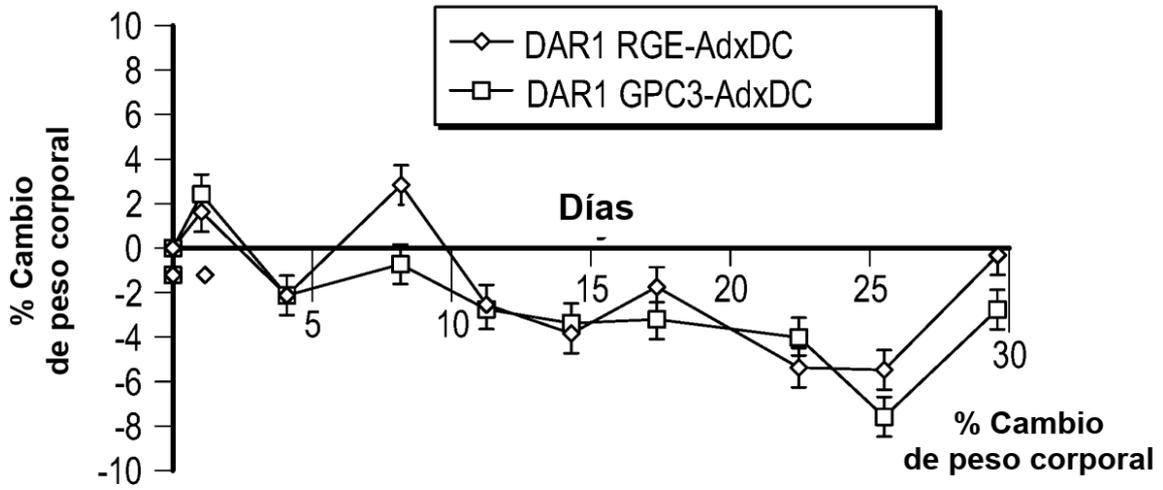
Tratamientos (n=3)	T/C	TR D29	TGI
DAR1 GPC3-AdxDC	62	27	80
DAR2 GPC3-AdxDC	74	0	92

FIG. 11A



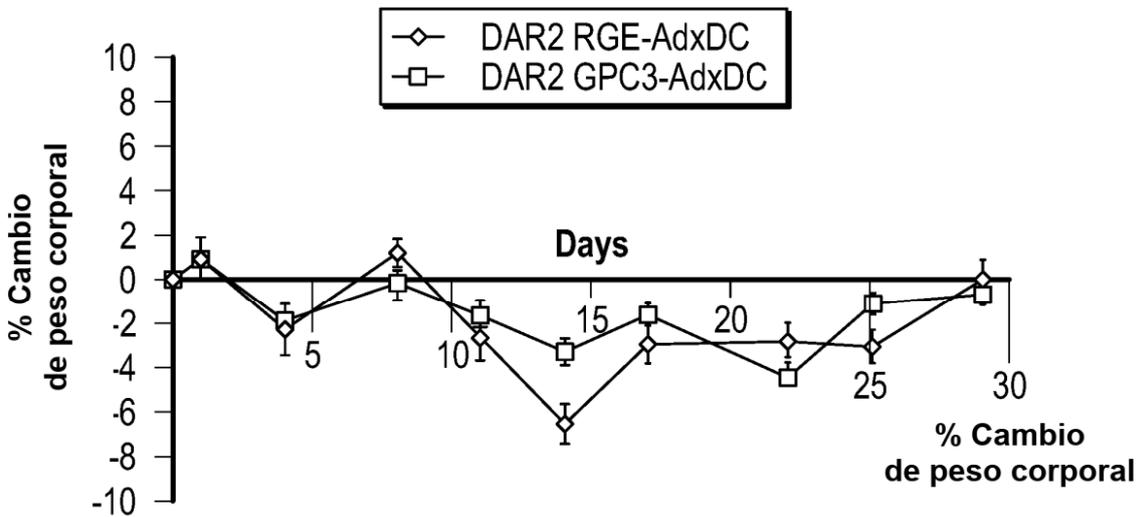
Tratamientos (n=3)	T/C	TR D29	TGI
DAR1 GPC3-AdxDC	62	27	80
DAR2 GPC3-AdxDC	74	0	92

FIG. 11B



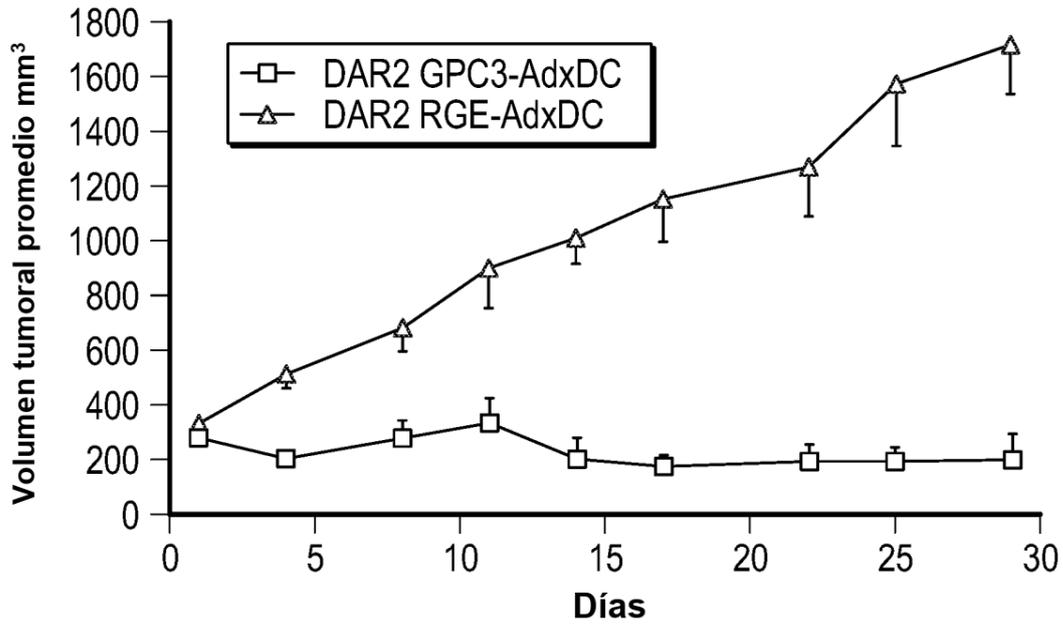
Tratamientos (n=3)	T/C	TR D29	TGI
DAR1 GPC3-AdxDC	62	27	80
DAR2 GPC3-AdxDC	74	0	92

FIG. 11C



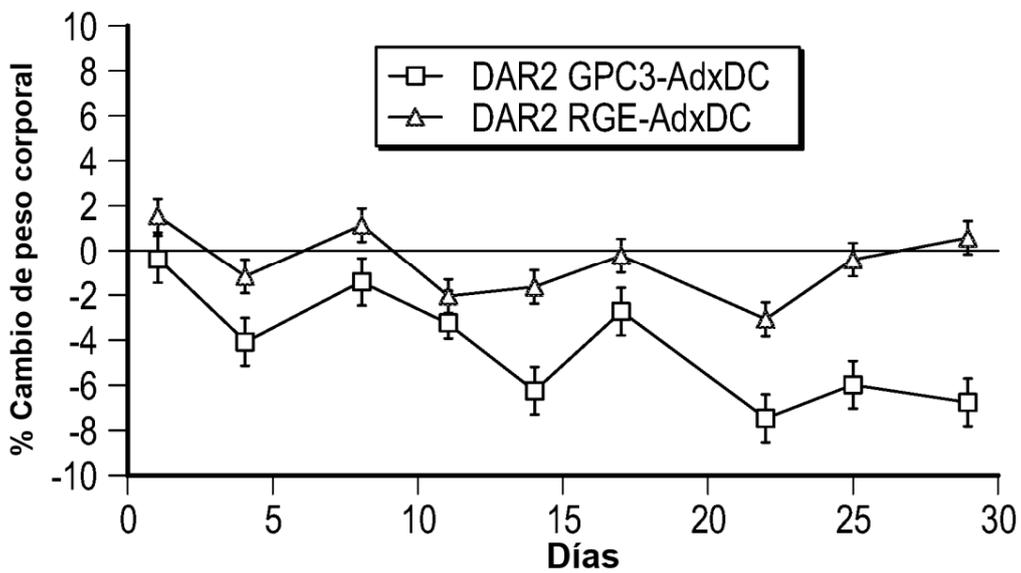
Tratamientos (n=3)	T/C	TR D29	TGI
DAR1 GPC3-AdxDC	62	27	80
DAR2 GPC3-AdxDC	74	0	92

