

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 822 431**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/54** (2006.01)

**A61K 38/20** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/745** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2016 PCT/EP2016/050456**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2016 WO16113246**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2016 E 16700424 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3245224**

54 Título: **Polipéptidos de unión a IL-17A**

30 Prioridad:

**12.01.2015 EP 15150786**

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

**04.05.2021**

73 Titular/es:

**AFFIBODY AB (100.0%)  
Scheeles väg 2  
171 65 Solna, SE**

72 Inventor/es:

**FREJD, FREDRIK;  
FELDWISCH, JOACHIM;  
KLINT, SUSANNE y  
GUDMUNSDOTTER, LINDVI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones:**

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

ES 2 822 431 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

Polipéptidos de unión a IL-17A

## 5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a una clase de polipéptidos modificados genéticamente que tienen una afinidad de unión por la interleucina 17A (en lo sucesivo denominada IL-17A). La presente divulgación también se refiere al uso de dicho polipéptido de unión a interleucina 17A como agente de diagnóstico, pronóstico y/o terapéutico.

10

## Antecedentes

La familia de la interleucina 17 (IL-17) es una familia de citoquinas proinflamatorias que contribuye a la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias. Una fuente importante de IL-17 es un linaje de células T conocidas como células T 17 cooperadoras (células Th17), que son distintas de los subconjuntos de células Th1 y Th2 clásicas. Los resultados de estudios en modelos de ratón y en humanos han identificado un papel clave de IL-17 y de las células Th17 en la patogénesis de la inflamación y la autoinmunidad, así como en la defensa del huésped contra ciertos patógenos. Con base en estas observaciones, IL-17 y las células Th17 se consideran objetivos interesantes para el tratamiento de varias enfermedades inflamatorias crónicas como la psoriasis, la artritis reumatoide (RA), la espondilitis anquilosante (AS), el lupus eritematoso sistémico (SLE) y la esclerosis múltiple (MS) (Miossec y Kolls, 2012, Nat Rev Drug Discov 11: 763-7).

La citoquina homodimérica IL-17A unida por disulfuro es un miembro de la familia IL-17, que también incluye IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. Dentro de la familia, IL-17A e IL-17F muestran la mayor homología de secuencia de aminoácidos entre sí (50%) y se unen a los mismos receptores: receptor A de IL-17 (IL-17RA) y receptor C de IL-17 (IL-17RC). Además, IL-17A se puede expresar con IL-17F como heterodímero. Aunque IL-17A e IL-17F comparten una alta homología de secuencia de aminoácidos, realizan funciones distintas. IL-17A está involucrada en el desarrollo de autoinmunidad, inflamación y tumores y también juega un papel importante en la defensa del huésped contra infecciones bacterianas y fúngicas. IL-17F, por otro lado, está involucrado principalmente en los mecanismos de defensa del huésped en la mucosa (Iwakura et al., 2011, Immunity 34: 149-62).

Cuando se secreta IL-17A, promueve la producción de una variedad de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, péptidos antimicrobianos y metaloproteinasas (MMP) de fibroblasto, células endoteliales y epiteliales. Una acción importante de IL-17A es inducir granulopoyesis y reclutamiento de neutrófilos a sitios inflamatorios. Sin embargo, si no se controla, esta reacción puede conducir a una inflamación crónica con destrucción tisular y neovascularización (Iwakura et al., 2008, Immunol Rev 226: 57-79; Reynolds et al. 2010, Cytokine Growth Factor Rev 21: 413-23). La IL-17A es fundamental en la patogenia de la psoriasis, una enfermedad cutánea inflamatoria crónica común que afecta aproximadamente al 2,5% de la población mundial (revisado en Chiricozzi y Krueger, 2013, Expert Opin. Investig. Drugs 22 (8): 993-1005). Los estudios en pacientes con RA han demostrado que hay células positivas para IL-17A en la membrana sinovial inflamada. En un modelo de ratón de RA, las puntuaciones clínicas se agravaron severamente por la administración de IL-17A mediante transferencia génica intraarticular (Lubbets et al., 2002, Inflamm Res 51: 102-4). Por el contrario, la inhibición de IL-17A con anticuerpos monoclonales contra el ligando o el receptor protegió contra el desarrollo y las consecuencias de la artritis (Lubbets et al., 2004, Arthritis Rheum 50: 650-9). En pacientes con MS, se ha informado que el gen de IL-17A está sobreexpresado (Lock et al., 2002, Nat Med 8: 500-8) y IL-17A y las células Th17 han sido claramente implicadas en el modelo de ratón de encefalitis autoinmune experimental (Cua et al., 2003, Nature 421: 744-8; Uyttenhove y Van Snick 2006, Eur J Immunol 36: 2868-74). Se ha demostrado que los niveles elevados de IL-17A se correlacionan clínicamente con diversas enfermedades inflamatorias oculares, tales como uveítis, escleritis y enfermedad del ojo seco (DED) en pacientes que padecen artritis (Kang et al., 2011, J Korean Med Sci 26: 938-44). Estudios recientes han mostrado células positivas para IL-17 e IFN $\gamma$  en muestras clínicas de aterosclerosis coronaria, lo que sugiere un efecto local sobre la disfunción de los vasos (Eid et al. 2009, J Cardiothorac Surg 4:58). IL-17A también puede ser de interés en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). El número de células positivas para IL-17A aumenta en los tejidos pulmonares de pacientes con EPOC (Chu et al., 2011, Int Immunopharmacol 11: 1780-8; Di Stefano et al., 2009, Clin Exp Immunol 157: 316-24). Los ratones deficientes en IL-17RA son resistentes al desarrollo de enfisema en un modelo de ratón de EPOC, mientras que la sobreexpresión de IL-17A acelera el desarrollo de enfisema, lo que sugiere que IL-17A es suficiente para mediar esta respuesta (Chen et al., 2011, PLoS One 6: e20333; Shan et al. 2012, Sci Transl Med 4: 117ra9). Por lo tanto, la implicación de IL-17A en varias enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias diferentes sugiere una amplia aplicabilidad de las terapias dirigidas a IL-17A.

El direccionamiento de IL-17A o sus receptores es la forma más directa de bloquear las funciones mediadas por IL-17A. Actualmente, se encuentran en desarrollo clínico varios productos biológicos que neutralizan la señalización de IL-17A, incluidos los anticuerpos monoclonales anti-IL-17A secukinumab e ixekizumab (Patel et al., 2013, Ann Rheum Dis 72 Supl 2: ii116-23). Secukinumab ha sido aprobado para el tratamiento de la psoriasis y actualmente se investiga para el tratamiento de la artritis psoriásica (PsA) y AS. Ixekizumab se encuentra actualmente en ensayos clínicos para psoriasis, PsA y RA. El bloqueo de la señalización mediada por el receptor de IL-17 también se está investigando en clínica, incluido el anticuerpo monoclonal humano anti-IL-17RA brodalumab para el tratamiento de la psoriasis, RA y

asma (Hu et al., 2011, Ann NY Acad Sci 1217: 60- 76). Por lo tanto, la eficacia clínica de la inhibición de IL-17A se ha demostrado en diferentes enfermedades, especialmente en psoriasis, y el perfil de seguridad, incluidos los datos de fase II y III, muestra una buena tolerabilidad para los inhibidores de IL-17A (Genovese et al., 2010, Arthritis Rheum 62: 929-39 y Hueber et al., 2010, Sci Transl Med 2: 52ra72). Otros anticuerpos que se dirigen a IL-17A se divulgan en el documento EP2403531.

El documento US2014/0205613 divulga un método para determinar la eficacia de la terapia de combinación anti-TNF y anti-IL-17, en el que una larga lista de posibles proteínas que podrían unirse a TNF y/o IL-17 incluyen moléculas Affibody.

Los documentos EP2597102, EP2711016 y Silacci et al., (2014) J Biol Chem 289: 14392-14398 todos divulgan variantes de unión a IL-17A del dominio SH3 de quinasa Fyn humana, es decir, "fynómeros".

En FEBS J 275: 2668-2676 (2008), Nygren revisa las proteínas de unión designadas como moléculas Affibody. Las moléculas Affibody con afinidad por varios objetivos, sin incluir IL-17A, se divulgan en Wahlberg et al (2003) PNAS 100: 3185-3190 (afinidad por la proteína A estafilocócica), en Grimm et al., (2010) New Biotechnol 27: 766- 773 (afinidad por H-Ras o Raf-1), en el documento WO2013/126006 (afinidad por C5), en el documento WO2011/110515 (afinidad por la parte Fc de los anticuerpos), en el documento WO2014/064237 (afinidad por ABD), en el documento WO2009/077175 (afinidad por PDGF-R $\beta$ ) y en el documento WO2014/140366 (afinidad por FcRn).

La naturaleza impredecible y crónica de la psoriasis y otras enfermedades inflamatorias, así como una gran necesidad médica insatisfecha, justifica el desarrollo de nuevos modos de tratamiento.

Dado que la velocidad de penetración en el tejido está asociada negativamente con el tamaño de la molécula, una molécula de anticuerpo relativamente grande tiene inherentemente una distribución tisular y una capacidad de penetración deficientes. Además, aunque los anticuerpos se utilizan ampliamente en una variedad de contextos de rutina debido a su alta afinidad y especificidad por una multitud de posibles antígenos, tales como para fines analíticos, de purificación, de diagnóstico y terapéuticos, todavía adolecen de varios inconvenientes. Dichos inconvenientes incluyen la necesidad de sistemas de expresión de mamíferos complejos, tendencias de agregación, solubilidad limitada, necesidad de formar y mantener de forma estable enlaces disulfuro y el riesgo de respuestas inmunes no deseadas.

Por lo tanto, el uso de anticuerpos monoclonales no siempre es óptimo para la terapia, y existe una necesidad continua de proporcionar agentes con una alta afinidad por IL-17A. También es de gran interés la provisión de usos de tales moléculas en el tratamiento, diagnóstico y pronóstico de enfermedades.

#### Sumario de la invención

Es un objeto de la presente divulgación proporcionar nuevos agentes de unión a IL-17A, que podrían usarse, por ejemplo, para aplicaciones de diagnóstico, pronóstico y terapéuticas.

Es un objetivo de la presente divulgación proporcionar nuevos agentes de unión a IL-17A, que se pueden usar como dominios en proteínas de fusión que comprenden uno o más dominios adicionales que tienen funciones similares u otras.

Es un objetivo de la presente divulgación proporcionar una molécula que permita una terapia eficaz dirigida a diversas formas de enfermedades inflamatorias y autoinmunes al tiempo que alivia los inconvenientes mencionados anteriormente y otros de las terapias actuales.

Otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar una molécula adecuada para aplicaciones de diagnóstico y pronóstico.

Estos y otros objetivos que son evidentes para el experto en la presente divulgación se cumplen mediante diferentes aspectos de la invención según se reivindica en las reivindicaciones adjuntas y como se divulga en general en el presente documento.

Por lo tanto, en el primer aspecto de la divulgación, se proporciona un polipéptido de unión a IL-17A, que comprende un motivo de unión a IL-17A *BM*, cuyo motivo consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

i) EX<sub>2</sub>DX<sub>4</sub>AX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>EIX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>LPNL X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>QX<sub>20</sub>X<sub>21</sub>AFIX<sub>25</sub> X<sub>26</sub>LX<sub>28</sub>X<sub>29</sub>  
en la que, independientemente unos de otros,

X<sub>2</sub>: es A;

X<sub>4</sub>: se selecciona de D y Q;

X<sub>6</sub>: es A;

X<sub>7</sub>: es V;

X<sub>10</sub>: es A;  
 X<sub>11</sub>: se selecciona de A, D y S;  
 X<sub>16</sub>: se selecciona de N y T;  
 X<sub>17</sub>: es W;  
 5 X<sub>18</sub>: se selecciona de A y D;  
 X<sub>20</sub>: es W;  
 X<sub>21</sub>: se selecciona de F e Y;  
 X<sub>25</sub>: se selecciona de Q y S;  
 X<sub>26</sub>: se selecciona de K y S;  
 10 X<sub>28</sub>: es R; y  
 X<sub>29</sub>: es D,

en la que la secuencia i) corresponde a la secuencia desde la posición 8 a la posición 36 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-1216; y

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 89% de identidad con la secuencia definida en i), siempre que cualquier polipéptido de unión a IL-17A que comprenda una *BM* como se define en ii) sea capaz de unirse a IL-17A de manera que el valor de  $K_D$  de la interacción sea como máximo  $1 \times 10^{-8}$  M.

La definición anterior de una clase de polipéptidos de unión a IL-17A relacionados con la secuencia se basa en un análisis estadístico de una serie de variantes polipeptídicas aleatorias de un armazón parental, que se seleccionaron por su interacción con IL-17A en varios experimentos de selección diferentes. El motivo de unión a IL-17A identificado, o "*BM*", corresponde a la región de unión al objetivo del armazón parental, cuya región constituye dos hélices alfa dentro de un dominio de proteína de haz de tres hélices. En el armazón parental, los diversos residuos de aminoácidos de las dos hélices *BM* constituyen una superficie de unión para la interacción con la parte *Fc* constante de los anticuerpos. En la presente divulgación, la variación aleatoria de los residuos de la superficie de unión y la posterior selección de variantes han reemplazado la capacidad de interacción de *Fc* con una capacidad de interacción con IL-17A.

Como comprenderá el experto en la materia, la función de cualquier polipéptido, tal como la capacidad de unión a IL-17A del polipéptido de la presente divulgación, depende de la estructura terciaria del polipéptido. Por lo tanto, es posible realizar cambios menores en la secuencia de aminoácidos en un polipéptido sin afectar su función. Por lo tanto, la divulgación abarca variantes modificadas del polipéptido de unión a IL-17A, que son tales que se conservan las características de unión a IL-17A.

De esta manera, también se incluye en la presente divulgación un polipéptido de unión a IL-17A que comprende una secuencia de aminoácidos con un 89% o más de identidad con un polipéptido como se define en i). En algunas realizaciones, el polipéptido puede comprender una secuencia que sea al menos 93%, tal como al menos 96% idéntica a un polipéptido como se define en i). Por ejemplo, es posible que un residuo de aminoácido que pertenece a un determinado grupo funcional de residuos de aminoácidos (por ejemplo, hidrófobo, hidrófilo, polar, etc.) pueda intercambiarse por otro residuo de aminoácido del mismo grupo funcional.

En algunas realizaciones, tales cambios se pueden realizar en cualquier posición de la secuencia del polipéptido de unión a IL-17A como se divulga en el presente documento. En otras realizaciones, tales cambios pueden realizarse solo en las posiciones no variables, también indicadas como residuos de aminoácidos de armazón. En tales casos, no se permiten cambios en las posiciones variables, es decir, posiciones indicadas con una "X" en la secuencia i).

El término "% de identidad", como se usa en toda la memoria descriptiva, puede calcularse, por ejemplo, como sigue. La secuencia de consulta se alinea con la secuencia objetivo utilizando el algoritmo CLUSTAL W (Thompson et al., Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680 (1994)). Se realiza una comparación sobre la ventana correspondiente a la más corta de las secuencias alineadas. La más corta de las secuencias alineadas puede ser en algunos casos la secuencia objetivo. En otros casos, la secuencia de consulta puede constituir la más corta de las secuencias alineadas. Los residuos de aminoácidos en cada posición se comparan y el porcentaje de posiciones en la secuencia de consulta que tienen correspondencias idénticas en la secuencia objetivo se informa como % de identidad.