FIG. 11D



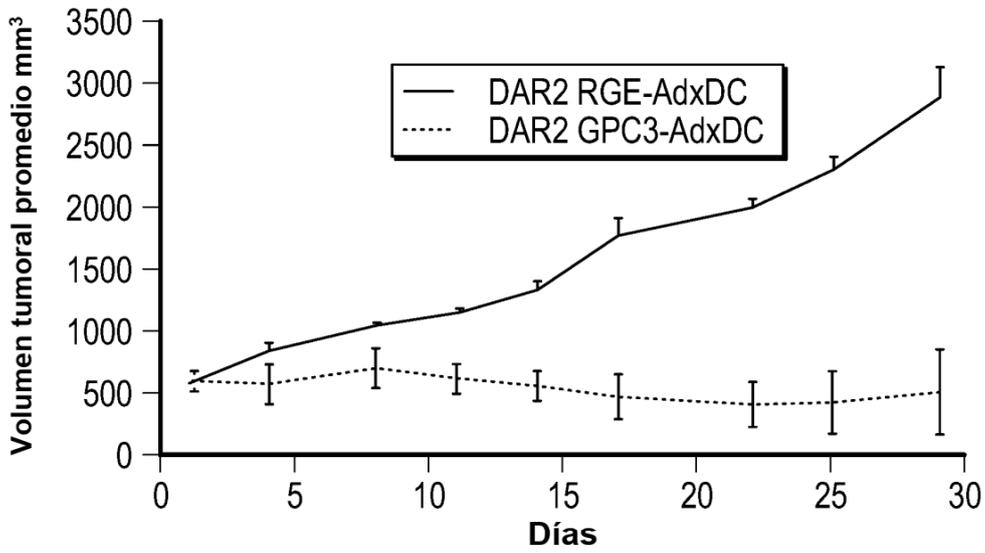
Tratamientos	T/C	TR (D29)	TGI
DAR2 GPC3_AdxDC	88	31	110

FIG. 12A



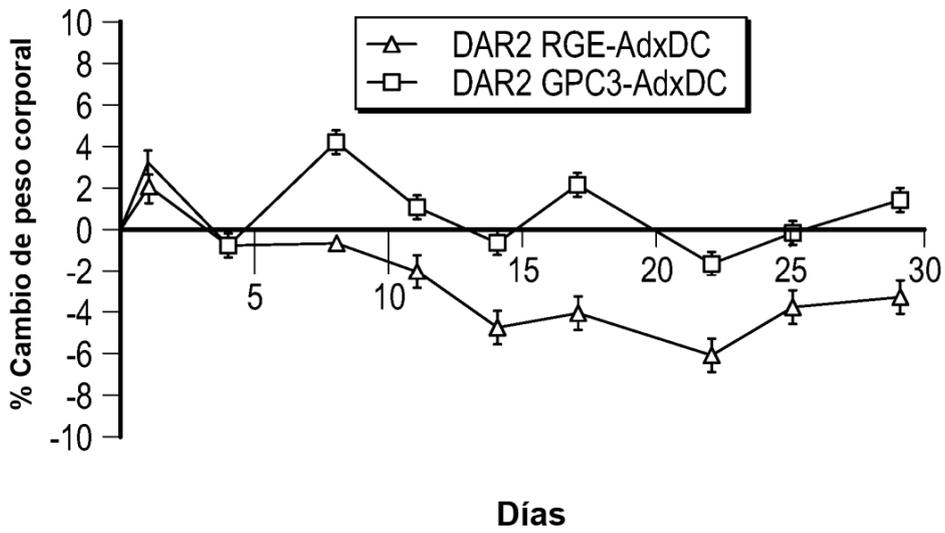
Tratamientos	T/C	TR (D29)	TGI
DAR2 GPC3_AdxDC	88	31	110

FIG. 12B



Tratamientos (n=3)	T/C	TR (D29)	TGI
DAR2 GPC3-AdxDC	82	17	103

FIG. 13A



Tratamientos	T/C	TR (D29)	TGI
DAR2 GPC3_AdxDC	82	17	103

FIG. 13B

MAGTVRTACLVA MLLSLDFP GQAQP P P P P P D A T C H Q V R S F F Q R L Q P G L K W V P E T P V P G S
 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
 DLQVCLPKGPTCCSRKMEEEKYQLTARLNMEQLLQSA SMELKFLIIQNA AVFQEA FEIVR
 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120
 HAKNYTNAMFKNNYPSLTPQAFEFVGEFFTDVSLYLIGSDINVD DMVNE LFD S L F P V I Y T
 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180
 QLMNPGLPDSALDINECLRGARRDLKVFGNFKLIMTQVSKSLQVTRIFLQALNLGIEVI
 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240
 NTTDLKFSKDCGRMLTRMWYCSYCQGLMNVKPCGGYCNVVMQGC MAGVVEIDKYWREYI
 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300
 L S L E E L V N G M Y R I Y D M E N V L L G L F S T I H D S I Q Y V Q K N A G K L T T I G K L C A H S Q Q R Y R S A
 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360
 YYPEDLFIDKKVLKVAHVEHEETLSSRRRELKLSFISFYSALPGYICSHSPVAENDT
 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420
 LCWNGQELVERYSQKAARNGMKNQFNHLKMKGPEPVVSQIIDK LKHINQLLRTMSMPK
 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480
 GRVLDKNLDEEGFESGDCGDDDEDECIGGSGDGMIKVKKNQLRFLAELAYDLVD D D A P G N S Q
 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540
 QATPKDNEISTFHNLGNVHHHHHHH
 545 550 555 560 565

TOTAL: 105 PÉPTIDOS, COBERTURA DEL 87,4 %, 2,66 DE REDUNDANCIA
 COBERTURA DE SECUENCIA DEL 87 %
 HDX: 1m, 10m, 4H POR DUPLICADO (24HDXs, 2600 SEÑALES PEPTÍDICAS)

FIG. 14

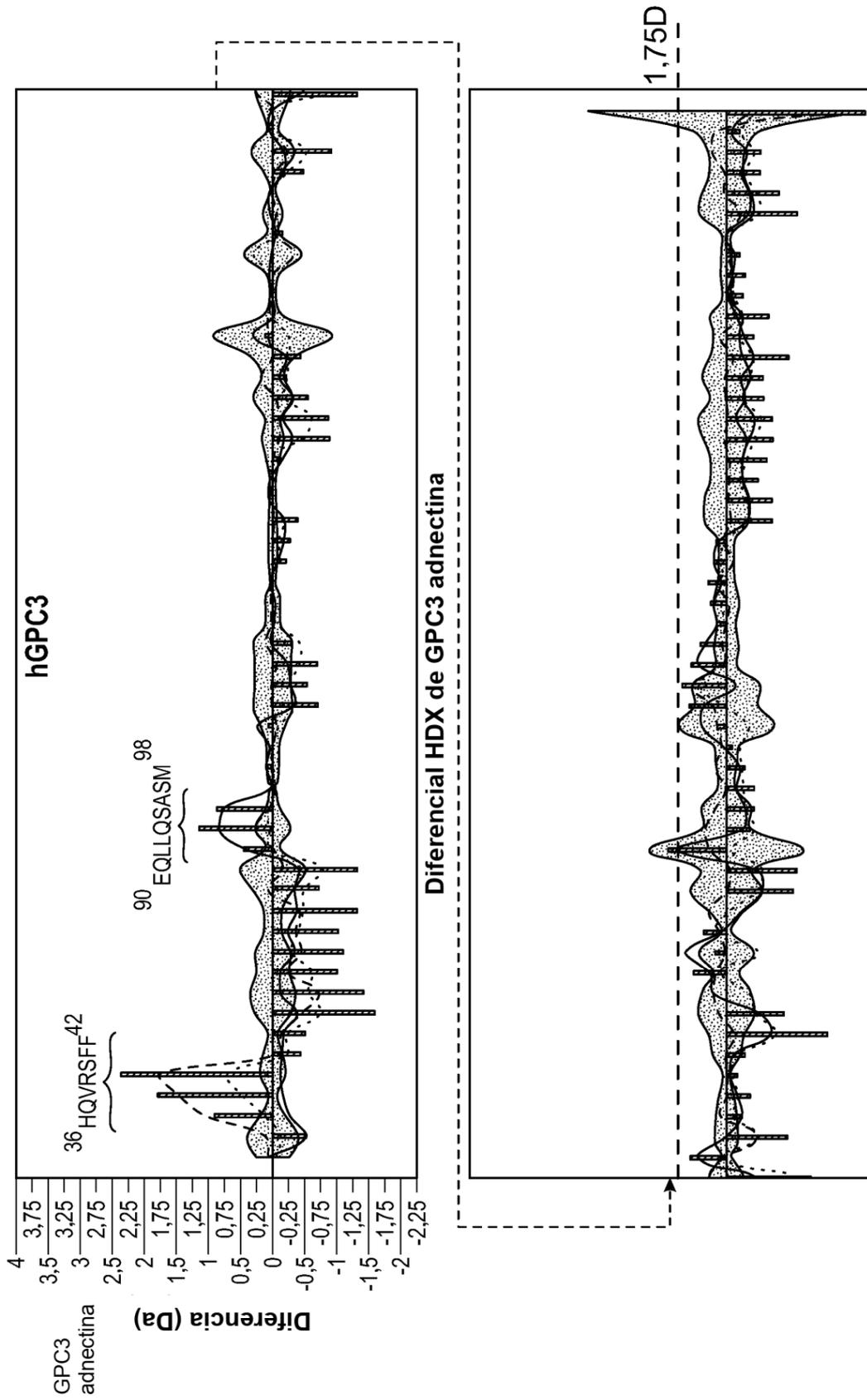
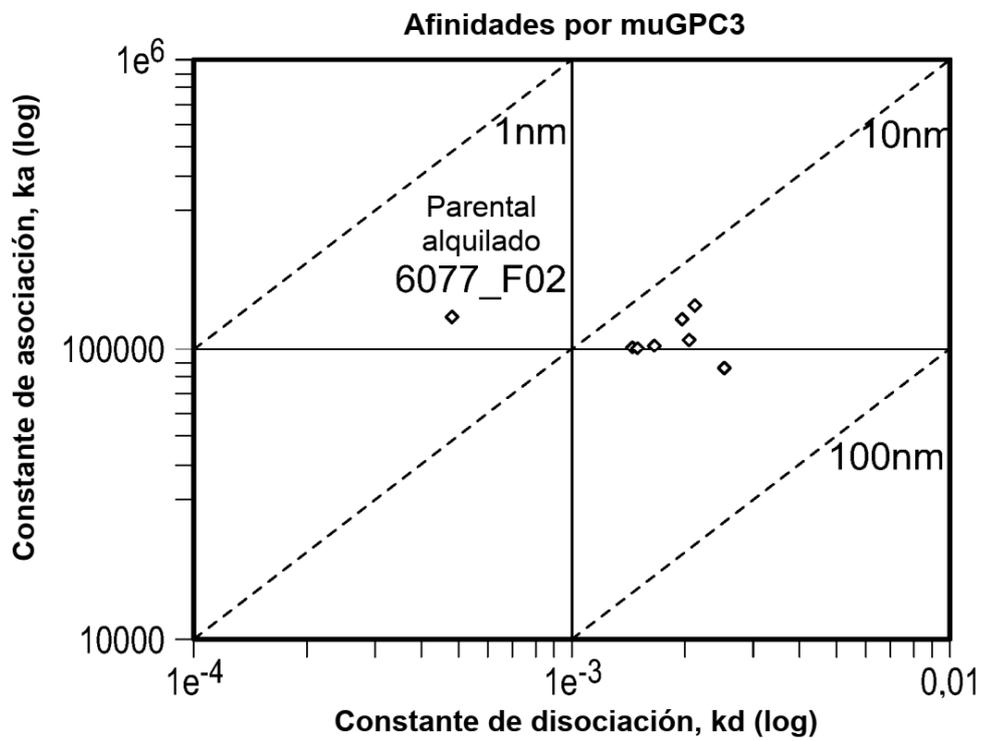
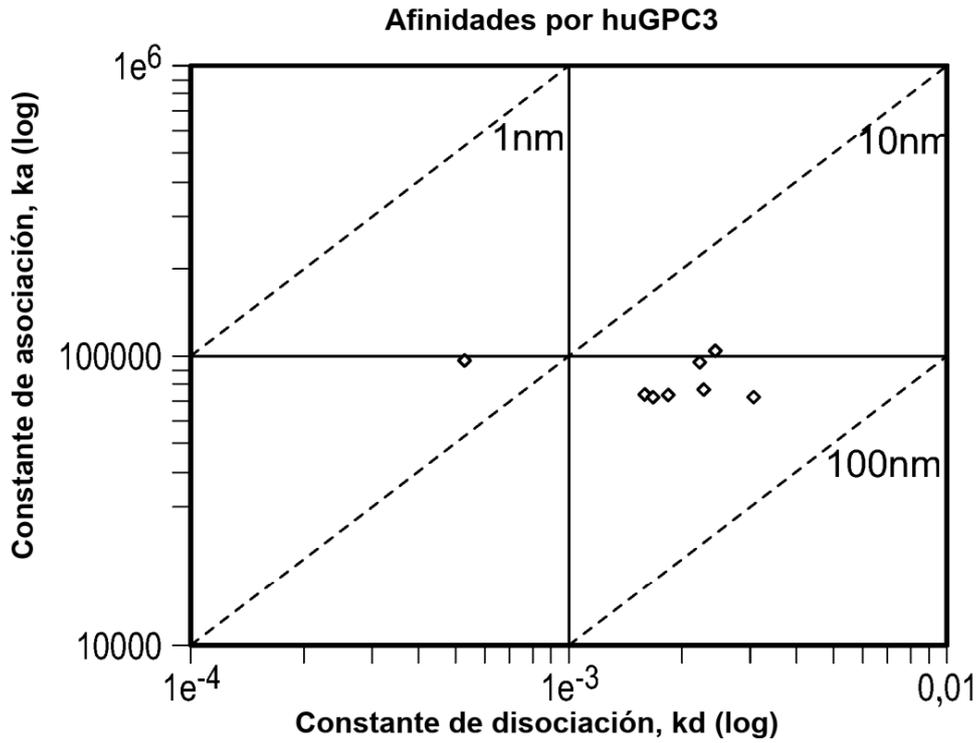
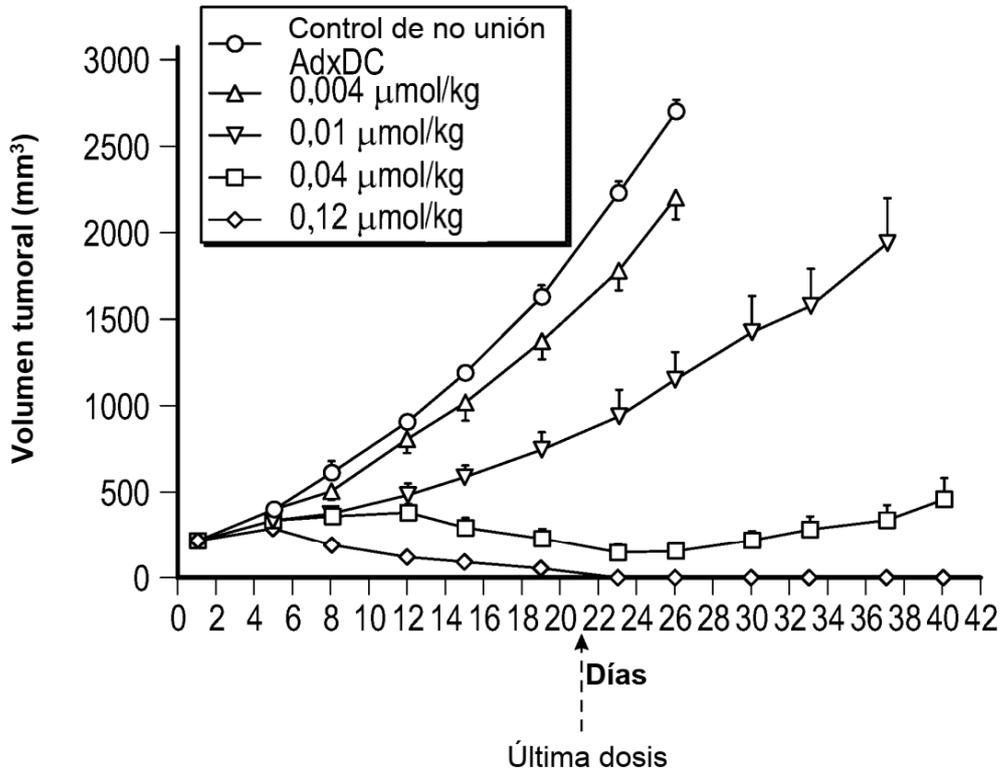