"X<sub>n</sub>" y "X<sub>m</sub>" se utilizan en el presente documento para indicar los aminoácidos en las posiciones n y m en la secuencia i) como se definió anteriormente, en la que n y m son números enteros que indican la posición de un aminoácido dentro de la secuencia i) como se cuenta desde el terminal N. Por ejemplo, X<sub>3</sub> y X<sub>7</sub> indican los aminoácidos en las posiciones tres y siete, respectivamente, desde el extremo terminal N de la secuencia i).

En las realizaciones de acuerdo con el primer aspecto, se proporcionan polipéptidos en los que X<sub>n</sub> en la secuencia i) se selecciona independientemente de un grupo de posibles residuos enumerados en la Tabla 1. El experto apreciará que X<sub>n</sub> se puede seleccionar de cualquiera de los grupos enumerados de posibles residuos y que esta selección es independiente de la selección de aminoácidos en X<sub>m</sub>, en la que n ≠ m. Por lo tanto, cualquiera de los posibles residuos enumerados en la posición X<sub>n</sub> en la Tabla 1 puede combinarse independientemente con cualquiera de los posibles residuos enumerados en cualquier otra posición variable en la Tabla 1.

El experto en la materia apreciará que la Tabla 1 debe leerse como sigue: En una realización de acuerdo con el primer aspecto, se proporciona un polipéptido en el que el residuo de aminoácido "X<sub>n</sub>" en la secuencia i) se selecciona de "Residuos posibles". Por lo tanto, la Tabla 1 divulga varias realizaciones específicas e individualizadas del primer aspecto de la presente divulgación.

5

Tabla 1:

X <sub>n</sub>	Residuos posibles
X <sub>2</sub>	A
X <sub>4</sub>	D, Q
X <sub>4</sub>	D
X <sub>4</sub>	Q
X <sub>6</sub>	A
X <sub>7</sub>	V
X <sub>10</sub>	A
X <sub>11</sub>	A, D, S
X <sub>11</sub>	A, S
X <sub>11</sub>	A, D
X <sub>11</sub>	D, S
X <sub>11</sub>	D
X <sub>11</sub>	S
X <sub>11</sub>	A
X <sub>16</sub>	T
X <sub>16</sub>	N
X <sub>17</sub>	w
X <sub>18</sub>	A, D
X <sub>18</sub>	D
X <sub>18</sub>	A
X <sub>20</sub>	W
X <sub>21</sub>	F, Y
X <sub>21</sub>	Y
X <sub>21</sub>	F
X <sub>25</sub>	Q, S
X <sub>25</sub>	Q
X <sub>25</sub>	S
X <sub>26</sub>	K
X <sub>26</sub>	S
X <sub>28</sub>	R
X <sub>29</sub>	D

Como se describe en detalle en la sección experimental que sigue, la selección de variantes de polipéptidos de unión a IL-17A ha conducido a la identificación de varias secuencias individuales de motivos de unión (BM) a IL-17A. Estas secuencias constituyen realizaciones individuales de la secuencia i) de acuerdo con este aspecto. Las secuencias de los motivos de unión individuales a IL-17A corresponden a las posiciones de aminoácidos 8-36 en la SEQ ID NO: 1-1216 presentadas en la Figura 1. Por lo tanto, en el polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con este aspecto, la secuencia i) corresponde a la secuencia desde la posición 8 a la posición 36 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-1216. En una realización, la secuencia i) corresponde a la secuencia desde la

10

posición 8 a la posición 36 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-66, 1200, 1206 y 1214. En una realización, la secuencia i) corresponde a la secuencia desde la posición 8 a la posición 36 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-66. En una realización, la secuencia i) corresponde a la secuencia desde la posición 8 a la posición 36 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-35. En una realización, la secuencia i) corresponde a la secuencia desde la posición 8 a la posición 36 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-27. En una realización, la secuencia i) corresponde a la secuencia desde la posición 8 a la posición 36 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-10. En una realización, la secuencia i) corresponde a la secuencia desde la posición 8 a la posición 36 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-7. En una realización, la secuencia i) corresponde a la secuencia desde la posición 8 a la posición 36 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-4. En una realización, la secuencia i) corresponde a la secuencia desde la posición 8 a la posición 36 en la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el *BM* como se definió anteriormente "forma parte de" un dominio de proteína de haz de tres hélices. Se entiende que esto significa que la secuencia del *BM* se "inserta" o se "injerta" en la secuencia del dominio de haz de tres hélices original, de manera que el *BM* reemplaza un motivo estructural similar en el dominio original. Por ejemplo, sin desear estar ligado a la teoría, se cree que el *BM* constituye dos de las tres hélices de un haz de tres hélices y, por lo tanto, puede reemplazar dicho motivo de dos hélices dentro de cualquier haz de tres hélices. Como comprenderá el experto en la materia, la sustitución de dos hélices del dominio del haz de tres hélices por las dos hélices de *BM* debe realizarse para no afectar a la estructura básica del polipéptido. Es decir, el plegamiento global de la cadena principal de C $\alpha$  del polipéptido de acuerdo con esta realización de la invención es sustancialmente el mismo que el del dominio de proteína del haz de tres hélices del que forma parte, por ejemplo, que tiene los mismos elementos de estructura secundaria en el mismo orden, etc. Por lo tanto, un *BM* de acuerdo con la divulgación "forma parte" de un dominio de haz de tres hélices si el polipéptido de acuerdo con esta realización del aspecto tiene el mismo pliegue que el dominio original, lo que implica que las propiedades estructurales básicas son compartidas, por ejemplo, resultando esas propiedades, en espectros de CD similares. El experto en la materia conoce otros parámetros que son relevantes.

En realizaciones particulares, el motivo de unión (*BM*) a IL-17A forma por tanto parte de un dominio de proteína de haz de tres hélices. Por ejemplo, el *BM* puede constituir esencialmente dos hélices alfa con un bucle de interconexión, dentro de dicho dominio de proteína de haz de tres hélices. En realizaciones particulares, dicho dominio de proteína de haz de tres hélices se selecciona de dominios de proteínas receptoras bacterianas. Ejemplos no limitantes de tales dominios son los cinco dominios de tres hélices diferentes de la Proteína A de *Staphylococcus aureus*, tal como el dominio B, y sus derivados. En algunas realizaciones, el dominio de proteína de haz de tres hélices es una variante de la proteína Z, que se deriva del dominio B de la proteína A estafilocócica.

En algunas realizaciones en las que el polipéptido de unión a IL-17A como se divulga en este documento forma parte de un dominio de proteína de haz de tres hélices, el polipéptido de unión a IL-17A puede comprender un módulo de unión (*BMod*) de la secuencia de aminoácidos definido como:  
K-[*BM*]-DPSQS X<sub>a</sub>X<sub>b</sub>LLX<sub>c</sub> EAKKL X<sub>d</sub>X<sub>e</sub>X<sub>f</sub>Q;  
en el que

[*BM*] es un motivo de unión a IL-17A como se define en el presente documento, siempre que X<sub>29</sub> sea D;  
X<sub>a</sub> se selecciona de A y S;  
X<sub>b</sub> se selecciona de N y E;  
X<sub>c</sub> se selecciona de A, S y C;  
X<sub>d</sub> se selecciona de E, N y S;  
X<sub>e</sub> se selecciona de D, E y S;  
X<sub>f</sub> se selecciona de A y S. En una realización, X<sub>a</sub> es A.

En una realización, X<sub>a</sub> es S.

En una realización, X<sub>b</sub> es N.

En una realización, X<sub>b</sub> es E.

En una realización, X<sub>c</sub> es A.

En una realización, X<sub>c</sub> es S.

En una realización, X<sub>c</sub> es C.

En una realización, X<sub>d</sub> es E.

En una realización, X<sub>d</sub> es N.

- En una realización,  $X_d$  es S.
- En una realización,  $X_e$  es D.
- 5 En una realización,  $X_e$  es E.
- En una realización,  $X_e$  es S.
- 10 En una realización,  $X_dX_e$  se selecciona de EE, ES, SD, SE y SS.
- En una realización,  $X_dX_e$  es ES.
- En una realización,  $X_dX_e$  es SE.
- 15 En una realización,  $X_dX_e$  es SD.
- En una realización,  $X_f$  es A.
- En una realización,  $X_f$  es S.
- 20 En una realización,  $X_a$  es A;  $X_b$  es N;  $X_c$  es A y  $X_f$  es A.
- En una realización,  $X_a$  es S;  $X_b$  es E;  $X_c$  es A y  $X_f$  es A.
- 25 En una realización,  $X_a$  es A;  $X_b$  es N;  $X_c$  es C y  $X_f$  es A.
- En una realización,  $X_a$  es S;  $X_b$  es E;  $X_c$  es S y  $X_f$  es S.
- En una realización,  $X_a$  es S;  $X_b$  es E;  $X_c$  es S y  $X_f$  es A.
- 30 En una realización,  $X_a$  es S;  $X_b$  es E;  $X_c$  es A y  $X_f$  es S.
- En una realización,  $X_a$  es S;  $X_b$  es E;  $X_c$  es C y  $X_f$  es S.
- 35 En una realización,  $X_a$  es A;  $X_b$  es N;  $X_c$  es A;  $X_dX_e$  es ND y  $X_f$  es A.
- En una realización,  $X_a$  es S;  $X_b$  es E;  $X_c$  es A;  $X_dX_e$  es ND y  $X_f$  es A.
- En una realización,  $X_a$  es A;  $X_b$  es N;  $X_c$  es C;  $X_dX_e$  es ND y  $X_f$  es A.
- 40 En una realización,  $X_a$  es S;  $X_b$  es E;  $X_c$  es S;  $X_dX_e$  es ND y  $X_f$  es S.
- En una realización,  $X_a$  es S;  $X_b$  es E;  $X_c$  es S;  $X_dX_e$  es ND y  $X_f$  es A.
- 45 En una realización,  $X_a$  es S;  $X_b$  es E;  $X_c$  es C;  $X_dX_e$  es ND y  $X_f$  es S.
- En una realización,  $X_a$  es A;  $X_b$  es N;  $X_c$  es A;  $X_dX_e$  es SE y  $X_f$  es A.
- En una realización,  $X_a$  es S;  $X_b$  es E;  $X_c$  es A;  $X_dX_e$  es SE y  $X_f$  es A.
- 50 En una realización,  $X_a$  es A;  $X_b$  es N;  $X_c$  es C;  $X_dX_e$  es SE y  $X_f$  es A.
- En una realización,  $X_a$  es S;  $X_b$  es E;  $X_c$  es S;  $X_dX_e$  es SE y  $X_f$  es S.
- 55 En una realización,  $X_a$  es S;  $X_b$  es E;  $X_c$  es A;  $X_dX_e$  es SE y  $X_f$  es S.
- En una realización,  $X_a$  es S;  $X_b$  es E;  $X_c$  es C;  $X_dX_e$  es SE y  $X_f$  es S.
- En una realización,  $X_a$  es A;  $X_b$  es N;  $X_c$  es A;  $X_dX_e$  es ES y  $X_f$  es A.
- 60 En una realización,  $X_a$  es S;  $X_b$  es E;  $X_c$  es A;  $X_dX_e$  es ES y  $X_f$  es A.
- En una realización,  $X_a$  es A;  $X_b$  es N;  $X_c$  es C;  $X_dX_e$  es ES y  $X_f$  es A.
- 65 En una realización,  $X_a$  es S;  $X_b$  es E;  $X_c$  es S;  $X_dX_e$  es ES y  $X_f$  es S.

En una realización, X<sub>a</sub> es S; X<sub>b</sub> es E; X<sub>c</sub> es C; X<sub>d</sub>X<sub>e</sub> es ES y X<sub>f</sub> es S.

En una realización, X<sub>a</sub> es A; X<sub>b</sub> es N; X<sub>c</sub> es A; X<sub>d</sub>X<sub>e</sub> es SD y X<sub>f</sub> es A.

5 En una realización, X<sub>a</sub> es S; X<sub>b</sub> es E; X<sub>c</sub> es A; X<sub>d</sub>X<sub>e</sub> es SD y X<sub>f</sub> es A.

En una realización, X<sub>a</sub> es A; X<sub>b</sub> es N; X<sub>c</sub> es C; X<sub>d</sub>X<sub>e</sub> es SD y X<sub>f</sub> es A.

10 En una realización, X<sub>a</sub> es S; X<sub>b</sub> es E; X<sub>c</sub> es S; X<sub>d</sub>X<sub>e</sub> es SD y X<sub>f</sub> es S.

En una realización, X<sub>a</sub> es S; X<sub>b</sub> es E; X<sub>c</sub> es A; X<sub>d</sub>X<sub>e</sub> es SD y X<sub>f</sub> es S.

En una realización, X<sub>a</sub> es S; X<sub>b</sub> es E; X<sub>c</sub> es C; X<sub>d</sub>X<sub>e</sub> es SD y X<sub>f</sub> es S.

15 En otra realización más, *Bmod* corresponde a la secuencia desde la posición 7 a la posición 55 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-1216. En una realización, *Bmod* corresponde a la secuencia desde la posición 7 a la posición 55 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-66, 1200, 1206 y 1214. En una realización, *Bmod* corresponde a la secuencia desde la posición 7 a la posición 55 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-66. En una realización, *Bmod* corresponde a la secuencia desde la posición 7 a la posición 55 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-35. En otra realización, *Bmod* corresponde a la secuencia desde la posición 7 a la posición 55 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-27. En una realización, *Bmod* corresponde a la secuencia desde la posición 7 a la posición 55 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-10. En otra realización más, *Bmod* corresponde a la secuencia desde la posición 7 a la posición 55 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-7. En una realización, *Bmod* corresponde a la secuencia desde la posición 7 a la posición 55 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-4 y en otra realización, *Bmod* corresponde a la secuencia desde la posición 7 a la posición 55 en la SEQ ID NO: 1.

30 Además, en una realización adicional, se proporciona un polipéptido de unión a IL-17A, que comprende la secuencia de aminoácidos:  
YA-[*BMod*]-AP;  
en la que [*BMod*] es un módulo de unión a IL-17A como se definió anteriormente.

35 En algunas realizaciones, el motivo de unión a IL-17A puede formar parte de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre

SEQ ID NO:

- 1250 ADNNFNK-[*BM*]-DPSQSANLLSEAKKLNESQAPK;
- 1251 ADNKFNK-[*BM*]-DPSQSANLLAEAKKLNDQAQAPK;
- 40 1252 ADNKFNK-[*BM*]-DPSVSKEILAEAKKLNDQAQAPK;
- 1253 ADAQQNNFNK-[*BM*]-DPSQSTNVLGEAKKLNESQAPK;
- 1254 AQHDE-[*BM*]-DPSQSANVLGEAQLNDSQAPK;
- 1255 VDNKFNK-[*BM*]-DPSQSANLLAEAKKLNDQAQAPK;
- 1256 AEAKYAK-[*BM*]-DPSESSELLSEAKKLNSQAPK;
- 45 1257 VDAKYAK-[*BM*]-DPSQSSELLAEAKKLNDQAQAPK;
- 1258 VDAKYAK-[*BM*]-DPSQSSELLAEAKKLNDSQAPK;
- 1259 AEAKYAK-[*BM*]-DPSQSSELLSEAKKLNSQAPK;
- 1260 AEAKYAK-[*BM*]-DPSQSSELLSEAKKLNSQAP;
- 1261 AEAKYAK-[*BM*]-DPSQSSELLSEAKKLNDQAQAPK;
- 50 1262 AEAKYAK-[*BM*]-DPSQSSELLSEAKKLNDQAQAP;
- 1263 AEAKFAK-[*BM*]-DPSQSSELLSEAKKLNSQAPK;
- 1264 AEAKFAK-[*BM*]-DPSQSSELLSEAKKLNSQAP;
- 1265 AEAKYAK-[*BM*]-DPSQSSELLAEAKKLNDQAQAPK;
- 1266 AEAKYAK-[*BM*]-DPSQSSELLSEAKKLSAQAPK;
- 55 1267 AEAKYAK-[*BM*]-DPSQSSELLSEAKKLSAQAP;
- 1268 AEAKFAK-[*BM*]-DPSQSSELLSEAKKLSAQAPK;
- 1269 AEAKFAK-[*BM*]-DPSQSSELLSEAKKLSAQAP;
- 1270 AEAKYAK-[*BM*]-DPSQSSELLAEAKKLSEAQAPK;
- 1271 AEAKYAK-[*BM*]-QPEQSSELLSEAKKLSAQAPK;
- 60 1272 AEAKYAK-[*BM*]-DPSQSSELLSEAKKLESSQAPK;
- 1273 AEAKYAK-[*BM*]-DPSQSSELLSEAKKLESSQAP;
- 1274 AEAKYAK-[*BM*]-DPSQSSELLAEAKKLESAQAPK;
- 1275 AEAKYAK-[*BM*]-QPEQSSELLSEAKKLESSQAPK;
- 65 1276 AEAKYAK-[*BM*]-DPSQSSELLSEAKKLSDSQAPK;

(continuación)

SEQ ID NO:

	1277	AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSDSQAP;
5	1278	AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLSDSQAPK;
	1279	AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLSDAQAPK;
	1280	AEAKYAK-[BM]-QPEQSSELLSEAKKLSDSQAPK;
	1281	VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNSQAPK;
	1282	VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSAQAPK;
10	1283	VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLSAQAPK;
	1284	VDAKYAK-[BM]-QPEQSSELLSEAKKLSAQAPK;
	1285	VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLESSQAPK;
	1286	VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLESAQAPK;
	1287	VDAKYAK-[BM]-QPEQSSELLSEAKKLESSQAPK;
15	1288	VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSDSQAPK;
	1289	VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLSDSQAPK;
	1290	VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLSDAQAPK;
	1291	VDAKYAK-[BM]-QPEQSSELLSEAKKLSDSQAPK;
	1292	VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNSAQAPK;
20	1293	AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNSAQAPK; y
	1294	ADAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNSAQAPK;

en las que [BM] es un motivo de unión a IL-17A como se definió anteriormente.

25 En una realización, el polipéptido de unión a IL-17A comprende la secuencia de aminoácidos definida por:  
VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNSAQAPK;  
en la que [BM] es un motivo de unión a IL-17A como se definió anteriormente.

30 La secuencia comprendida en tal polipéptido puede seleccionarse del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-1216.  
En una realización, dicha secuencia se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-66, 1200, 1206 y 1214.  
En una realización, dicha secuencia se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-66. En una realización, dicha secuencia se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-35. En otra realización, dicha secuencia se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-27. En una realización, dicha secuencia se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-10. En una realización, dicha secuencia se selecciona de la SEQ ID NO: 1-7. En una  
35 realización, dicha secuencia se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-4. En una realización, dicha secuencia es la SEQ ID NO: 1.

En una realización, el polipéptido de unión a IL-17A comprende la secuencia de aminoácidos definida por:  
40 AEAKEYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNSAQAPK;  
en la que [BM] es un motivo de unión a IL-17A como se definió anteriormente.

La secuencia comprendida en tal polipéptido puede seleccionarse del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1217-1222. En una realización, dicha secuencia se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1218-1222. En una  
45 realización, dicha secuencia se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1219-1222. En otra realización, dicha secuencia se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1219 y la SEQ ID NO: 1222. En una realización, dicha secuencia es la SEQ ID NO: 1219.

El tamaño pequeño y la robustez de los dominios de unión a IL-17A de la presente divulgación confieren varias ventajas sobre las terapias convencionales basadas en anticuerpos monoclonales. Tales ventajas incluyen la posibilidad de administración subcutánea (sc) a dosis más altas que los anticuerpos, vías alternativas de administración, flexibilidad  
50 en el formato para una potencia superior y ausencia de efectos secundarios mediados por Fc. El tamaño pequeño combinado con el potencial de una solubilidad muy alta (> 100 mg/mL) y estabilidad permite cantidades molares extremas de fármaco en un volumen pequeño para inyecciones sc. Para administración sistémica, esto sugiere un tratamiento ambulatorio de "uso domiciliario" utilizando pequeñas jeringas precargadas o autoinyectores, con una  
55 administración de dosis baja y bien tolerada. Además, la capacidad para altas concentraciones molares en preparaciones de fármacos en combinación con la capacidad para retener la estabilidad funcional en diversas formulaciones se abre a las vías de administración tópicas (piel, ojos, pulmones). La psoriasis, el asma, la uveítis y el síndrome de ojo seco son ejemplos de indicaciones en las que las vías de administración alternativas podrían ser especialmente relevantes en la enfermedad mediada por IL-17A.

60 Los términos "unión a IL-17A" y "afinidad de unión por IL-17A" como se usan en esta memoria descriptiva se refieren a una propiedad de un polipéptido que se puede probar, por ejemplo, por ELISA, mediante el uso de resonancia de plasmón superficial (SPR) tecnología, o mediante el uso del ensayo de exclusión cinética (KinExA®). Por ejemplo, como se describe en los ejemplos siguientes, la afinidad de unión a IL-17A se puede probar en un experimento en el  
65 que las muestras del polipéptido se capturan en placas de ELISA recubiertas de anticuerpo y se añaden IL-17A biotinilada, seguida de HRP conjugada con estreptavidina. Se añade el sustrato TMB y se mide la absorbancia a 450

- nm usando un lector de placas de múltiples pozos, como Victor3 (Perkin Elmer). El experto en la materia puede entonces interpretar los resultados obtenidos mediante tales experimentos para establecer al menos una medida cualitativa de la afinidad de unión del polipéptido por IL-17A. Si se desea una medida cuantitativa, por ejemplo para determinar el valor de  $EC_{50}$  (la mitad de la concentración efectiva máxima) para la interacción, también se puede usar ELISA. La respuesta de los polipéptidos contra una serie de diluciones de IL-17A biotinilada se mide usando ELISA como se describió anteriormente. El experto en la materia puede entonces interpretar los resultados obtenidos mediante tales experimentos y los valores de  $EC_{50}$  pueden calcularse a partir de los resultados usando, por ejemplo, GraphPad Prism 5 y regresión no lineal.
- La afinidad de unión a IL-17A también se puede analizar en un experimento en el que se inmoviliza IL-17A, o un fragmento de la misma, en un chip sensor del instrumento de resonancia de plasmón de superficie (SPR), y la muestra que contiene el polipéptido que se va a analizar se pasa sobre el chip. Alternativamente, el polipéptido que se va a analizar se inmoviliza en un chip sensor del instrumento y se pasa una muestra que contiene IL-17A, o un fragmento de la misma, sobre el chip. El experto en la materia puede entonces interpretar los resultados obtenidos mediante tales experimentos para establecer al menos una medida cualitativa de la afinidad de unión del polipéptido por IL-17A. Si se desea una medida cuantitativa, por ejemplo, para determinar un valor de  $K_D$  para la interacción, también se pueden usar métodos de resonancia de plasmón superficial. Los valores de unión pueden definirse, por ejemplo, en un instrumento Biacore (GE Healthcare) o ProteOn XPR 36 (Bio-Rad). IL-17A se inmoviliza adecuadamente en un chip sensor del instrumento, y las muestras del polipéptido cuya afinidad se va a determinar se preparan mediante dilución en serie y se inyectan en orden aleatorio. Los valores de  $K_D$  pueden calcularse a continuación a partir de los resultados utilizando, por ejemplo, el modelo de unión de Langmuir 1:1 del software BIAevaluation 4.1, u otro software adecuado, proporcionado por el fabricante del instrumento.
- Otro método para determinar la afinidad de unión por IL-17A es el ensayo de exclusión cinética (KinExA®; Sapidyne Instruments Inc, Boise, EE. UU.; Darling y Brault, 2004. Assay and Drug Dev Tech 2 (6): 647-657) para medir la afinidad de unión en equilibrio y la cinética entre moléculas no modificadas en solución. Para el análisis de afinidad, la constante de disociación de equilibrio,  $K_D$ , y la tasa de asociación,  $k_a$ , se determinan experimentalmente, mientras que la tasa de disociación,  $k_d$ , se puede calcular con base en la ecuación  $k_d = K_D * k_a$ .
- Un análisis de  $K_D$  mediante KinExA® requiere la inmovilización de un compañero de interacción (por ejemplo, el compañero de unión titulado) en una fase sólida, que luego se usa como sonda para capturar el otro compañero de interacción (por ejemplo, el compañero de unión constante) libre en solución una vez se alcanza el equilibrio. Para cada experimento, se equilibran una serie de soluciones con una concentración constante de un compañero de unión y una valoración del otro compañero de unión. A continuación, las soluciones se exponen brevemente a la fase sólida y se captura una porción de la pareja de unión constante libre y se marca con una molécula secundaria fluorescente. El corto tiempo de contacto con la fase sólida es menor que el tiempo necesario para la disociación del complejo preformado en la solución, lo que significa que la competencia entre la solución y el compañero de unión titulado en fase sólida está "cinéticamente excluida". Dado que la fase sólida solo se usa como sonda para la pareja de unión libre constante en cada muestra, el equilibrio de la solución no se altera durante las mediciones. Se calcula un valor de  $K_D$  a partir de señales generadas a partir del compañero de unión constante libre capturado, que son directamente proporcionales a la concentración del compañero de unión constante libre en la muestra equilibrada. Los datos se pueden analizar utilizando el software KinExA® Pro y el análisis de mínimos cuadrados para ajustar las soluciones óptimas para el  $K_D$  y la concentración del sitio de unión activa (ABC) a una curva representativa de un modelo estequiométrico relevante, por ejemplo, una interacción bimolecular reversible 1:1.
- La determinación de la cinética de unión se puede realizar en un formato similar al análisis de equilibrio, excepto que las mediciones se recogen en "pre-equilibrio" y las señales de unión son una función del tiempo y la concentración total del compañero de unión titulado. Hay dos métodos que se pueden utilizar para determinar el  $k_a$ . El "método directo" mantiene fijas las concentraciones de los compañeros de unión constantes y titulados, y la solución se prueba con el tiempo. La cantidad del compañero de unión constante libre en la solución disminuirá a medida que la muestra se mueva hacia el equilibrio. El "método de inyección" mantiene el tiempo de incubación y la concentración fija de un compañero, mientras titula las concentraciones del otro compañero. A medida que aumenta la concentración del compañero de unión valorado, la cantidad del compañero de unión constante libre disminuirá a medida que se formen más complejos.
- En una realización, el polipéptido de unión a IL-17A es capaz de unirse a IL-17A de manera que el valor  $K_D$  de la interacción sea como máximo  $1 \times 10^{-6}$  M, tal como como máximo  $1 \times 10^{-7}$  M, tal como como máximo  $1 \times 10^{-8}$  M, tal como como máximo  $1 \times 10^{-9}$  M.
- En una realización, un polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con cualquier aspecto divulgado en este documento es capaz de unirse a una molécula de IL-17A seleccionada del grupo que consiste en IL-17A humana e IL-17A murina. En una realización, el polipéptido de unión a IL-17A es capaz de unirse a IL-17A humana. En una realización, el polipéptido de unión a IL-17A es capaz de unirse a IL-17A murina. En una realización, el polipéptido de unión a IL-17A es capaz de unirse a IL-17A humana ya IL-17A murina. A este respecto, la IL-17A humana puede comprender la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1226, o un fragmento antigénicamente eficaz de la misma. Asimismo, la IL-

17A murina puede comprender la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1227, o un fragmento antigénicamente eficaz de la misma.

5 El experto en la materia comprenderá que se pueden realizar diversas modificaciones y/o adiciones a un polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con cualquier aspecto divulgado en este documento para adaptar el polipéptido a una aplicación específica sin apartarse del alcance de la presente divulgación.

10 Por ejemplo, en una realización, se proporciona un polipéptido de unión a IL-17A como se describe en el presente documento, cuyo polipéptido se ha extendido y/o comprende aminoácidos adicionales en el extremo terminal C y/o el extremo terminal N. Dicho polipéptido debe entenderse como un polipéptido que tiene uno o más residuos de aminoácidos adicionales en la primera y/o última posición de la cadena polipeptídica, es decir, en el extremo N y/o C de la secuencia i) o ii). Por lo tanto, un polipéptido de unión a IL-17A puede comprender cualquier número adecuado de residuos de aminoácidos adicionales, por ejemplo, al menos un residuo de aminoácido adicional. Cada residuo de aminoácido adicional puede añadirse individual o colectivamente para, por ejemplo, mejorar y/o simplificar la producción, purificación, estabilización *in vivo* o *in vitro*, acoplamiento o detección del polipéptido. Tales residuos de aminoácidos adicionales pueden comprender uno o más residuos de aminoácidos añadidos con el propósito de acoplamiento químico. Un ejemplo de esto es la adición de un residuo de cisteína. Los residuos de aminoácidos adicionales también pueden proporcionar una "etiqueta" para la purificación o detección del polipéptido, tal como una etiqueta His<sub>6</sub>, una etiqueta (HisGlu)<sub>3</sub> (etiqueta "HEHEHE") o una etiqueta "myc" (c-myc) o una Etiqueta "FLAG" para la interacción con anticuerpos específicos para la etiqueta o cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) en el caso de la etiqueta His<sub>6</sub>.

25 Los aminoácidos adicionales discutidos anteriormente se pueden acoplar al polipéptido de unión a IL-17A por medio de conjugación química (usando métodos de química orgánica conocidos) o por cualquier otro medio, tal como la expresión del polipéptido de unión a IL-17A como una proteína de fusión o unida de cualquier otra manera, ya sea directamente o mediante un enlazador, por ejemplo un enlazador de aminoácidos.

30 Los aminoácidos adicionales discutidos anteriormente pueden comprender, por ejemplo, uno o más dominios polipeptídicos. Otro dominio polipeptídico puede proporcionar al polipéptido de unión a IL-17A otra función, tal como, por ejemplo, otra función de unión, una función enzimática, una función tóxica, una función de señalización fluorescente o combinaciones de las mismas.

35 Un dominio polipeptídico adicional puede proporcionar además otra fracción de unión a IL-17A con la misma función de unión a IL-17A. Por lo tanto, en una realización adicional, se proporciona un polipéptido de unión a IL-17A en una forma multimérica. Se entiende que dicho multímero comprende al menos dos polipéptidos de unión a IL-17A como se divulga en el presente documento como unidades monoméricas, cuyas secuencias de aminoácidos pueden ser iguales o diferentes. Las formas multiméricas de los polipéptidos pueden comprender un número adecuado de dominios, cada uno de los cuales tiene un motivo de unión a IL-17A y cada uno forma un monómero dentro del multímero. Estos dominios pueden tener la misma secuencia de aminoácidos, pero alternativamente, pueden tener diferentes secuencias de aminoácidos. En otras palabras, el polipéptido de unión a IL-17A de la invención puede formar homo o heteromultímeros, por ejemplo homo o heterodímeros. En una realización, se proporciona un polipéptido de unión a IL-17A, en el que dichas unidades monoméricas se acoplan covalentemente entre sí. En otra realización, dichas unidades monoméricas del polipéptido de unión a IL-17A se expresan como una proteína de fusión. En una realización, se proporciona un polipéptido de unión a IL-17A en forma dimérica.