FIG. 15





Última dosis
FIG. 17

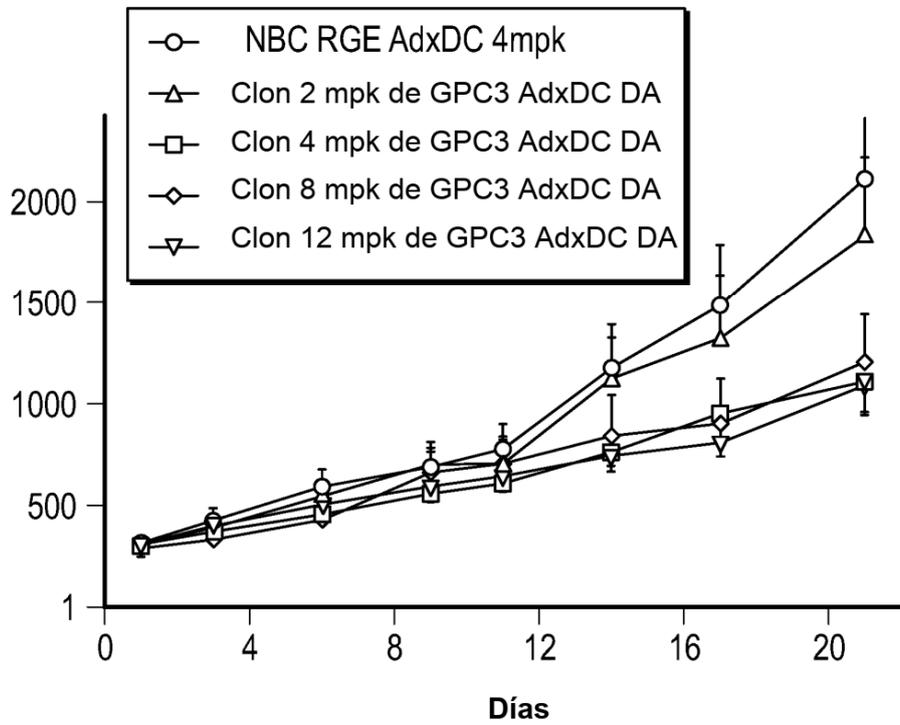


FIG. 18

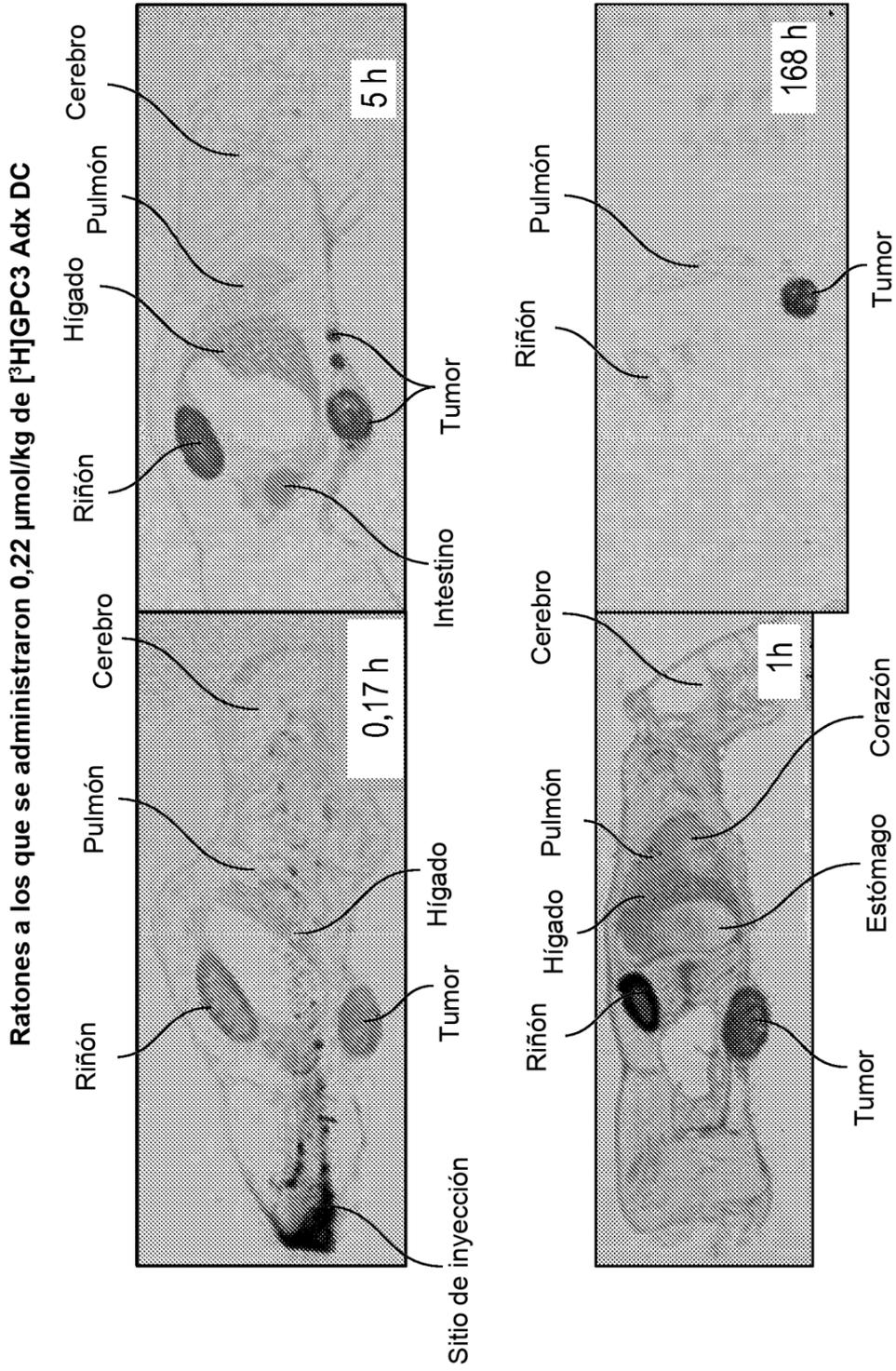


FIG. 19

Ratones a los que se administraron 0,015 $\mu\text{mol/kg}$ de $[^3\text{H}]\text{GPC3 Adx DC}$