45 Además, polipéptidos o proteínas de fusión "heterogénicas", o conjugados, en los que un polipéptido de unión a IL-17A descrito en este documento, o un multímero del mismo, constituye un primer dominio o primera fracción, y la segunda y otras fracciones tienen otras funciones que se unen a IL-17A, también se contemplan y caen dentro del ámbito de la presente divulgación. La segunda y otra fracción o fracciones del polipéptido de fusión o conjugado en dicha proteína tienen adecuadamente una actividad biológica deseada.

50 Por lo tanto, en un segundo aspecto de la presente divulgación, se proporciona una proteína de fusión o un conjugado, que comprende una primera fracción que consiste en un polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con el primer aspecto, y una segunda fracción que consiste en un polipéptido que tiene una actividad biológica deseada. En otra realización, dicha proteína de fusión o conjugado puede comprender adicionalmente fracciones adicionales, que comprenden actividades biológicas deseadas que pueden ser iguales o diferentes de la actividad biológica de la segunda fracción.

60 Los ejemplos no limitantes de una actividad biológica deseada comprenden una actividad terapéutica, una actividad de unión y una actividad enzimática.

En una realización, la segunda fracción que tiene una actividad biológica deseada es un polipéptido terapéuticamente activo.

65 Los ejemplos no limitantes de polipéptidos terapéuticamente activos son biomoléculas, tales como moléculas seleccionadas del grupo que consiste en enzimas, hormonas, factores de crecimiento, quimioquinas, citoquinas y

linfocinas endógenas humanas. Los ejemplos no limitantes de citoquinas contempladas son IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-11, IL-13, IL-21, IL-27, IL-35, IFN $\beta$  y TGF $\beta$ . Ejemplos no limitativos de quimioquinas contempladas son SDF-1/CXCL12, BCL/BCA-1/CXCL13, CXCL16, HCC1/CCL14, TARC/CCL17, PARC/CCL18, MIP-3 $\beta$ /ELC/CCL19, SLC/CCL21, CCL25/TECK y CCL27/CTACK.

Los ejemplos no limitantes de actividades de unión son las actividades de unión que aumentan la vida media *in vivo* de la proteína de fusión o del conjugado. En una realización particular, dicha actividad de unión es una actividad de unión a albúmina que aumenta la vida media *in vivo* de la proteína de fusión o del conjugado. En una realización, dicha actividad de unión a albúmina la proporciona el dominio de unión a albúmina de la proteína G estreptocócica o un derivado de la misma. En otra realización particular, dicha actividad de unión es una actividad de unión a FcRn que aumenta la vida media *in vivo* de la proteína de fusión o del conjugado.

En una realización, la proteína de fusión o conjugado de este segundo aspecto comprende dos monómeros del polipéptido de unión a IL-17A del primer aspecto, cuyas secuencias de aminoácidos pueden ser iguales o diferentes, unidas por una fracción de unión a albúmina. En una realización específica de esta construcción, la proteína de fusión o el conjugado comprende dos monómeros de unión a IL-17A con una fracción de unión a albúmina entre ellos. Dicha fracción de unión a albúmina puede por ejemplo, ser un dominio de unión a albúmina "GA" de la proteína G estreptocócica, tal como "GA3", o un derivado de la misma como se describe en cualquiera de los documentos WO2009/016043, WO2012/004384, WO2014/048977 y WO2015/091957.

En una realización, el formato de tal proteína de fusión o conjugado es "Z-A-Z", en el que cada "Z" individualmente es un polipéptido de unión a IL-17A como se describe en el presente documento, y "A" es un dominio de unión a albúmina. En una realización, tal polipéptido de unión a IL-17A con el formato "ZAZ" es capaz de unirse a IL-17A de manera que el valor  $K_D$  de la interacción es a lo sumo  $1 \times 10^{-10}$  M, tal como a lo sumo  $1 \times 10^{-11}$  M, tal como a lo sumo  $1 \times 10^{-12}$  M, tal como a lo sumo  $1 \times 10^{-13}$  M. En una realización, tal polipéptido "ZAZ" comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de la SEQ ID NO: 1233-1247, por ejemplo seleccionado del grupo que consta de las SEQ ID NO: 1236, 1237 y 1242-1247, tal como se selecciona del grupo que consta de las SEQ ID NO: 1236, 1244 y 1247 o el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1237, 1244 y 1247. En una realización aún más específica, el polipéptido "ZAZ" comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1244 y 1245. En una realización, el polipéptido "ZAZ" comprende la SEQ ID NO: 1244.

En una realización, dicha actividad de unión se une a un factor asociado a la angiogénesis. Los ejemplos no limitantes de factores asociados a la angiogénesis incluyen factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor 1 de crecimiento de fibroblastos (FGF-1), FGF básico, angiogenina 1 (Ang-1), angiogenina 2 (Ang-2), angiopoyetina 1 (Angpt-1), angiopoyetina 2 (Angpt-2), angiopoyetina 3 (Angpt-3), angiopoyetina 4 (Angpt-4), tirosina quinasa con dominios 1 similares a inmunoglobulinas (TIE-1), tirosina quinasa con dominios 2 similares a inmunoglobulinas (TIE-2), receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-1), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-2), receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-3), factor A de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A), factor B de crecimiento endotelial vascular (VEGF-B), factor C de crecimiento endotelial vascular (VEGF-C), factor D de crecimiento endotelial vascular (VEGF-D), factor E de crecimiento endotelial vascular (VEGF-E), factor de crecimiento placentario (PIGF), factor  $\beta$ 1 de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ 1), factor  $\beta$ 2 de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ 2), receptores del factor  $\beta$  de crecimiento transformante (tipo I, tipo II y tipo III), metaloproteinasas de matriz (MMP), receptor de tirosina quinasa de MET (también denominado cMET) y receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR)), miembros de la familia de receptores Notch y beta-catenina.

En una realización, dicha actividad de unión se une a un factor asociado a la respuesta inmune. Los ejemplos no limitantes de factores asociados a la respuesta inmune incluyen

- Factores reguladores de células T tales como CD3, CD4, CD6, CD28, receptor  $\alpha$  de células T (TCR $\alpha$ ), receptor  $\beta$  de células T (TCR $\beta$ ), proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y proteína 1 de muerte celular programada (PD-1), ligando 1 de muerte programada (PD-L1), ligando 2 de muerte programada (PD-L2), homólogo 3 de B7 (B7-H3), homólogo 4 de B7 (B7-H4), mediador de entrada del virus del herpes (HVEM)/atenuador de linfocitos B y T (BTLA), receptor inhibidor asesino (KIR), gen 3 de activación de linfocitos (LAG3), galectina 9 (Gal9)/mucina 3 de inmunoglobulina de células T (TIM3) y receptores de adenosina/ adrenérgicos alfa-2 (A2aR);
- Factores de reclutamiento de células NK tales como CD16, producto 2D del gen receptor de tipo lectina de células asesinas naturales (NKG2D), antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA1) y los receptores NKp30 y NKp40 de citotoxicidad natural;
- factores asociados a la inflamación como

- citoquinas y sus receptores, incluidos factores de necrosis tumoral (TNF); miembros de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral (TNFSF) TNFSF11/RANKL, TNFSF12/TWEAK, TNFSF13, TNFSF13B/BAFF/BLyS, TNFSF14, TNFSF15; interleuquinas (IL) IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-23, IL-26, IL-32, IL-33 e IL-34; interferones INF $\alpha$  e INF $\gamma$ ; factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF); y

- quimioquinas inflamatorias y sus receptores, incluidos IL-8/CXCL8, ENA-78/CXCL5, GRO $\alpha$ /CXCL1, CTAP-III/CXCL7, IP-10/CXCL10, Mig/CXCL9, PF4/CXCL4, GCP-2/CXCL6, MCP -1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-3 $\alpha$ /CCL20, RANTES/CCL5, linfotactina/XCL1 y fractalquina/CX3CL1.

5 En realizaciones particularmente seleccionadas, la actividad de unión de dicha segunda fracción se une a un objetivo seleccionado del grupo que consiste en TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17F e IL-23.

10 En una realización del primer o segundo aspecto de la presente divulgación, se proporciona un polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión o conjugado que comprende un agente modificador de la respuesta inmune. Los ejemplos no limitantes de tales agentes modificadores de la respuesta inmune incluyen agentes inmunosupresores o inmunomoduladores u otros agentes antiinflamatorios. Por ejemplo, un polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión o conjugado como se describe en el presente documento puede comprender un agente seleccionado del grupo que consiste en fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD), tales como sales de oro, azatioprina, metotrexato y leflunomida; inhibidores de calcineurina, tales como ciclosporina A o FK 506; moduladores de la recirculación de linfocitos; inhibidores de mTOR, tales como rapamicina; una ascomicina que tiene propiedades inmunosupresoras; glucocorticoides; corticosteroides; ciclofosfamida; anticuerpos monoclonales inmunosupresores, por ejemplo anticuerpos monoclonales con afinidad por receptores de leucocitos tales como MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD40, CD45, CD58, CD80, CD86 o sus ligandos; inhibidores de moléculas de adhesión, tales como antagonistas de LFA-1, antagonistas de ICAM-1 o ICAM-3, antagonistas de VCAM-4 o antagonistas de VLA-4; agentes anti-TNF, tales como etanercept y anticuerpos monoclonales para TNF tales como infliximab y adalimumab; inhibidores de citoquinas proinflamatorias; bloqueadores de IL-1 tales como anakinra o trampa de IL-1; bloqueadores de IL-6; inhibidores de quimioquinas; medicamentos antiinflamatorios no esteroides (NSAID) tales como la aspirina; y agentes antiinfecciosos y otros agentes moduladores de la respuesta inmunitaria; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

25 En una realización del primer o segundo aspecto de la presente divulgación, se proporciona un polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión o conjugado que comprende un compuesto tóxico. Los ejemplos no limitantes de tales compuestos tóxicos incluyen caliqueamicina, maitansinoide, neocarzinostatina, esperamicina, dinemicina, kedarcidina, maduropeptina, doxorubicina, daunorrubicina, auristatina, cadena A de ricina, modicina, exotoxina A trunca de *Pseudomonas*, toxina de la Difteria y gelonina recombinante.

35 Recientemente, se ha logrado un progreso considerable en el desarrollo de agentes multiespecíficos, tales como anticuerpos con la capacidad de unirse a más de un antígeno, por ejemplo, mediante modificación de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) para abordar dos antígenos en un solo sitio de combinación de anticuerpos (Bostrom et al, 2009, Science 323 (5921): 1610-1614; Schaefer et al, 2011, Cancer Cell 20 (4): 472-486), mediante la construcción de anticuerpos heterodiméricos utilizando unidades Fc modificadas (Carter, 2001, J Immunol Methods 248 (1-2): 7-15; Schaefer et al., 2011, Proc Natl Acad Sci USA 108 (27): 11187-11192) y mediante la fusión genética de unidades de reconocimiento auxiliar a los terminales a N o C de cadenas ligeras o pesadas de anticuerpos de longitud completa (Kanakaraj et al., 2012, MAbs 4 (5): 600-613; LaFleur et al., 2013, MAbs 5 (2): 208-218).

40 Como se discutió anteriormente, puede ser beneficioso que un polipéptido con afinidad por IL-17A como se divulga en el presente documento también exhiba afinidad por otro factor, tal como un factor asociado a la respuesta inmune, por ejemplo un factor asociado a la inflamación.

45 Por lo tanto, en un tercer aspecto de la presente divulgación, se proporciona un complejo que comprende al menos un polipéptido de unión a IL-17A como se define en el presente documento y al menos un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

50 Cuando se usa en el presente documento para indicar el tercer aspecto de la divulgación, el término "complejo" pretende hacer referencia a dos o más cadenas polipeptídicas asociadas, una de las cuales tiene afinidad por IL-17A en virtud de su motivo de unión a IL-17A como se definió anteriormente, y el otro es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Cada una de estas cadenas polipeptídicas puede contener diferentes dominios proteicos, como se describió ampliamente anteriormente para el polipéptido de unión a IL-17A del primer y segundo aspectos, y el complejo multiproteico resultante puede tener múltiples funciones. "Complejo" pretende referirse a dos o más polipéptidos como se define en este documento, conectados por enlaces covalentes, por ejemplo, dos o más cadenas polipeptídicas conectadas por enlaces covalentes a través de la expresión de las mismas como una proteína de fusión recombinante, o asociadas por conjugación química.

60 El tercer aspecto proporciona un complejo que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Como es bien sabido, los anticuerpos son moléculas de inmunoglobulina capaces de unirse específicamente a un objetivo (un antígeno), tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido u otro, a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en este documento, el término "anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo" abarca no solo anticuerpos policlonales o monoclonales de longitud completa o intactos, sino también fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab<sub>3</sub>, Fv y variantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una o más porciones de anticuerpos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, minicuerpos, diacuerpos,

triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, que incluye variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos modificados covalentemente.

Otros ejemplos de anticuerpos modificados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos incluyen nanocuerpos, AlbuAb, DART (reorientación de afinidad dual), BiTE (enlazador biespecífico de células T), TandAb (diacuerpos en tándem), DAF (Fab de acción dual), anticuerpos dos en uno, SMIP (inmunofármacos modulares pequeños), FynomAb (fynómeros fusionados con anticuerpos), DVD-Ig (inmunoglobulina de dominio variable dual), cuerpos CovX (anticuerpos modificados con péptidos), duocuerpos y triomAb. Esta lista de variantes de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos no debe considerarse limitante, y el experto en la materia conoce otras variantes adecuadas.

Un anticuerpo de longitud completa comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada contiene una región variable de cadena pesada ( $V_H$ ) y una primera, segunda y tercera regiones constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ ). Cada cadena ligera contiene una región variable de cadena ligera ( $V_L$ ) y una región constante de cadena ligera ( $C_L$ ). Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se asignan a diferentes clases. Hay seis clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM e IgY, y varios de estos pueden dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. El término "anticuerpo de longitud completa", como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgD, IgE, IgG, IgA, IgM o IgY (o cualquier subclase de los mismos). Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de anticuerpos son bien conocidas.

Un "fragmento de unión a antígeno" es una porción o región de una molécula de anticuerpo, o un derivado de la misma, que retiene toda o una parte significativa de la unión de antígeno del correspondiente anticuerpo de longitud completa.

Un fragmento de unión a antígeno puede comprender la región variable de cadena pesada ( $V_H$ ), la región variable de cadena ligera ( $V_L$ ) o ambas. Cada una de las  $V_H$  y  $V_L$  contiene típicamente tres regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3. Las tres CDR en  $V_H$  o  $V_L$  están flanqueadas por regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4). Como se enumeró brevemente anteriormente, los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen, pero no se limitan a: (1) un fragmento Fab, que es un fragmento monovalente que tiene una cadena  $V_L$ - $C_L$  y una cadena  $V_H$ - $C_{H1}$ ; (2) un fragmento Fab', que es un fragmento Fab con la región bisagra de la cadena pesada, (3) un fragmento  $F(ab')_2$ , que es un dímero de fragmentos Fab' unidos por la región bisagra de la cadena pesada, por ejemplo unido por un puente disulfuro en la región bisagra; (4) un fragmento Fc; (5) un fragmento Fv, que es el fragmento de anticuerpo mínimo que tiene los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo brazo de un anticuerpo; (6) un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), que es una cadena polipeptídica sencilla en la que los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un scFv están unidos por un enlazador peptídico; (7) un (scFv)<sub>2</sub>, que comprende dos dominios  $V_H$  y dos dominios  $V_L$ , que están asociados a través de los dos dominios  $V_H$  a través de puentes disulfuro y (8) anticuerpos de dominio, que pueden ser polipéptidos de dominio variable único ( $V_H$  o  $V_L$ ) de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos.