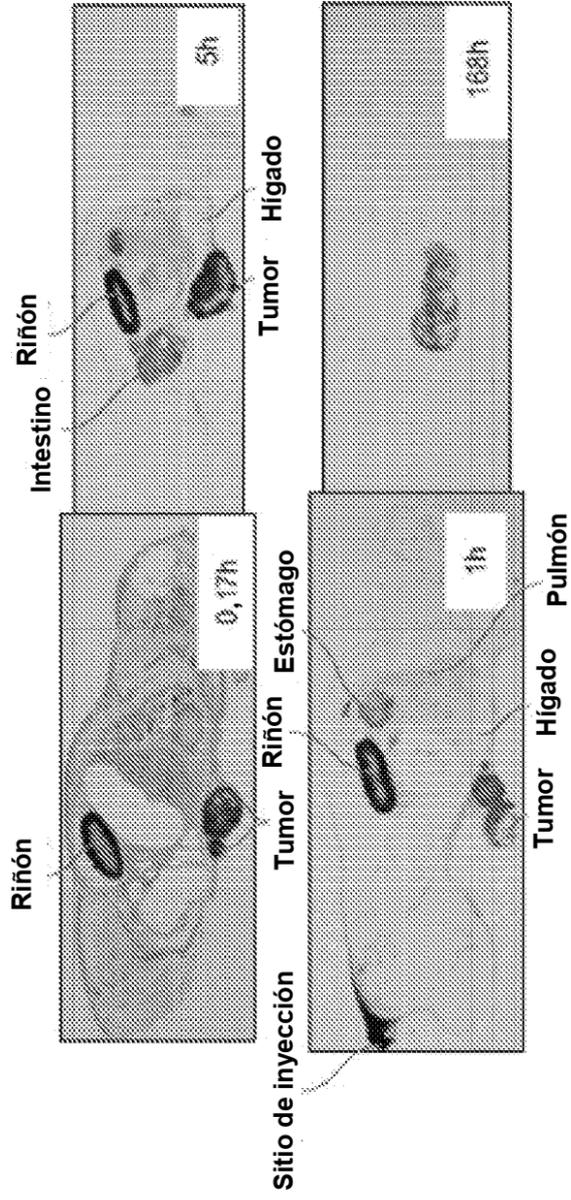


FIG. 20

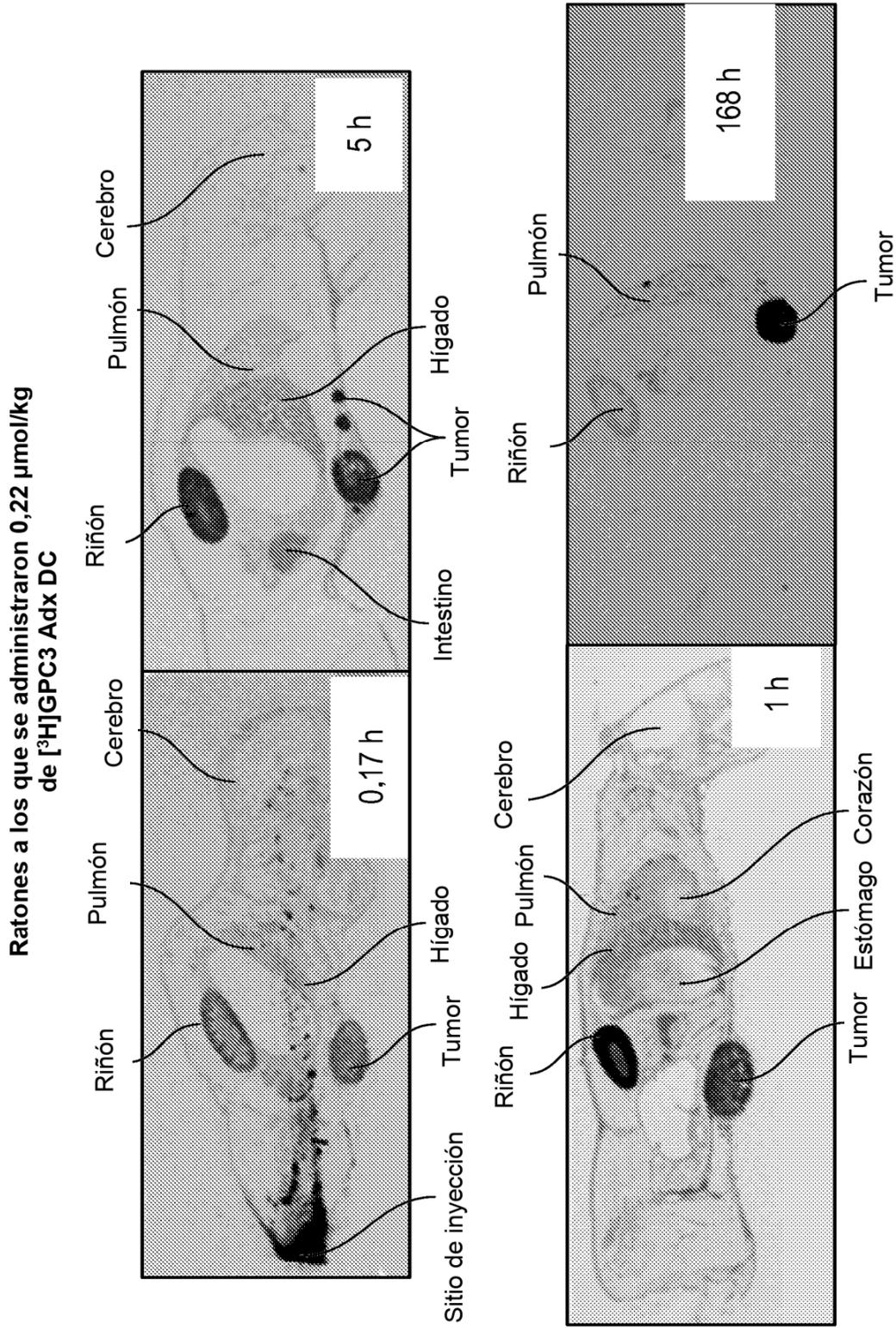


FIG. 21

Ratones a los que se administraron 0,22 $\mu\text{mol/kg}$ de [^3H]RGE Adx DC

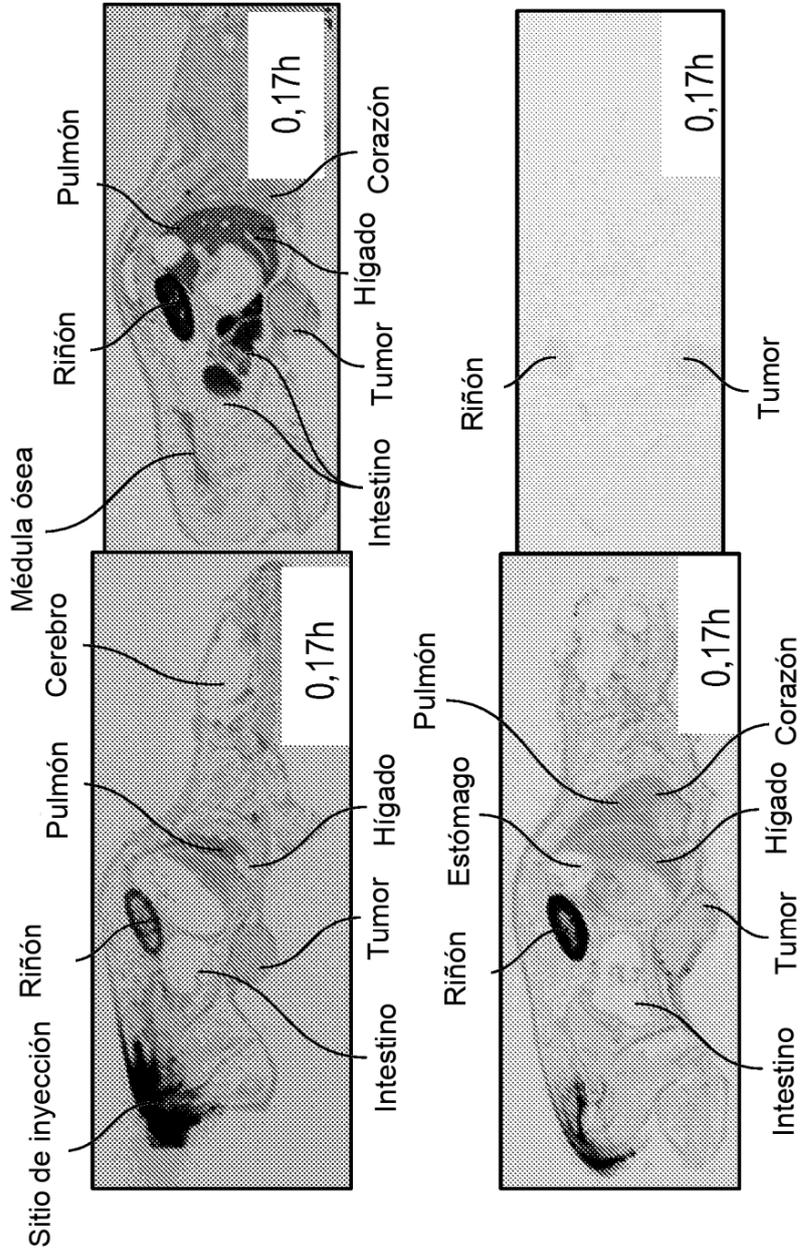


FIG. 22

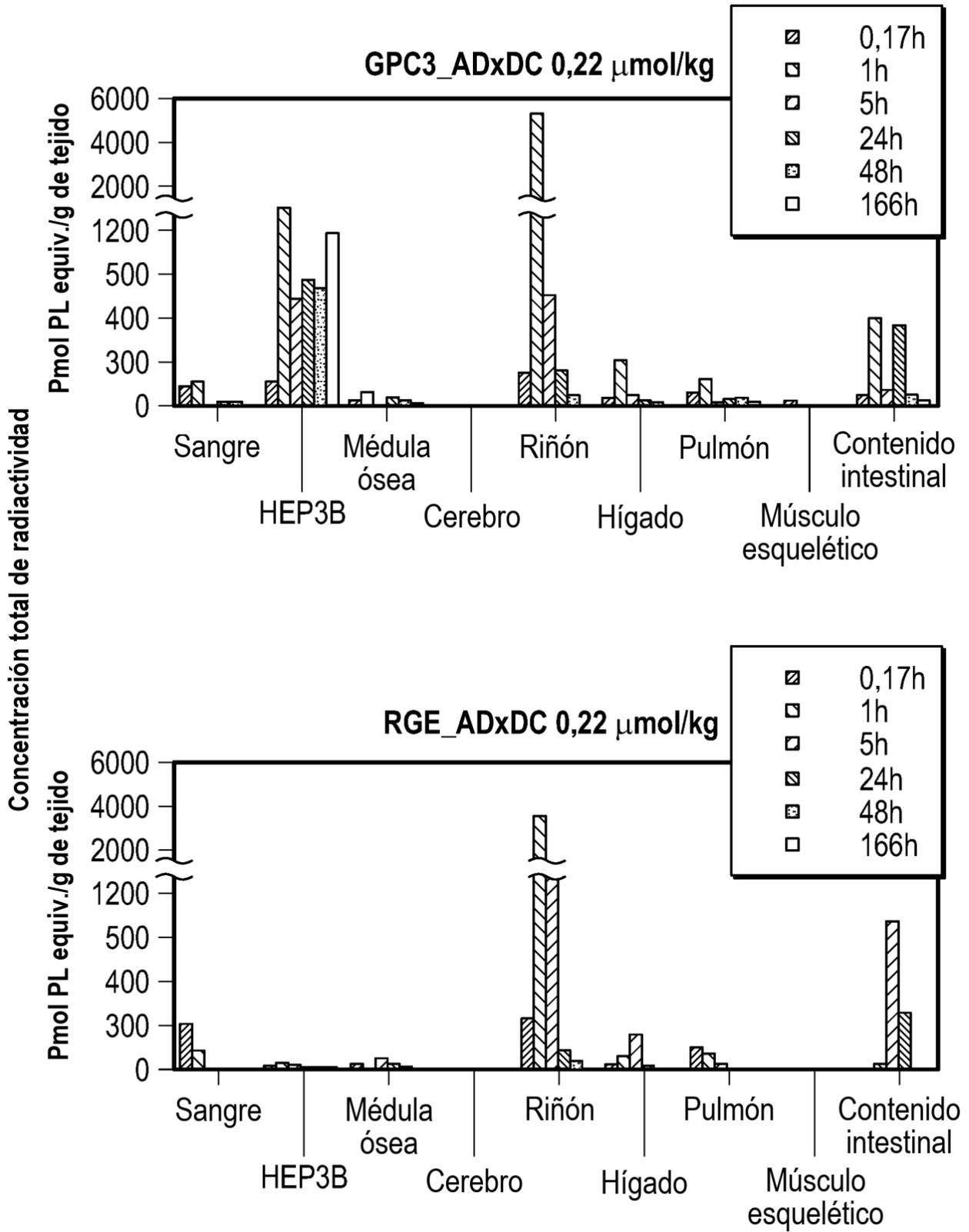


FIG. 23

10nM (79G)

sv par N.º	D S 23	A D 24	P D 25	A Y 26	A H 27	V A 28	T H 29
*	0,29	0,04	0,11	0,30	0,15	0,18	0,10
P	1,57	0,06	0,05	0,02	0,13	1,34	0,34
G	0,89	0,12	0,14	0,01	0,84	1,40	0,59
A	1,20	0,09	0,46	0,04	0,68	1,00	1,22
C	1,27	0,14	0,28	0,07	0,54	0,89	1,48
S	1,00	0,33	0,40	0,02	1,10	1,46	1,35
T	1,51	0,16	0,15	0,01	1,28	1,27	1,48
V	1,15	0,11	0,16	0,02	0,17	1,44	0,52
L	1,62	0,07	0,19	0,09	0,66	1,41	1,58
I	1,21	0,10	0,12	0,07	0,38	1,62	0,84
M	1,39	0,07	0,24	0,14	0,65	1,67	1,82
K	1,23	0,03	0,12	0,02	0,45	1,01	1,16
R	1,53	0,04	0,15	0,02	0,37	1,07	1,18
H	1,28	0,15	0,60	0,18	1,00	1,60	1,00
F	1,60	0,06	0,30	0,66	0,94	2,25	1,78
Y	1,60	0,06	0,32	1,00	0,91	2,08	1,68
W	1,95	0,07	0,48	0,62	0,82	3,01	2,30
N	1,14	0,44	0,45	0,02	1,14	1,54	1,44
D	1,35	1,00	1,00	0,01	0,99	1,77	1,40
E	1,34	0,39	0,55	0,01	0,75	1,79	1,67
Q	1,26	0,17	0,27	0,04	0,67	1,43	1,36

FIG. 24A

1nM (79G)

sv par N.º	D S 23	A D 24	P D 25	A Y 26	V H 27	T A 28	V H 29
*	0,35	0,08	0,12	0,32	0,20	0,25	0,16
P	1,68	0,08	0,06	0,03	0,17	1,45	0,39
G	0,87	0,13	0,14	0,02	0,85	1,50	0,58
A	1,27	0,10	0,44	0,04	0,66	1,00	1,29
C	1,37	0,18	0,29	0,10	0,57	1,09	1,59
S	1,00	0,33	0,39	0,03	1,16	1,59	1,42
T	1,67	0,16	0,15	0,02	1,34	1,41	1,59
V	1,20	0,13	0,15	0,03	0,17	1,53	0,51
L	1,74	0,08	0,19	0,09	0,67	1,53	1,70
I	1,27	0,11	0,11	0,07	0,35	1,69	0,86
M	1,48	0,08	0,25	0,13	0,62	1,79	1,94
K	1,26	0,04	0,12	0,02	0,43	1,04	1,19
R	1,61	0,03	0,15	0,03	0,36	1,11	1,31
H	1,36	0,16	0,55	0,17	1,00	1,68	1,00
F	1,85	0,07	0,30	0,64	0,98	2,65	1,94
Y	1,75	0,08	0,31	1,00	0,96	2,30	1,84
W	2,08	0,08	0,46	0,61	0,85	3,93	2,53
N	1,20	0,42	0,44	0,02	1,14	1,64	1,52
D	1,38	1,00	1,00	0,01	1,02	1,91	1,49
E	1,37	0,41	0,52	0,02	0,72	1,93	1,85
Q	1,31	0,16	0,24	0,04	0,75	1,51	1,51

FIG. 24B

10nM (79A)

sv par	N.º	D S	A D	P D	A Y	A H	V H	T A	V H
*		0,24	0,06	0,08	0,29	0,15	0,22	0,22	0,11
P		1,71	0,03	0,02	0,02	0,12	1,37	0,28	
G		0,72	0,05	0,04	0,02	0,62	1,18	0,26	
A		1,16	0,05	0,16	0,02	0,45	1,00	1,06	
C		1,23	0,11	0,15	0,07	0,28	0,76	1,26	
S		1,00	0,10	0,15	0,02	0,99	1,33	1,07	
T		1,50	0,04	0,04	0,02	1,21	1,26	1,45	
V		1,06	0,05	0,04	0,02	0,07	1,48	0,30	
L		1,62	0,04	0,05	0,03	0,33	1,28	1,17	
I		1,13	0,05	0,04	0,03	0,13	1,67	0,53	
M		1,37	0,04	0,06	0,04	0,33	1,62	1,57	
K		1,18	0,02	0,04	0,02	0,21	1,01	0,90	
R		1,52	0,02	0,04	0,02	0,18	1,06	0,90	
H		1,24	0,06	0,31	0,06	1,00	1,45	1,00	
F		1,68	0,05	0,09	0,48	0,73	1,79	1,48	
Y		1,74	0,05	0,09	1,00	0,63	1,74	1,38	
W		2,27	0,04	0,22	0,35	0,48	2,15	1,85	
N		0,98	0,15	0,21	0,02	0,98	1,36	1,41	
D		1,29	1,00	1,00	0,02	0,68	1,53	1,05	
E		1,18	0,17	0,27	0,02	0,38	1,72	1,27	
Q		1,18	0,06	0,09	0,03	0,42	1,52	1,16	