Los fragmentos de unión a antígeno se pueden preparar mediante métodos rutinarios. Por ejemplo, los fragmentos  $F(ab')_2$  pueden producirse mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo de longitud completa, y los fragmentos Fab pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos  $F(ab')_2$ . Alternativamente, los fragmentos se pueden preparar mediante tecnología recombinante expresando los fragmentos de cadena pesada y ligera en células huésped adecuadas (por ejemplo, células de *E. coli*, levadura, mamífero, plantas o insectos) y ensamblándolas para formar los fragmentos deseados de unión al antígeno ya sea *in vivo* o *in vitro*. Se puede preparar un anticuerpo de cadena sencilla mediante tecnología recombinante uniendo una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena pesada y una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena ligera. Por ejemplo, se puede incorporar un enlazador flexible entre las dos regiones variables. El experto en la materia conoce métodos para la preparación tanto de anticuerpos de longitud completa como de sus fragmentos de unión a antígenos.

Por lo tanto, en una realización, este aspecto de la divulgación proporciona un complejo como se define en el presente documento, en el que dicho al menos un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos de longitud completa, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos  $F(ab')_2$ , fragmentos Fc, fragmentos Fv, fragmentos Fv monocatenarios, (scFv)<sub>2</sub> y anticuerpos de dominio. En una realización, dicho al menos un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona de anticuerpos de longitud completa, fragmentos Fab y fragmentos scFv. En una realización particular, dicho al menos un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo de longitud completa.

En una realización de dicho complejo como se define en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

El término "anticuerpos monoclonales" como se usa en este documento se refiere a anticuerpos que tienen afinidad monovalente, lo que significa que cada molécula de anticuerpo en una muestra del anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo en el antígeno, mientras que el término "anticuerpos policlonales" como se usa en este documento se refiere a una colección de anticuerpos que reaccionan contra un antígeno específico, pero en cuya colección puede haber diferentes moléculas de anticuerpo, por ejemplo, identificando diferentes epítopos en el

antígeno. Los anticuerpos policlonales se producen típicamente mediante la inoculación de un mamífero adecuado y se purifican a partir del suero del mamífero. Los anticuerpos monoclonales son producidos por células inmunes idénticas que son clones de una célula parental única (por ejemplo, una línea celular de hibridoma). El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que corresponden sustancialmente a, o se derivan de, anticuerpos obtenidos de sujetos humanos. El término "anticuerpos quiméricos", como se usa en este documento, se refiere a anticuerpos recombinantes o modificados genéticamente, como por ejemplo anticuerpos monoclonales de ratón, que contienen polipéptidos o dominios de una especie diferente, por ejemplo humana, introducidos para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos. El término "anticuerpos humanizados" se refiere a anticuerpos de especies no humanas cuyas secuencias de proteínas se han modificado para aumentar su similitud con variantes de anticuerpos producidas naturalmente en humanos, con el fin de reducir la inmunogenicidad.

Puede ser beneficioso para un complejo como se define en este documento, además de ser capaz de unirse a IL-17A, apuntar al menos a un antígeno adicional, tal como un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un antígeno asociado con un trastorno relacionado con angiogénesis y un antígeno asociado con la respuesta inmune. En una realización, dicho antígeno adicional está asociado con la angiogénesis. En una realización, dicho antígeno adicional está asociado con la respuesta inmune.

En una realización, el antígeno está asociado con la angiogénesis y se selecciona del grupo que consiste en factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor 1 de crecimiento de fibroblastos (FGF-1), FGF básico, angiogenina 1 (Ang-1), angiogenina 2 (Ang-2), angiopoyetina 1 (Angpt-1), angiopoyetina 2 (Angpt-2), angiopoyetina 3 (Angpt-3), angiopoyetina 4 (Angpt-4), tirosina quinasa con dominios 1 similares a inmunoglobulina (TIE-1), tirosina quinasa con dominios 2 similares a inmunoglobulina (TIE-2), receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-1), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-2), receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-3), factor A de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A), factor B de crecimiento endotelial vascular (VEGF-B), factor C de crecimiento endotelial vascular (VEGF-C), factor D de crecimiento endotelial vascular (VEGF-D), factor E de crecimiento endotelial vascular (VEGF-E), factor de crecimiento placentario (PIGF), factor  $\beta$ 1 de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ 1), factor  $\beta$ 2 de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ 2), receptores del factor  $\beta$  de crecimiento transformante (tipo I, tipo II y tipo III), metaloproteínasa de matriz (MMP), receptor de tirosina quinasa MET (también denominado cMET) y receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR), miembros de la familia de receptores Notch y beta-catenina. En una realización, dicho anticuerpo o fragmento del mismo se selecciona del grupo que consiste en AMG 780, AMG 386, MEDI-3617, nesvacumab, CVX-241, bevacizumab, ranibizumab, VGX100, CVX-241, ABP 215, PF-06439535, fresolimumab, metelimumab, onartuzumab, emibetuzumab y tarextumab.

En una realización, el antígeno está asociado con la respuesta inmune o un trastorno del sistema inmune, y se selecciona del grupo que consiste en

- Factores reguladores de células T tales como CD3, CD4, CD6, CD28, receptor  $\alpha$  de células T (TCR $\alpha$ ), receptor  $\beta$  de células T (TCR $\beta$ ), proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y proteína 1 de muerte celular programada (PD-1), ligando 1 de muerte programada (PD-L1), ligando 2 de muerte programada (PD-L2), homólogo 3 de B7 (B7-H3), homólogo 4 de B7 (B7-H4), mediador de entrada del virus del herpes (HVEM)/atenuador de linfocitos B y T (BTLA), receptor inhibidor asesino (KIR), gen 3 de activación de linfocitos (LAG3), galectina 9 (Gal9)/mucina3 de inmunoglobulina de células T (TIM3) y receptores adrenérgicos de adenosina/alfa-2 (A2aR);
- Factores de reclutamiento de células NK tales como CD16, producto 2D del gen receptor de tipo lectina de células asesinas naturales (NKG2D), antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA1) y los receptores NKp30 y NKp40 de citotoxicidad natural;
- Factores asociados a la inflamación como

- citoquinas y sus receptores, incluidos factores de necrosis tumoral (TNF); miembros de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral (TNFSF) TNFSF11/RANKL, TNFSF12/TWEAK, TNFSF13, TNFSF13B/BAFF/BLy, TNFSF14, TNFSF15; interleuquinas (IL) IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-23, IL-26, IL-32, IL33 e IL-34; interferones INF $\alpha$  e INF $\gamma$ ; factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF); y

- quimioquinas inflamatorias y sus receptores, incluidos IL-8/CXCL8, ENA-78/CXCL5, GRO $\alpha$ /CXCL1, CTAP-III/CXCL7, IP-10/CXCL10, Mig/CXCL9, PF4/CXCL4, GCP-2/CXCL6, MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-3 $\alpha$ /CCL20, RANTES/CCL5, linfotactina/XCL1 y fractalquina/CX3CL1.

En una realización, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17F e IL-23.

En una realización, dicho anticuerpo o fragmento del mismo se selecciona del grupo que consiste en visilizumab, oteilizumab, ipilimumab, tremelimumab, pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, MPDL3280A, MEDI-4736, MPDL3280A y lirilumab, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En una realización particular, dicho antígeno es TNF. En una realización, dicho anticuerpo o fragmento del mismo se selecciona del grupo que consiste en adalimumab, infliximab, golimumab, certolimumab pegol y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En otra realización, dicho anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo de longitud

completa seleccionado del grupo que consiste en adalimumab, infliximab, golimumab y certolimumab pegol. En una realización particular, dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es adalimumab o un fragmento de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, adalimumab de longitud completa.

5 El complejo como se describe en el presente documento puede estar presente, por ejemplo, en forma de una proteína de fusión o un conjugado. Por lo tanto, dicho al menos un polipéptido de unión a IL-17A y dicho al menos un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, pueden acoplarse mediante conjugación química (usando métodos de química orgánica conocidos) o por cualquier otro medio, tal como la expresión del complejo como una proteína de fusión o unido de cualquier otra forma, ya sea directamente o mediante un enlazador, por ejemplo un enlazador de  
10 aminoácidos.

Por lo tanto, en una realización, se proporciona un complejo como se define en este documento, en el que dicho complejo es una proteína de fusión o un conjugado. En una realización, dicho complejo es una proteína de fusión. En otra realización, dicho complejo es un conjugado. En una realización de dicho complejo, dicho polipéptido de unión a IL-17A está unido al extremo terminal N o al extremo terminal C de la cadena pesada de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otra realización, dicho polipéptido de unión a IL-17A está unido al extremo terminal N o al extremo terminal C de la cadena ligera de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En una realización, dicho polipéptido de unión a IL-17A está unido al extremo terminal N y/o al extremo terminal C de la cadena ligera y la cadena pesada de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Por ejemplo, el polipéptido de unión a IL-17A puede unirse solo al extremo terminal N de la cadena o cadenas pesadas, solo al extremo terminal N de la cadena o cadenas ligeras, solo al extremo terminal C de la cadena o cadenas pesadas, solo al extremo terminal C de la cadena o cadenas ligeras, tanto al extremo terminal N como al extremo terminal C de la cadena o cadenas pesadas, tanto al extremo terminal N como al extremo terminal C de la cadena o cadenas ligeras, solo al extremo terminal C de la cadena o cadenas ligeras y al extremo terminal N de la cadena o cadenas pesadas, solo al extremo terminal C de la cadena o cadenas pesadas y al extremo terminal N de la cadena o cadenas ligeras, de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Como comprenderá el experto en la materia, la construcción de una proteína de fusión a menudo implica el uso de enlazadores entre fracciones funcionales a fusionar. La persona experta conoce diferentes tipos de enlazadores con diferentes propiedades, tales como enlazadores de aminoácidos flexibles, enlazadores de aminoácidos rígidos y enlazadores de aminoácidos escindibles. Se han utilizado enlazadores para, por ejemplo, aumentar la estabilidad o mejorar el plegamiento de proteínas de fusión, para aumentar la expresión, mejorar la actividad biológica, la afinidad y/o la unión, permitir el direccionamiento y alterar la farmacocinética de las proteínas de fusión. Por lo tanto, en una realización, el polipéptido, proteína de fusión, conjugado o complejo de unión a IL-17A como se define en el presente documento comprende además al menos un enlazador. El enlazador se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en enlazadores de aminoácidos flexibles, enlazadores de aminoácidos rígidos y enlazadores de aminoácidos escindibles. Alternativamente, el enlazador puede ser un enlazador no peptídico. En una realización de una proteína de fusión o conjugado como se divulga en el presente documento, dicho enlazador se dispone entre una primera fracción que consiste en un polipéptido de unión a IL-17A como se define en el presente documento y una  
40 segunda fracción que consiste en un polipéptido que tiene una actividad biológica deseada. En una realización de un complejo como se divulga en el presente documento, dicho enlazador está dispuesto entre dicho polipéptido de unión a IL-17A y dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. El experto en la materia apreciará que la presencia de un enlazador dispuesto en cualquiera de los contextos mencionados anteriormente no excluye la presencia de enlazadores adicionales en el mismo o en cualquier otro contexto.

Los enlazadores flexibles se utilizan a menudo cuando los dominios unidos requieren un cierto grado de movimiento o interacción, y pueden ser particularmente útiles en algunas realizaciones del polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado o complejo como se define en el presente documento. Dichos enlazadores están compuestos generalmente por aminoácidos pequeños, no polares (por ejemplo, G) o polares (por ejemplo, S o T). Algunos enlazadores flexibles consisten principalmente en tramos de residuos G y S, por ejemplo (GGGGS)<sub>p</sub> y (SSSSG)<sub>p</sub>. El ajuste del número de copia "p" permite la optimización del enlazador para lograr una separación apropiada entre las fracciones funcionales o para mantener la interacción necesaria entre fracciones. Aparte de los enlazadores G y S, se conocen en la técnica otros enlazadores flexibles, tales como enlazadores G y S que contienen residuos de aminoácidos adicionales, tales como T, A, K y E, para mantener la flexibilidad, así como residuos de aminoácidos polares para mejorar la solubilidad.

En una realización, dicho enlazador es un enlazador flexible que comprende residuos de glicina (G), serina (S) y/o treonina (T). En una realización, dicho enlazador comprende una secuencia con una fórmula general seleccionada entre (G<sub>n</sub>S<sub>m</sub>)<sub>p</sub> y (S<sub>n</sub>G<sub>m</sub>)<sub>p</sub>, en la que, independientemente, n = 1-7, m = 0-7, n + m ≤ 8 y p = 1 -10. En una realización, n = 1-5. En una realización, m = 0-5. En una realización, p = 1-5. En una realización más específica, n = 4, m = 1 y p = 1-4.

En una realización, dicho enlazador comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en G4S, (G4S)<sub>2</sub>, (G4S)<sub>3</sub> y (G4S)<sub>4</sub>.

65

- En una realización, dicho enlazador comprende una secuencia con la fórmula general  $GT(G_nS_m)_p$ , en la que, independientemente,  $n = 1-7$ ,  $m = 0-7$ ,  $n + m \leq 8$  y  $p = 1-10$ . En una realización,  $n = 1-5$ . En una realización,  $m = 0-5$ . En una realización,  $p = 1-5$ . En una realización más específica,  $n = 4$ ,  $m = 1$  y  $p = 1-4$ . Por lo tanto, en una realización en la que  $n = 4$ , dicho enlazador comprende  $GT(G_4S)_p$ . En una realización específica,  $n = 4$  y  $p = 1$ , de modo que dicho enlazador comprende  $GTG_4S$ . En una realización, dicho enlazador comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en  $GT(G_4S)_pS$ ,  $GT(G_4S)_pPR$  y  $GT(G_4S)_pPK$ .
- En una realización, dicho enlazador comprende una secuencia con la fórmula general  $GAP(G_nS_m)_p$ , en la que, independientemente,  $n = 1-7$ ,  $m = 0-7$ ,  $n + m \leq 8$  y  $p = 1-10$ . En una realización,  $n = 1-5$ . En una realización,  $m = 0-5$ . En una realización,  $p = 1-5$ . En una realización más específica,  $n = 4$ ,  $m = 1$  y  $p = 1-4$ . Por lo tanto, en una realización en la que  $n = 4$ , dicho enlazador comprende  $GAP(G_4S)_p$ . En una realización específica,  $n = 4$  y  $p = 1$ , de modo que dicho enlazador comprende  $GAPG_4S$ . En una realización, dicho enlazador comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en  $GAP(G_4S)_pTS$ ,  $GAP(G_4S)_pPR$  y  $GAP(G_4S)_pPK$ .
- En una realización, dicho enlazador comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en  $KL(G_4S)_p$ ,  $LQ(G_4S)_p$  y  $YV(G_4S)_pPK$ . En una realización, dicho enlazador comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en  $S_4G$ ,  $(S_4G)_3$ ,  $(S_4G)_4$  y  $(S_4G)_8$ . En una realización, dicho enlazador comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en  $VDGS$ ,  $ASGS$  y  $VEGS$ . En una realización específica, dicho enlazador comprende  $ASGS$ .
- Con respecto a la descripción anterior de proteínas de fusión, conjugados o complejos que incorporan un polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con la divulgación, debe tenerse en cuenta que la designación de la primera, segunda y otras fracciones se realiza por razones de claridad para distinguir entre el polipéptido o polipéptidos de unión a IL-17A de acuerdo con la invención, por un lado, y las fracciones que presentan otras funciones, por otro lado. Estas designaciones no pretenden hacer referencia al orden real de los diferentes dominios en la cadena polipeptídica de la proteína de fusión, conjugado o complejo. Así, por ejemplo, dicha primera fracción puede aparecer sin restricción en el extremo terminal N, en el medio o en el extremo terminal C de la proteína de fusión, conjugado o complejo.
- La divulgación además abarca polipéptidos en los que el polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con el primer aspecto, el polipéptido de unión a IL-17A comprendido en una proteína de fusión o conjugado de acuerdo con el segundo aspecto o en un complejo de acuerdo con el tercer aspecto, comprende además un marcador, tal como un marcador seleccionado del grupo que consiste en tintes fluorescentes y metales, tintes cromofóricos, compuestos quimioluminiscentes y proteínas bioluminiscentes, enzimas, radionúclidos y partículas. Tales marcadores se pueden usar, por ejemplo, para la detección del polipéptido.
- En realizaciones en las que el polipéptido de unión a IL-17A marcado comprende un polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con el primer aspecto de la divulgación y un marcador, este polipéptido marcado se puede usar para el marcado indirecto de células que expresan IL-17A, tales como células de cánceres asociados a inflamación. Los ejemplos no limitantes de cánceres asociados a inflamación incluyen cánceres gástricos, cánceres colorrectales, cánceres de pulmón de células no pequeñas, carcinomas hepatocelulares y adenocarcinomas (Wu et al., 2014 Tumor Biol. 35 (6): 5347-56; Wu et al., 2012 PLoS One 7 (12); Zhang et al., 2012 Asian Pac J Cancer Prev 13 (8): 3955-60; Liu et al., 2011 Biochem Biophys Res Commun 407 (2): 348-54).
- En otras realizaciones, el polipéptido de unión a IL-17A marcado está presente como una fracción en una proteína de fusión, conjugado o complejo que también comprende una segunda y posible fracción adicional que tiene una actividad biológica deseada. En algunos casos, el marcador puede estar acoplado solo al polipéptido de unión a IL-17A y, en algunos casos, tanto al polipéptido de unión a IL-17A como a la segunda fracción de la proteína de fusión o conjugado y/o al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del complejo. Además, también es posible que el marcador se pueda acoplar a una segunda fracción, o anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo solamente y no a la fracción de unión a IL-17A. Por lo tanto, en otra realización más, se proporciona un polipéptido de unión a IL-17A que comprende una segunda fracción, en la que dicho marcador está acoplado a la segunda fracción solamente. En otra realización, se proporciona un complejo como se define en el presente documento, en el que dicho marcador está acoplado al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo únicamente.
- En una realización, dicho polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado o complejo como se describe en el presente documento comprende un entorno quelante proporcionado por un quelante de poliaminopolicarboxilato conjugado con el polipéptido de unión a IL-17A a través de un grupo tiol de un residuo de cisteína o un grupo amina de un residuo de lisina.
- En realizaciones en las que el polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado o complejo está radiomarcado, dicho polipéptido radiomarcado puede comprender un radionúclido. La mayoría de los radionúclidos tienen una naturaleza metálica y los metales suelen ser incapaces de formar enlaces covalentes estables con elementos presentes en proteínas y péptidos. Por esta razón, el marcaje de proteínas y péptidos con metales radiactivos se realiza con el uso de quelantes, es decir, ligandos multidentados, que forman compuestos no covalentes, llamados quelatos, con los iones metálicos. En una realización del polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado o complejo, la incorporación de un radionúclido se permite mediante la provisión de un entorno quelante, a través del cual el radionúclido puede coordinarse, quelarse o complejarse con el polipéptido.

Un ejemplo de un quelante es el tipo de quelante de tipo poliaminopolicarboxilato. Pueden distinguirse dos clases de tales quelantes de poliaminopolicarboxilato: quelantes macrocíclicos y acíclicos.

5 En una realización, el polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión o conjugado comprende un entorno quelante proporcionado por un quelante de poliaminopolicarboxilato conjugado con el polipéptido de unión a IL-17A a través de un grupo tiol de un residuo de cisteína o un grupo amina épsilon de un residuo de lisina.

10 Los quelantes macrocíclicos más comúnmente utilizados para radioisótopos de indio, galio, itrio, bismuto, radioactínidos y radiolantánidos son diferentes derivados de DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético). En una realización, En una realización un entorno quelante del polipéptido IL-17A proteína de fusión, conjugado o complejo es proporcionado por DOTA o un derivado del mismo. Más específicamente, en una realización, los polipéptidos quelantes abarcados por la presente divulgación se obtienen haciendo reaccionar el derivado de DOTA ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris-acético-10-maleimidoetilacetamida (maleimidomonoamida-  
15 DOTA) con dicho polipéptido.

Además, el ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA) y sus derivados pueden usarse como quelantes. Por lo tanto, en una realización, se proporciona un polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado o complejo, en el que el quelante de poliaminopolicarboxilato es ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético o un derivado del mismo.  
20

Los quelantes de poliaminopolicarboxilato acíclicos más comúnmente utilizados son diferentes derivados de DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético). Por lo tanto, los polipéptidos que tienen un entorno quelante proporcionado por el ácido dietilentriaminopentaacético o derivados del mismo también están incluidos en la presente divulgación.  
25

En una realización, dicho polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado o complejo como se describe en el presente documento comprende además una o más fracciones de polietilenglicol (PEG), por ejemplo, con el fin de mejorar las propiedades farmacocinéticas de la molécula.

30 En un cuarto aspecto de la presente divulgación, se proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de unión a IL-17A o una proteína de fusión como se describe en el presente documento. También se divulgan un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido; y una célula huésped que comprende dicho vector de expresión.

También se incluye en esta divulgación un método para producir un polipéptido o proteína de fusión como se describió anteriormente, que comprende cultivar dicha célula huésped en condiciones permisivas de expresión de dicho polipéptido a partir de su vector de expresión y aislar el polipéptido.  
35

El polipéptido de unión a IL-17A de la presente divulgación puede producirse alternativamente mediante síntesis de péptidos no biológicos utilizando aminoácidos y/o derivados de aminoácidos que tienen cadenas laterales reactivas protegidas, comprendiendo la síntesis de péptidos no biológicos:  
40

- acoplamiento escalonado de los aminoácidos y/o los derivados de aminoácidos para formar un polipéptido de acuerdo con el primer aspecto que tiene cadenas laterales reactivas protegidas,
- eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales reactivas del polipéptido, y  
45 - plegamiento del polipéptido en solución acuosa.

Debe entenderse que el polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con la presente divulgación puede ser útil como agente terapéutico, de diagnóstico o de pronóstico por derecho propio o como medio para dirigirse a otros agentes terapéuticos o de diagnóstico, por ejemplo, con efectos directos o indirectos sobre IL-17A. Un efecto terapéutico directo puede lograrse, por ejemplo, inhibiendo la señalización de IL-17A, tal como bloqueando la unión de IL-17A a uno o más de sus receptores.  
50

En otro aspecto, se proporciona una composición que comprende un polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado o complejo como se describe en el presente documento y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, dicha composición comprende además al menos un agente activo adicional, tal como al menos dos agentes activos adicionales, tal como al menos tres agentes activos adicionales. Ejemplos no limitantes de agentes activos adicionales que pueden resultar útiles en tal composición son los polipéptidos terapéuticamente activos, agentes modificadores de la respuesta inmune y compuestos tóxicos descritos en este documento.  
55

La persona experta apreciará que dicho polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado o complejo, o una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de unión anti-IL-17A, proteína de fusión, conjugado o complejo como se describe en este documento puede administrarse a un sujeto usando técnicas de administración estándar, tales como incluyendo administración oral, tópica, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o en supositorios. Por lo tanto, en una realización se proporciona un polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado o complejo o una composición  
60  
65

farmacéutica como se describe en este documento para administración oral, tópica, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o de supositorios. En una realización particular, se proporciona un polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado o complejo o una composición farmacéutica como se describe en este documento para administración oral. En otra realización particular, se proporciona un polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado o complejo o una composición farmacéutica como se describe en el presente documento para administración tópica, tal como administración tópica en el ojo.

La IL-17A también puede servir como un marcador valioso para el diagnóstico y pronóstico de ciertos cánceres, tales como cánceres asociados a inflamación, por ejemplo cánceres gástricos, cánceres colorrectales, cánceres de pulmón de células no pequeñas, carcinomas hepatocelulares y adenocarcinomas. Por ejemplo, IL-17 se ha relacionado con el pronóstico y la escasa supervivencia en pacientes que padecen carcinoma colorrectal y carcinoma hepatocelular.

Por lo tanto, en otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado, complejo o composición como se describe en el presente documento para su uso como un medicamento, un agente de diagnóstico o un agente de pronóstico.

En una realización, se proporciona un polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado, complejo o composición como se describe en el presente documento, para usar como un medicamento para modular la función de IL-17A *in vivo*. Como se usa en el presente documento, el término "modular" se refiere a cambiar la actividad, tal como convertir la función de IL-17A en hipomorfo, inhibiendo parcialmente o inhibiendo completamente la función de IL-17A.

Los ejemplos no limitantes de afecciones o enfermedades asociadas a IL-17A, en las que los polipéptidos de unión a IL-17A pueden ser útiles para el tratamiento, pronóstico y/o diagnóstico incluyen, artritis, tal como artritis reumatoide, artritis crónica progrediente, artritis deformante y enfermedades reumáticas, enfermedades que implican pérdida ósea, dolor inflamatorio, espondiloartropatías que incluyen espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, artritis reactiva, artritis psoriásica, artritis enterofática, artritis reumatoide pauciarticular, artritis reumatoide poliarticular, artritis reumatoide de aparición sistémica, osteoartritis; condiciones de hipersensibilidad, tales como hipersensibilidad (incluyendo tanto hipersensibilidad de las vías respiratorias como hipersensibilidad dérmica), alergias y respuestas a la exposición a alérgenos; afecciones o enfermedades gastrointestinales, tales como enfermedad inflamatoria intestinal autoinmune (incluyendo, por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y síndrome del intestino irritable), enfermedad celíaca (esprue idiopático), abscesos y adherencias intraperitoneales, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmune, hepatitis viral, hepatitis crónica activa y gastritis asociada a *Helicobacter pylori*; afecciones y enfermedades oftálmicas, tales como oftalmopatía endocrina, enfermedad de Graves, uveítis (anterior y posterior), queratoconjuntivitis seca (enfermedad del ojo seco), queratoconjuntivitis vernal, queratitis estromal herpética y enfermedad del ojo seco; afecciones y enfermedades nefrológicas, tales como glomerulonefritis (con y sin síndrome nefrótico, por ejemplo, que incluye síndrome nefrótico idiopático o nefropatía de cambio mínimo); afecciones y enfermedades agudas, tales como reacciones inflamatorias agudas e hiperaguda, choque séptico (por ejemplo, choque endotóxico y síndrome de dificultad respiratoria del adulto), meningitis, neumonía, quemaduras graves, infecciones agudas, septicemia, accidente cerebrovascular e isquemia; caquexia (síndrome de desgaste), tal como caquexia asociada con liberación mórbida de TNF, caquexia consecuente a infección, caquexia asociada con cáncer, caquexia asociada con disfunción orgánica y caquexia relacionada con SIDA; afecciones y enfermedades relacionadas con los huesos, tales como enfermedades del metabolismo óseo que incluyen osteoartritis, osteoporosis, artritis inflamatorias, pérdida ósea tal como pérdida ósea relacionada con la edad, enfermedad periodontal, aflojamiento de implantes óseos y erosión ósea; afecciones y enfermedades juveniles, tales como artritis reumatoide juvenil, artritis reumatoide juvenil pauciarticular, artritis reumatoide juvenil poliarticular, artritis reumatoide juvenil de aparición sistémica, espondilitis anquilosante juvenil, artritis enteropática juvenil, artritis reactiva juvenil, síndrome de Reiter juvenil, síndrome de Sea (síndrome de seronegatividad entesopatía artropatía), dermatomiositis juvenil, artritis psoriásica juvenil, esclerodermia juvenil, lupus eritematoso sistémico juvenil y vasculitis juvenil; vasculitis incluyendo vasculitis de vasos grandes, tal como polimialgia reumática, arteritis de Takayasu y arteritis temporal, vasculitis de vasos medianos, tal como enfermedad de Buerger, vasculitis cutánea, enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa, vasculitis de vasos pequeños, tal como síndrome de Behçet, síndrome de Churg-Strauss, vasculitis cutánea, púrpura de Henoch-Schonlein, poliangiítis microscópica, granulomatosis de Wegener y vasculitis del golfista, vasculitis de vasos variables y arteritis; afecciones o enfermedades dermatológicas, tales como psoriasis, psoriasis en placas, psoriasis guttata, psoriasis inversa, psoriasis pustulosa, psoriasis eritrodérmica, dermatitis y dermatitis atópica; afecciones y enfermedades pulmonares, tales como enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias, asma, bronquitis, EPOC, neumoconiosis, enfisema pulmonar, reacciones inflamatorias agudas e hiperaguda, fibrosis pulmonar intersticial, inflamación de las vías respiratorias y asma bronquial; afecciones y enfermedades metabólicas, tales como aterosclerosis, dislipidemia y diabetes mellitus de tipo I; así como otras afecciones y enfermedades autoinmunes sistémicas, tales como lupus eritematoso sistémico (SLE), nefritis lúpica, policondritis, miastenia grave, síndrome de Steven-Johnson, tumores, miositis, dermatomiositis, enfermedad de Still del adulto, polimialgia reumática, sarcoidosis, esclerodermia, esclerosis, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple (MS), enfermedad de Guillain-Barre, enfermedad de Addison y fenómeno de Raynaud.

Los polipéptidos de unión a IL-17A como se divulgan en el presente documento pueden además ser útiles para el tratamiento de receptores de trasplantes de corazón, pulmón, corazón-pulmón combinado, hígado, riñón, páncreas, piel o córnea, incluyendo rechazo de aloinjerto o rechazo de xenoinjerto, y para la prevención de la enfermedad de injerto contra huésped, tal como después de un trasplante de médula ósea y arteriosclerosis asociada al trasplante de órganos.

Los polipéptidos de unión a IL-17A como se divulgan en el presente documento pueden además ser útiles para el tratamiento, diagnóstico o pronóstico de cánceres asociados a inflamación. El término "cáncer" como se usa en este documento se refiere a enfermedades tumorales y/o cáncer, tales como cánceres metastásicos o invasivos, por ejemplo cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL), cáncer de pulmón de células bronquioloalveolares, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de intestino delgado, cáncer de esófago, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de glándula paratiroidea, cáncer de glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de pelvis renal, mesotelioma, carcinoma hepatocelular, cáncer biliar, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma de tronco encefálico, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenomas pituitarios, adenocarcinomas, linfoma, leucemia linfocítica o cáncer de origen desconocido, u otra afección asociada a IL-17A hiperplásica o neoplásica, incluidas versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriores o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores o enfermedades hiperproliferativas.