FIG. 25A

1nM (79A)

sv par	N.º	D S	A D	P D	A Y	A H	V H	T A	V H
*		0,38	0,12	0,13	0,31	0,17	0,24	0,15	
P		1,79	0,04	0,05	0,03	0,17	1,46	0,34	
G		0,73	0,07	0,07	0,02	0,63	1,25	0,28	
A		1,19	0,06	0,17	0,04	0,49	1,00	1,09	
C		1,32	0,22	0,24	0,13	0,36	0,95	1,35	
S		1,00	0,10	0,17	0,04	1,09	1,42	1,11	
T		1,59	0,06	0,06	0,03	1,25	1,29	1,53	
V		1,12	0,09	0,06	0,03	0,07	1,59	0,31	
L		1,74	0,08	0,07	0,05	0,34	1,35	1,22	
I		1,19	0,10	0,06	0,03	0,15	1,77	0,55	
M		1,39	0,05	0,08	0,05	0,34	1,66	1,62	
K		1,25	0,04	0,06	0,04	0,25	1,03	0,97	
R		1,60	0,04	0,05	0,03	0,19	1,12	0,95	
H		1,29	0,07	0,32	0,07	1,00	1,50	1,00	
F		1,80	0,09	0,13	0,51	0,73	1,89	1,57	
Y		1,89	0,09	0,13	1,00	0,62	1,79	1,42	
W		2,41	0,10	0,24	0,32	0,54	2,36	2,03	
N		1,01	0,17	0,21	0,03	1,04	1,46	1,36	
D		1,35	1,00	1,00	0,03	0,74	1,63	1,13	
E		1,25	0,22	0,29	0,03	0,38	1,83	1,34	
Q		1,16	0,07	0,10	0,04	0,44	1,49	1,26	

FIG. 25B

10nM (79G)

sv	G	S	K	S
par	—	E	H	V
N ^o	52	53	54	55
*	0,09	0,07	0,06	0,51
P	0,01	0,35	0,02	0,40
G	1,00	0,03	0,01	0,34
A	0,07	0,39	0,01	0,52
C	0,04	0,08	0,10	0,52
S	0,02	0,02	0,01	0,48
T	0,02	0,01	0,01	1,13
V	0,02	0,04	0,01	1,00
L	0,02	0,03	0,03	0,87
I	0,02	0,02	0,03	1,94
M	0,01	0,03	0,15	0,56
K	0,01	0,01	0,01	0,31
R	0,02	0,01	0,01	0,16
H	0,01	0,02	1,00	0,55
F	0,02	0,26	0,07	0,94
Y	0,02	0,03	0,05	1,10
W	0,03	0,10	0,03	1,12
N	0,01	0,01	0,02	0,73
D	0,02	0,10	0,01	0,74
E	0,01	1,00	0,01	0,62
Q	0,02	0,12	0,03	0,42

FIG. 26A

1nM (79G)

sv	G	S	K	S
par	—	E	H	V
N ^o	52	53	54	55
*	0,12	0,10	0,08	0,63
P	0,02	0,36	0,03	0,39
G	1,00	0,04	0,02	0,33
A	0,08	0,39	0,01	0,52
C	0,08	0,15	0,13	0,54
S	0,03	0,02	0,01	0,46
T	0,03	0,02	0,02	1,19
V	0,03	0,05	0,02	1,00
L	0,03	0,05	0,04	0,90
I	0,03	0,04	0,04	2,17
M	0,03	0,04	0,14	0,58
K	0,02	0,02	0,02	0,29
R	0,03	0,02	0,02	0,16
H	0,02	0,03	1,00	0,54
F	0,04	0,28	0,08	0,97
Y	0,03	0,04	0,06	1,15
W	0,05	0,12	0,04	1,16
N	0,02	0,02	0,02	0,73
D	0,04	0,10	0,02	0,75
E	0,02	1,00	0,01	0,62
Q	0,03	0,12	0,04	0,43

FIG. 26B

10nM (79A)

sv	G	S	K	S
par	—	E	H	V
N.º	52	53	54	55
*	0,19	0,10	0,11	0,79
P	0,02	0,07	0,03	0,13
G	1,00	0,03	0,02	0,12
A	0,03	0,18	0,02	0,23
C	0,10	0,13	0,07	0,25
S	0,03	0,03	0,02	0,20
T	0,03	0,02	0,02	0,99
V	0,03	0,05	0,02	1,00
L	0,04	0,05	0,03	0,75
I	0,04	0,06	0,03	2,29
M	0,03	0,04	0,03	0,42
K	0,02	0,03	0,02	0,15
R	0,03	0,03	0,02	0,05
H	0,03	0,02	1,00	0,31
F	0,04	0,08	0,03	0,90
Y	0,04	0,04	0,04	1,22
W	0,05	0,06	0,04	1,12
N	0,03	0,02	0,03	0,47
D	0,04	0,05	0,02	0,55
E	0,03	1,00	0,02	0,38
Q	0,04	0,05	0,03	0,20

FIG. 27A

1nM (79A)

sv	G	S	K	S
par	—	E	H	V
N.º	52	53	54	55
*	0,29	0,20	0,14	1,19
P	0,04	0,10	0,09	0,14
G	1,00	0,05	0,04	0,13
A	0,05	0,20	0,03	0,24
C	0,19	0,29	0,13	0,29
S	0,05	0,04	0,03	0,20
T	0,07	0,05	0,03	1,03
V	0,07	0,11	0,04	1,00
L	0,08	0,11	0,06	0,77
I	0,08	0,12	0,05	2,51
M	0,09	0,07	0,06	0,41
K	0,05	0,04	0,03	0,16
R	0,06	0,06	0,04	0,06
H	0,06	0,04	1,00	0,31
F	0,09	0,14	0,06	0,92
Y	0,08	0,09	0,06	1,27
W	0,12	0,10	0,07	1,17
N	0,05	0,04	0,05	0,48
D	0,07	0,07	0,04	0,55
E	0,06	1,00	0,03	0,37
Q	0,09	0,08	0,05	0,20

FIG. 27B

10nM (79G)

sv par N.º	G Y 77	R D 78	G — 79	D E 80	S K 81	P A 82	A — 83	S T 84	S D 85	K W 86	P S 87
*	0,09	0,22	0,05	0,96	0,75	0,11	0,25	0,31	0,32	0,61	0,75
P	0,01	0,28	0,10	0,19	0,24	0,78	0,35	0,65	0,33	0,02	0,26
G	0,01	0,34	1,00	1,45	0,89	0,88	1,39	0,69	0,44	0,41	1,38
A	0,02	0,53	0,43	1,57	1,12	1,00	1,00	0,86	0,69	0,09	1,49
C	0,03	0,54	0,83	1,72	1,12	0,75	1,49	1,14	0,46	0,22	1,49
S	0,03	0,61	0,71	1,66	1,38	1,27	1,58	0,92	0,83	0,22	1,00
T	0,01	0,73	0,68	1,71	1,34	0,88	1,59	1,00	0,60	0,10	1,55
V	0,01	0,57	0,46	1,86	1,30	1,22	1,53	1,45	0,69	0,02	1,56
L	0,02	0,57	0,77	1,86	1,19	1,01	1,31	1,45	0,42	0,05	1,58
I	0,01	0,59	0,48	1,96	1,19	1,49	1,39	1,36	0,64	0,02	1,53
M	0,01	0,65	0,74	1,90	1,11	0,99	1,49	1,23	0,62	0,05	1,63
K	0,01	0,70	0,64	1,47	1,00	2,09	1,75	1,06	0,85	0,08	1,79
R	0,01	0,72	0,70	2,09	1,62	1,97	1,57	1,20	0,38	0,14	1,86
H	0,03	0,54	0,64	2,01	1,43	0,85	1,62	0,87	0,49	0,28	1,59
F	0,72	0,71	0,67	2,36	1,43	1,82	1,60	1,10	0,43	0,60	1,48
Y	1,00	0,71	0,69	2,51	1,41	1,16	1,59	1,36	0,37	1,32	1,63
W	0,96	0,68	0,76	3,04	1,40	1,19	1,65	0,92	0,40	1,00	1,76
N	0,01	0,98	0,73	1,85	1,25	0,76	1,40	1,12	0,95	0,12	1,37
D	0,00	1,00	0,49	1,40	0,81	0,27	1,26	0,68	1,00	0,12	1,15
E	0,01	0,52	0,63	1,00	0,85	0,11	1,36	0,73	0,85	0,04	1,16
Q	0,00	0,54	0,68	1,63	1,11	0,78	1,60	1,12	0,78	0,05	1,47