Los ejemplos no limitantes de cánceres asociados a inflamación incluyen cánceres gástricos, cánceres colorrectales, cánceres de pulmón de células no pequeñas, carcinomas hepatocelulares y adenocarcinomas.

En una realización, se proporciona un polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado, complejo o composición para su uso en el tratamiento, diagnóstico o pronóstico de una afección asociada a IL-17A, tal como una afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes y cáncer, tales como enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes. En una realización, dicha afección se selecciona del grupo que consiste en afecciones inflamatorias, afecciones alérgicas, reacciones de hipersensibilidad, enfermedades autoinmunes, infecciones graves y rechazos de trasplantes.

En una realización particular, dicha afección asociada a IL-17A se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, psoriasis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, uveítis y enfermedad del ojo seco.

En una realización aún más particular, dicha afección asociada a IL-17A es psoriasis.

En otra realización, dicha afección asociada a IL-17A es un cáncer asociado a inflamación, tal como un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cánceres gástricos, cánceres colorrectales, cánceres de pulmón de células no pequeñas, carcinomas hepatocelulares y adenocarcinomas.

En un aspecto relacionado, se proporciona un método para determinar la presencia de IL-17A en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de:

- poner en contacto una muestra aislada del sujeto con un polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado, complejo o composición como se describe en este documento, y
- obtener un valor correspondiente a la cantidad del polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado, complejo o composición que se ha unido en dicho sujeto o en dicha muestra.

En una realización, dicho método comprende además una etapa de lavado intermedia para eliminar polipéptido, proteína de fusión, conjugado, complejo o composición no unidos, después de poner en contacto el sujeto o la muestra y antes de obtener un valor.

En una realización, dicho método comprende además una etapa de comparar dicho valor con una referencia. Dicha referencia puede puntuarse mediante un valor numérico, un umbral o un indicador visual, por ejemplo basado en una reacción de color. El experto en la materia apreciará que se conocen en la técnica diferentes formas de comparación con una referencia que pueden ser adecuadas para su uso.

En una realización de tal método, dicho sujeto es un sujeto mamífero, tal como un sujeto humano.

También se divulga un método de tratamiento de una afección asociada a IL-17A, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado, complejo o composición como se describe en el presente documento. En una realización más específica de dicho método, el

polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado, complejo o composición como se describe en el presente documento modula la función de IL-17A *in vivo*.

5 En una realización, dicha afección asociada a IL-17A se selecciona del grupo que consiste en enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes y cáncer, tal como un grupo que consiste en enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes. En una realización particular de dicho aspecto, la afección asociada a IL-17A se selecciona del grupo que consiste en afecciones inflamatorias, afecciones alérgicas, reacciones de hipersensibilidad, enfermedades autoinmunes, infecciones graves y rechazos de trasplantes. En una realización, dicha afección asociada a IL-17A se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, psoriasis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, uveítis y enfermedad del ojo seco. En una realización más específica, dicha afección asociada a IL-17A es psoriasis. En otra realización, dicha afección asociada a IL-17A es cáncer, tal como un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cánceres gástricos, cánceres colorrectales, cánceres de pulmón de células no pequeñas, carcinomas hepatocelulares y adenocarcinomas.

15 Puede ser beneficioso administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado, complejo o composición como se describe en este documento junto con al menos una segunda sustancia farmacológica, tal como un agente modificador de la respuesta inmune, un compuesto tóxico o un agente contra el cáncer.

20 Como se usa en el presente documento, el término "coadministración" abarca la administración concomitante y la administración en secuencia. Por tanto, en una realización, se proporciona un método como se definió anteriormente, que comprende además la coadministración de un agente modulador de la respuesta inmune. En otra realización, se proporciona un método como se definió anteriormente, que comprende además la coadministración de un agente antiinflamatorio adicional. En otra realización, se proporciona un método como se definió anteriormente, que comprende además la coadministración de un compuesto tóxico. En otra realización, se proporciona un método como se definió anteriormente, que comprende además la coadministración de un agente anticanceroso.

30 Los ejemplos no limitantes de agentes moduladores de la respuesta inmune y compuestos tóxicos se presentaron anteriormente. Los ejemplos no limitantes de agentes anticancerígenos incluyen agentes seleccionados del grupo que consiste en auristatina, antraciclina, caliqueamicina, combretastatina, doxorubicina, duocarmicina, el antibiótico antitumoral CC-1065, ecteinsascidina, geldanamicina, maitansinoide, metotrexato, micotoxina, taxol, ricina, bouganina, gelonina, exotoxina 38 de *Pseudomonas* (PE38), toxina diftérica (DT) y sus análogos, y sus derivados y combinaciones de los mismos. Una persona experta apreciaría que los ejemplos no limitantes de agentes citotóxicos incluyen todas las posibles variantes de dichos agentes, por ejemplo, el agente auristatina incluye, por ejemplo, auristatina E, auristatina F, auristatina PE y derivados de los mismos.

40 Aunque la invención se ha descrito con referencia a varios ejemplos de aspectos y realizaciones, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar varios cambios y se pueden sustituir elementos equivalentes por elementos de los mismos sin apartarse del alcance de la invención. Además, se pueden realizar muchas modificaciones para adaptar una situación o molécula particular a las enseñanzas de la invención sin apartarse del alcance esencial de la misma. Por lo tanto, se pretende que la invención no se limite a ninguna realización particular contemplada, sino que la invención incluirá todas las realizaciones que caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

#### 45 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una lista de las secuencias de aminoácidos de ejemplos de polipéptidos de unión a IL-17A de la presente divulgación (SEQ ID NO: 1-1222), un polipéptido de control (SEQ ID NO: 1223), los polipéptidos de unión a albúmina PP013 (SEQ ID NO: 1224) y PEP07843 (SEQ ID NO: 1225) así como las secuencias de aminoácidos de IL-17A humana (SEQ ID NO: 1226), IL-17A murina (SEQ ID NO: 1227), IL-17A de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 1229), IL-17A de mono rhesus (SEQ ID NO: 1230) e IL-17F humana (SEQ ID NO: 1228) utilizadas para la selección, cribado y/o caracterización para la ilustración de la invención. En los polipéptidos de unión a IL-17A de la presente divulgación, los motivos de unión (*BM*) a IL-17A deducidos se extienden desde el residuo 8 al residuo 36 en cada secuencia. Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos largos de 49 residuos de aminoácidos (*BMod*) que se predice que constituyen el haz completo de tres hélices dentro de cada una de estas variantes de Z se extienden desde el residuo 7 al residuo 55.

La Figura 2 muestra la inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-17A evaluada por el ensayo de NHDF descrito en el Ejemplo 3. (A) His<sub>6</sub>-Z06260 (diamantes sin relleno), His<sub>6</sub>-Z06282 (cuadrados sin relleno) e His<sub>6</sub>-Z06455 (círculos sin relleno) se valoraron en un medio que contenía IL-17A. (B) Z06260-ABD (diamantes rellenos), His<sub>6</sub>-Z06282 (cuadrados sin relleno), Z06282-ABD (cuadrados rellenos), His<sub>6</sub>-Z06455 (círculos sin relleno) y Z06455-ABD (círculos rellenos) se valoraron en un medio que contenía IL-17A y HSA.

La Figura 3 muestra la capacidad de unión a IL-17A de un conjunto de variantes de Z de la primera y segunda biblioteca de maduración ensayadas por ELISA como se describe en el Ejemplo 8. Los resultados se muestran como capacidad de unión porcentual en comparación con la variante de unión a IL-17A Z10241 (SEQ ID NO: 11).

La Figura 4 muestra el resultado del análisis de especificidad de unión realizado en un instrumento Biacore como se describe en el Ejemplo 8. Se obtuvieron sensorgramas mediante la inyección de 20 nM de las variantes de Z etiquetadas con His<sub>6</sub> Z10508 (SEQ ID NO: 2) (A), Z10532 (SEQ ID NO: 1) (B) y Z15167 (SEQ ID NO: 4) (C) sobre IL-

17A humana (negro), IL-17A/F humana (gris oscuro) e IL-17F humana (gris claro), respectivamente, inmovilizadas en la superficie de un chip CM5.

La Figura 5 muestra la inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-17A para una selección de variantes de Z que se originan a partir de la primera selección de maduración (curvas de línea continua) en comparación con un ligante de la selección primaria (curva de línea discontinua) ensayado como se describe en el Ejemplo 8. Todos los ligantes inhibieron IL-17A de una manera dependiente de la dosis y los ligantes maduros tenían una mayor capacidad de bloqueo en comparación con el ligante primario.

La Figura 6 muestra la unión a IL-17A humana (gris) e IL-17A de cynomolgus (negro) a (A) ZAZ3363 (SEQ ID NO: 1244), (B) ZAZ3364 (SEQ ID NO: 1245) y (C) ZAZ3365 (SEQ ID NO: 1246), analizadas en un instrumento Biacore como se describe en el Ejemplo 11. Las curvas resultantes, de las cuales se restaron las respuestas de una superficie en blanco, corresponden a inyecciones de la proteína IL-17A respectiva a concentraciones de 2,5, 10 y 40 nM.

La Figura 7 muestra la inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-17A en el ensayo de NHDF descrito en el Ejemplo 14. La Figura 7A muestra una eficacia inhibidora superior con el polipéptido Z-ABD-Z dimérico ZAZ3220 (SEQ ID NO: 1236; línea negra continua) en comparación con la correspondiente variante de Z monomérica Z10241 (SEQ ID NO: 11; línea negra punteada). La Figura 7B muestra una evaluación de diferentes longitudes de enlazador entre las fracciones de Z y ABD en los polipéptidos Z-ABD-Z que comprenden la variante de Z Z06282 (SEQ ID NO: 1206). Se compararon los polipéptidos Z-ABD-Z ZAZ3174 (SEQ ID NO: 1233), ZAZ3176 (SEQ ID NO: 1235), ZAZ3234 (SEQ ID NO: 1238), ZAZ3235 (SEQ ID NO: 1239), ZAZ3236 (SEQ ID NO: 1240) y ZAZ3237 (SEQ ID NO: 1241) con varios números de repeticiones de G<sub>4</sub>S, o enlazadores mínimos, en cada lado del ABD.

La Figura 8 muestra la inhibición dependiente de la dosis por polipéptidos Z-ABD-Z en el modelo de KC inducido por hIL-17A descrito en el Ejemplo 15. (A) Se obtuvo una inhibición completa de la producción de KC por ZAZ3174 (SEQ ID NO: 1233) a una dosis de 2,5 mg/kg. (B) Se obtuvo la inhibición completa de la producción de KC por ZAZ3220 (SEQ ID NO: 1236) a una dosis de 0,4 mg/kg. Las dosis indicadas en el eje x se dan en mg/kg y la dosis de pmol correspondiente. Los números sobre la barra indican el porcentaje de inhibición en cada grupo de dosis; se obtuvo una inhibición del 72% con 0,1 mg/kg de ZAZ3220. LOQ = límite de cuantificación.

La Figura 9 muestra los perfiles farmacocinéticos de los polipéptidos Z-ABD-Z (A) ZAZ3220 (SEQ ID NO: 1236) y (B) ZAZ3363 (SEQ ID NO: 1244), siguiendo una única administración iv (línea negra) o sc (línea discontinua gris) a ratas SD como se describe en el Ejemplo 16. Se muestran las concentraciones en suero medias frente al tiempo.

La Figura 10 muestra el resultado de la administración tópica a los ojos de conejos realizada como se describe en el Ejemplo 17. Se demostró la captación de la variante de Z Z10199 (SEQ ID NO: 1217) y el polipéptido Z-ABD-Z ZAZ3174 (SEQ ID NO: 1233) tanto en humor acuoso como en humor vítreo, mientras que el anticuerpo IgG de control no penetró en el ojo.

La Figura 11 muestra la actividad de ZAZ3363 (SEQ ID NO: 1244) formulada en OAF1 y OAF2, respectivamente, en comparación con la formulación en PBS, y analizada en el ensayo de NHDF descrito en el Ejemplo 18. A) OAF1 (círculos rellenos), PBS (cruces) y OAF1 sin ZAZ3363 (diamantes sin relleno). B) OAF2 (triángulos sin relleno), PBS (cruces) y OAF2 sin ZAZ3363 (diamantes sin relleno).

La Figura 12 muestra el perfil farmacocinético de la administración intraduodenal de ZAZ3363 formulada en OAF1 (círculos rellenos), OAF2 (triángulos sin relleno) y PBS (cruces) realizada como se describe en el Ejemplo 18.

La Figura 13 muestra la evaluación de los complejos HC<sub>Ada</sub>-Z14253 y LC<sub>Ada</sub>-Z14253 en el ensayo de NHDF descrito en el Ejemplo 19. (A) Diagrama esquemático de los complejos HC<sub>Ada</sub>-Z14253 (izquierda) y LC<sub>Ada</sub>-Z14253 (derecha). (B) Inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-17A. (C) Inhibición de la producción de IL-8 inducida por TNF. (D) Inhibición de la producción de IL-8 inducida por TNF e IL-17A. Z04726-ABD es un control negativo, incluido en los tres ensayos.

La Figura 14 muestra los perfiles farmacocinéticos del polipéptido Z-ABD-Z ZAZ3363 (SEQ ID NO: 1244) en monos cynomolgus después de la administración iv de 20 mg/kg (negro) o 40 mg/kg (gris) el día 1, 4, 7 y 10 como se describe en el Ejemplo 20. Las concentraciones plasmáticas medias frente al tiempo se muestran después del análisis de (A) la primera inyección el día 1 y (B) la cuarta inyección el día 10. Las barras de error representan la desviación estándar.

La Figura 15 muestra los perfiles farmacocinéticos del polipéptido Z-ABD-Z ZAZ3363 (SEQ ID NO: 1244) en perros Beagle individuales después de la administración oral. Se administraron 150 mg de ZAZ3363 como cápsulas con recubrimiento entérico el día 0.

## Ejemplos

### Resumen

Los siguientes ejemplos divulgan el desarrollo de nuevas moléculas variantes de Z dirigidas a la interleucina 17A (IL-17A) con base en la tecnología de presentación en fagos. Los polipéptidos de unión a IL-17A descritos en el presente documento se secuenciaron, y sus secuencias de aminoácidos se enumeran en la Figura 1 con los identificadores de secuencia SEQ ID NO: 1-1222. Los Ejemplos describen además la caracterización de polipéptidos de unión a IL-17A y la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de dichos polipéptidos.