FIG. 28

1nM (79G)

sv	G	R	G	D	S	P	A	S	S	K	P
par	Y	D	—	E	K	A	—	T	D	W	S
N.º	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
*	0,11	0,22	0,05	1,09	0,83	0,15	0,28	0,34	0,33	0,76	0,81
P	0,01	0,25	0,10	0,18	0,22	0,84	0,38	0,65	0,31	0,02	0,27
G	0,01	0,32	1,00	1,54	0,89	0,87	1,42	0,69	0,44	0,40	1,43
A	0,03	0,51	0,41	1,68	1,19	1,00	1,00	0,87	0,70	0,09	1,63
C	0,05	0,56	0,91	1,93	1,28	0,78	1,58	1,19	0,49	0,23	1,63
S	0,03	0,58	0,71	1,79	1,44	1,30	1,71	0,92	0,84	0,21	1,00
T	0,02	0,71	0,66	1,84	1,33	0,93	1,69	1,00	0,58	0,10	1,65
V	0,02	0,56	0,45	2,10	1,34	1,21	1,57	1,52	0,70	0,02	1,69
L	0,02	0,53	0,76	2,02	1,22	1,05	1,35	1,51	0,42	0,05	1,68
I	0,01	0,52	0,45	2,14	1,29	1,57	1,41	1,43	0,62	0,02	1,69
M	0,01	0,66	0,74	2,03	1,23	1,04	1,47	1,28	0,56	0,04	1,73
K	0,02	0,69	0,65	1,65	1,00	2,30	1,84	1,10	0,85	0,08	1,96
R	0,01	0,68	0,69	2,34	1,73	2,15	1,64	1,22	0,37	0,14	2,02
H	0,03	0,54	0,65	2,19	1,46	0,84	1,71	0,86	0,50	0,27	1,70
F	0,70	0,70	0,67	2,64	1,46	1,93	1,67	1,16	0,45	0,59	1,62
Y	1,00	0,69	0,68	2,95	1,40	1,21	1,72	1,39	0,41	1,41	1,72
W	0,91	0,62	0,77	3,72	1,48	1,26	1,71	0,89	0,39	1,00	1,87
N	0,01	0,93	0,74	2,06	1,40	0,71	1,50	1,19	1,00	0,11	1,47
D	0,01	1,00	0,49	1,52	0,79	0,24	1,30	0,64	1,00	0,12	1,29
E	0,01	0,51	0,68	1,00	0,87	0,12	1,36	0,74	0,91	0,04	1,17
Q	0,01	0,49	0,68	1,80	1,22	0,80	1,67	1,18	0,77	0,06	1,53

FIG. 29

10nM (79A)

sv par N.º	G Y 77	R D 78	G A 79	D E 80	S K 81	P A 82	A — 83	S T 84	S D 85	K W 86	P S 87
*	0,14	0,34	0,11	0,73	0,93	0,12	0,38	0,19	0,18	0,76	0,73
P	0,00	0,26	0,24	0,92	0,14	0,48	0,12	0,12	0,06	0,03	0,09
G	0,01	0,20	2,31	2,86	0,94	0,48	1,07	0,11	0,12	0,10	1,22
A	0,04	1,03	1,00	1,66	0,88	1,00	1,00	0,26	0,49	0,02	1,50
C	0,06	0,94	1,91	2,40	1,05	0,71	1,68	0,57	0,24	0,09	1,55
S	0,03	0,89	1,65	1,67	1,02	1,12	1,85	0,34	0,59	0,05	1,00
T	0,02	1,02	1,57	1,56	1,30	1,33	1,75	1,00	0,24	0,03	1,57
V	0,02	1,36	1,06	2,17	1,37	1,34	1,83	1,49	0,44	0,02	1,65
L	0,03	1,16	1,78	1,95	1,02	1,51	1,33	0,94	0,18	0,03	1,64
I	0,01	1,47	1,11	2,22	1,32	1,85	1,60	1,35	0,37	0,03	1,76
M	0,03	1,38	1,72	2,18	1,04	0,91	1,58	0,75	0,33	0,03	1,73
K	0,01	1,68	1,48	1,90	1,00	2,52	1,74	0,32	0,50	0,03	1,81
R	0,04	1,56	1,62	2,52	1,64	2,89	2,00	0,29	0,16	0,05	1,96
H	0,02	1,16	1,47	2,61	1,29	0,81	1,80	0,23	0,22	0,04	1,47
F	0,72	1,83	1,56	3,04	1,04	2,42	1,83	0,35	0,10	0,16	1,76
Y	1,00	1,76	1,61	3,30	1,06	1,79	1,74	0,66	0,18	0,99	1,78
W	1,34	1,42	1,75	3,78	0,99	1,89	1,43	0,17	0,11	1,00	1,85
N	0,02	1,09	1,68	2,21	0,92	0,62	1,51	0,73	0,69	0,02	1,18
D	0,02	1,00	1,12	1,65	0,42	0,38	1,02	0,31	1,00	0,02	1,01
E	0,01	1,13	1,46	1,00	0,68	0,13	1,37	0,34	0,74	0,03	1,02
Q	0,01	1,20	1,58	1,85	1,21	0,61	1,93	0,56	0,54	0,02	1,55

FIG. 30

1nM (79A)

sv par N.º	G Y 77	R D 78	G A 79	D E 80	S K 81	P A 82	A — 83	S T 84	S D 85	K W 86	P S 87
*	0,15	0,32	0,12	0,80	1,07	0,27	0,25	0,24	0,25	0,69	0,96
P	0,02	0,27	0,25	0,95	0,17	0,54	0,18	0,14	0,07	0,04	0,11
G	0,02	0,20	2,46	3,08	0,96	0,48	1,09	0,14	0,14	0,11	1,26
A	0,04	1,02	1,00	1,63	0,80	1,00	1,00	0,26	0,53	0,02	1,59
C	0,13	0,97	2,23	2,74	1,28	0,90	1,74	0,62	0,32	0,16	1,63
S	0,03	0,84	1,74	1,81	1,05	1,14	1,87	0,31	0,62	0,06	1,00
T	0,02	0,99	1,63	1,66	1,35	1,37	1,85	1,00	0,28	0,03	1,66
V	0,03	1,37	1,11	2,36	1,40	1,36	1,87	1,54	0,47	0,03	1,79
L	0,03	1,13	1,88	1,99	1,04	1,59	1,36	0,98	0,21	0,05	1,74
I	0,03	1,43	1,11	2,34	1,40	1,97	1,63	1,44	0,43	0,03	1,93
M	0,04	1,42	1,81	2,25	1,08	0,91	1,57	0,77	0,33	0,04	1,75
K	0,03	1,62	1,60	2,03	1,00	2,75	1,89	0,39	0,56	0,05	1,90
R	0,04	1,56	1,70	2,77	1,76	3,18	1,96	0,28	0,19	0,07	2,00
H	0,03	1,11	1,61	2,60	1,35	0,76	1,93	0,22	0,20	0,05	1,47
F	0,68	1,77	1,64	3,42	1,06	2,66	1,84	0,35	0,20	0,16	1,85
Y	1,00	1,67	1,67	3,54	1,11	1,92	1,73	0,65	0,22	1,02	1,89
W	1,30	1,42	1,89	4,17	1,00	2,06	1,47	0,22	0,18	1,00	1,96
N	0,02	1,07	1,82	2,41	0,93	0,54	1,64	0,71	0,64	0,04	1,22
D	0,02	1,00	1,21	1,76	0,42	0,34	0,98	0,35	1,00	0,02	1,13
E	0,02	1,18	1,68	1,00	0,73	0,17	1,40	0,35	0,78	0,04	1,14
Q	0,03	1,22	1,66	1,92	1,16	0,63	1,87	0,51	0,56	0,04	1,72

FIG. 31