### Ejemplo 1

#### Selección y cribado de variantes de Z de unión a IL-17A

#### Materiales y métodos

- 5 Biotinilación de la proteína objetivo: se biotinilaron IL-17A humana (hIL-17A Peprotech cat. No. 200-17; SEQ ID NO: 1226) e IL-17A murina (mIL-17A Peprotech cat. No. 210-17; SEQ ID NO: 1227) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante a temperatura ambiente (TA) durante 30 min usando No-Weigh EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific, cat. No. 21327) con un exceso molar de 20 veces. El intercambio posterior de tampón por solución salina tamponada con fosfato (PBS, fosfato 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, pH 7,4) se realizó usando un casete de diálisis (Slide-a-lyzer 3,5 K, 3500 MWCO, Thermo Scientific, cat. No. 66333) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 10 Selección de presentación en fagos de variantes de Z de unión a IL-17A: una biblioteca de variantes aleatorias de proteína Z presentada en bacteriófagos, construida en el fagémido pAY02592 esencialmente como se describe en Grönwall et al., (2007) J Biotechnol, 128: 162-183, se utilizó para seleccionar variantes de Z de unión a IL-17A. En esta biblioteca, un dominio de unión a albúmina (abreviado ABD y correspondiente a GA3 de la proteína G de la cepa G148 de *Streptococcus*) se usa como compañero de fusión para las variantes de Z. La biblioteca se denomina
- 15 Zlib006Naive.II y tiene un tamaño de  $1,5 \times 10^{10}$  miembros de la biblioteca (variantes de Z). Se inocularon células de *E. coli* RRIΔM15 (Rüther et al., (1982) Nucleic Acids Res 10: 5765-5772) de una solución madre de glicerol que contenía la biblioteca de fagémidos Zlib006Naive.II, en 20 L de un medio definido libre de prolina [3 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,02 g/L de uracilo, 6,7 g/L YNB (base nitrogenada de levadura Difco<sup>MR</sup> sin aminoácidos, Becton Dickinson), 5,5 g/L de glucosa monohidrato, 0,3 g/L de L-alanina, 0,24 g/L de L-arginina monohidrato, 0,11 g/L de L-asparagina monohidrato, 0,1 g/L de L-cisteína, 0,3 g/L de ácido L-glutámico, 0,1 g/L de L-glutamina, 0,2 g/L de glicina, 0,05 g/L de L-histidina, 0,1 g/L de L-isoleucina, 0,1 g/L de L-leucina, 0,25 g/L de L-lisina monohidrato, 0,1 g/L de L-metionina, 0,2 g/L de L-fenilalanina, 0,3 g/L de L-serina, 0,2 g/L de L-treonina, 0,1 g/L de L-triptófano, 0,05 g/L de L-tirosina, 0,1 g/L de L-valina], suplementado con 100 µg/mL de ampicilina. Los cultivos se hicieron crecer a 37 °C en un fermentador (Belach Biotechnik, BR20). Cuando las células alcanzaron una densidad óptica a 600 nm ( $\text{DO}_{600}$ ) de 0,75, se infectaron
- 20 aproximadamente 2,6 L del cultivo usando un exceso molar de 10 veces del fago auxiliar M13K07 (New England Biolabs, cat. No. N0315S). Las células se incubaron durante 30 min, después de lo cual se llenó el fermentador hasta 20 L con medio de cultivo [2,5 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 5,0 g/L de extracto de levadura (Merck 1.03753.0500); 25 g/L de peptona (Scharlau 07-119); 2 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 3 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,25 g/L de  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 mL/L de agente antiespumante Breox FMT30] suplementado con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 100 µM para la inducción de la expresión y con 50 µg/mL de ampicilina, 12,5 µg/mL de carbenicilina, 25 µg/mL de kanamicina, 35 mL/L de  $\text{MgSO}_4$  1,217 M y 10 mL de una solución de oligoelementos [ $\text{FeCl}_3$  129 mM;  $\text{ZnSO}_4$  36,7 mM;  $\text{CuSO}_4$  10,6 mM;  $\text{MnSO}_4$  78,1 mM;  $\text{CaCl}_2$  94,1 mM, disueltos en HCl 1,2 M]. Se inició un cultivo de alimentación por lotes limitado en glucosa en el que se alimentó al reactor una solución de glucosa de 600 g/L (15 g/h al inicio, 40 g/h al final de la fermentación después de 17 h). Mediante la adición automática de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 25%, se controló el pH a 7. Se suplementó con aire (10 L/min) y se ajustó el agitador para mantener el nivel de oxígeno disuelto por encima del 30%. Las células del cultivo
- 35 se eliminaron mediante filtración de flujo tangencial.
- Las partículas de fago se precipitaron del sobrenadante dos veces en PEG/NaCl (polietilenglicol/cloruro de sodio), se filtraron y se disolvieron en PBS y glicerol como se describe en Grönwall et al., citado más arriba. Los patrones de fagos se almacenaron a -80 °C antes de su uso.
- 40 Se realizaron selecciones contra hIL-17A biotinilada (b-hIL-17A) o mIL-17A biotinilada (b-mIL-17A) en cuatro ciclos divididos en seis carriles diferentes (Tabla 2). La preparación de una solución madre de fagos, el procedimiento de selección y la amplificación de fagos entre ciclos de selección se realizaron esencialmente como se describe en el
- 45 documento WO2009/077175 para la selección contra otro objetivo con las siguientes excepciones. Excepción 1: se utilizó PBS suplementado con albúmina de suero bovino al 3% (BSA, Sigma, cat. No. A3059) y Tween20 al 0,1% (Acros Organics cat. No. 233362500) como tampón de selección. Excepción 2: la preselección se realizó en los ciclos 1-3 mediante incubación de una solución madre de fagos con estreptavidina Dynabeads® M-280 (perlas SA, Invitrogen, cat. No. 11206D). Excepción 3: todos los tubos y perlas utilizados en las selecciones se bloquearon previamente con PBS suplementado con BSA al 5% y Tween20 al 0,1%. Excepción 4: las selecciones se realizaron en solución a TA y el tiempo de selección fue de 200 min en el primer ciclo y de 120 min en los siguientes ciclos. Excepción 5: esto fue seguido por la captura de complejos objetivos-fago en perlas SA utilizando perlas de 1 mg por 6,4 µg de b-hIL-17A o b-mIL-17A. Excepción 6: se utilizaron para la infección células de *E. coli* cepa XL1-Blue (Agilent Technologies, cat. No. 200268) cultivadas en medio suplementado con 10 µg/mL de tetraciclina (excepción 7).
- 50 Excepción 8: se utilizaron placas de extracto de levadura con triptona (15 g/L de agar, 10 g/L agua triptonada (Merck), 5 g/L de extracto de levadura, 3 g/L de NaCl, glucosa al 2%) suplementadas con 0,1 g/L de ampicilina y 0,01 g/L de tetraciclina para la propagación de bacterias. Excepción 9: se permitió que un exceso de 10 veces del fago auxiliar M13K07 en comparación con las bacterias infectara las bacterias en fase logarítmica.
- 55 Excepción 8: se utilizaron placas de extracto de levadura con triptona (15 g/L de agar, 10 g/L agua triptonada (Merck), 5 g/L de extracto de levadura, 3 g/L de NaCl, glucosa al 2%) suplementadas con 0,1 g/L de ampicilina y 0,01 g/L de tetraciclina para la propagación de bacterias. Excepción 9: se permitió que un exceso de 10 veces del fago auxiliar M13K07 en comparación con las bacterias infectara las bacterias en fase logarítmica.
- 60 En la Tabla 2 se muestra una descripción general de la estrategia de selección, que describe una mayor rigurosidad en los ciclos posteriores obtenidos usando una concentración objetivo reducida y un mayor número de lavados.

Tabla 2: Resumen de la selección de una biblioteca primaria

Ciclo	Carril de selección	Solución madre de fagos de la biblioteca o carril de selección	Objetivo	Concentración del objetivo (nM)	Número de lavados	Mayor cantidad de fagos en el carril de selección
1	1	Zlib006Naive.II	hIL-17A	50	2	-
2	1-1	1	hIL-17A	25	4	Sí
2	1-2	1	hIL-17A	25	4	-
2	1-3	1	hIL-17A	5	5	-
2	1-4	1	mIL-17A	50	4	-
3	1-1-1	1-1	hIL-17A	12,5	6	Sí
3	1-2-1	1-2	hIL-17A	12,5	6	-
3	1-3-1	1-3	hIL-17A	1	8	-
3	1-4-1	1-4	hIL-17A	12,5	6	-
3	1-4-2	1-4	mIL-17A	5	8	-
4	1-1-1-1	1-1-1	hIL-17A	5	8	Sí
4	1-2-1-1	1-2-1	hIL-17A	5	8	-
4	1-3-1-1	1-3-1	hIL-17A	0,25	12	-
4	1-3-1-2	1-3-1	hIL-17A	0,05	15	-
4	1-4-1-1	1-4-1	mIL-17A	5	8	-
4	1-4-2-1	1-4-2	hIL-17A	0,5	12	-

El carril 1 se dividió en el segundo al cuarto ciclo, lo que resultó en un total de cuatro carriles (1-1 a 1-4) en el ciclo 2, cinco carriles (1-1-1 a 1-4-2) en el ciclo 3 y seis carriles (1-1-1-1 a 1-4-2-1) en el ciclo 4. El número de partículas de fago utilizadas para las selecciones fue aproximadamente 2000 veces el número de partículas de fago eluidas en el ciclo anterior, pero se utilizó una mayor cantidad en los carriles de selección 1-1, 1-1-1 y 1-1-1-1.

Se realizaron lavados durante 1 min usando PBST al 0,1% (PBS suplementado con Tween-20 al 0,1%) y la elución se llevó a cabo como se describe en el documento WO2009/077175.

Producción de variantes de Z para ELISA: las variantes de Z se produjeron inoculando colonias individuales de las selecciones en 1 mL de medio TSB-YE suplementado con 100 µg/mL de ampicilina e IPTG 0,1 mM en placas de pozos profundos (Nunc, cat. No. 278752). Las placas se incubaron durante 18-24 horas a 37 °C. Las células se sedimentaron mediante centrifugación, se resuspendieron en 400 µL de PBST al 0,05% y se congelaron a -80 °C para liberar la fracción periplásmica de las células. Las muestras congeladas se descongelaron en un baño de agua y el procedimiento de congelación-descongelación se repitió seis veces. Se añadieron 400 µL de PBST al 0,05% a las muestras descongeladas y las células se sedimentaron mediante centrifugación.

El sobrenadante final del extracto periplásmico contenía las variantes de Z como fusiones con ABD, expresadas como AQHDEALE-[Z#####]-VDYV-[ABD]-YVPG (Gronwall et al., citado más arriba). Z##### se refiere a variantes de Z individuales de 58 residuos de aminoácidos.

Cribado por ELISA de variantes de Z: se analizó la unión de variantes de Z a IL-17A humana en ensayos ELISA. Se recubrieron placas ELISA de 96 pozos de media área (Costar, catálogo No. 3690) a 4 °C durante la noche con 2 µg/mL de un anticuerpo anti-ABD de cabra (producido internamente) diluido en tampón de recubrimiento (carbonato de sodio 50 mM, pH 9,6; Sigma, cat. No. C3041). Se vertió la solución de anticuerpo y se lavaron los pozos con agua y se bloquearon con 100 µL de PBSC (PBS suplementado con caseína al 0,5%) durante 1 a 3 horas a TA. La solución de bloqueo se descartó y se añadieron 50 µL de soluciones periplásmicas a los pozos y se incubaron durante 1,5 horas a TA con agitación lenta. Como control de blanco, se añadió PBST al 0,05% en lugar de la muestra periplásmica. Se vertieron los sobrenadantes y se lavaron los pozos 4 veces con PBST al 0,05%. A continuación, se añadieron a cada pozo 50 µL de b-hIL-17A a una concentración de 6,5 nM en PBSC. Las placas se incubaron durante 1,5 horas a TA seguido de lavados como se describió anteriormente. Se añadió HRP conjugada con estreptavidina (Thermo Scientific, cat. No. N100) diluida 1:30.000 en PBSC, a los pozos y se incubaron las placas durante 1 hora. Después de lavar como se describió anteriormente, se añadieron 50 µL de sustrato TMB ImmunoPure (Thermo Scientific, cat. No. 34021) a los pozos y las placas se trataron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se midió la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas de múltiples pozos Victor<sup>3</sup> (Perkin Elmer).

Secuenciación: en paralelo con el cribado por ELISA, se seleccionaron todos los clones para la secuenciación. Los fragmentos de PCR se amplificaron a partir de colonias individuales, se secuenciaron y analizaron esencialmente como se describe en el documento WO2009/077175.

## 5 Resultados

Selección de presentación en fagos de variantes de Z de unión a IL-17A: Se obtuvieron clones individuales después de cuatro ciclos de selecciones de presentación en fagos contra b-hIL-17A y b-mIL-17A.

10 Cribado por ELISA de variantes de Z: Los clones obtenidos después de cuatro ciclos de selección se expandieron en placas de 96 pozos y se cribaron para determinar la actividad de unión de hIL-17A en ELISA. Se encontró que 42 variantes de Z daban una respuesta de 4 x el control de blanco o superior (0,43-3,2 AU) contra hIL-17A a una concentración de 6,5 nM. No se obtuvo respuesta para el control de blanco.

15 Secuenciación: la secuenciación se realizó para los clones obtenidos después de cuatro ciclos de selección. A cada variante se le asignó un número de identificación único #####, y las variantes individuales se denominan Z#####. Las secuencias de aminoácidos de las variantes de Z largas de 58 residuos de aminoácidos se enumeran en la Figura 1 y en el listado de secuencias como SEQ ID NO: 1200-1216. Los motivos de unión a IL-17A deducidos se extienden desde el residuo 8 al residuo 36 en cada secuencia. Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos largos de 49  
20 residuos de aminoácidos que se predice que constituyen el haz completo de tres hélices dentro de cada una de estas variantes de Z se extienden desde el residuo 7 al residuo 55.

### Ejemplo 2

## 25 Producción de variantes de Z monoméricas de unión a IL-17A

Este ejemplo describe el procedimiento general para la subclonación y producción de variantes de Z etiquetadas con His y variantes de Z en fusión con ABD, que se utilizan en todos los experimentos de caracterización a continuación.

## 30 Materiales y métodos

Subclonación de variantes de Z con una etiqueta His: El ADN de la variante de Z respectiva se amplificó a partir del vector de biblioteca pAY02592. Se aplicó una estrategia de subclonación para la construcción de moléculas monoméricas variantes de Z con etiqueta His<sub>6</sub> del extremo terminal N usando técnicas de biología molecular estándar (esencialmente como se describe en el documento WO2009/077175 para variantes de Z que se unen a otro objetivo).  
35 Los fragmentos del gen Z se subclonaron en el vector de expresión pAY01448 dando como resultado la secuencia codificada MGSSHHHHHLQ-[Z#####]-VD.

Subclonación de variantes de Z en fusión con ABD: El ADN de la variante de Z respectiva se amplificó a partir del vector de biblioteca pAY02592. Se realizó una PCR utilizando pares de cebadores adecuados y los fragmentos de genes resultantes se escindieron con las enzimas de restricción *Pst*I y *Acc*I y se ligaron en el vector de expresión pAY03362 digerido con las mismas enzimas, dando como resultado una proteína de fusión ABD, en la que la variante ABD es PP013 (SEQ ID NO: 1224). Las construcciones codificadas por los vectores de expresión fueron MGSSLQ-[Z#####]-VDSS-PP013.  
40

45 Cultivo: Se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) con plásmidos que contenían el fragmento génico de cada variante de Z respectiva de unión a IL-17A y se cultivaron a 37°C en 800 o 1000 mL de medio TSB-YE suplementado con 50 µg/mL de kanamicina. Con el fin de inducir la expresión de proteínas, se añadió IPTG a una concentración final de 0,2 mM a una DO<sub>600</sub> = 2 y el cultivo se incubó a 37°C durante otras 5 h. Las células se recolectaron por centrifugación.  
50

Purificación de variantes de Z de unión a IL-17A con una etiqueta His: Se resuspendieron aproximadamente 2-5 g de cada sedimento celular en 30 mL de tampón de unión (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, pH 7,4) suplementado con Benzonase® (Merck) a una concentración de 15 U/mL. Después de la rotura celular, los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación y cada sobrenadante se aplicó en una columna His GraviTrap IMAC de 1 mL (GE Healthcare). Los contaminantes se eliminaron lavando con tampón de lavado (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 60 mM, pH 7,4 y las variantes de Z de unión a IL-17A se eluyeron posteriormente con tampón de elución (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 500 mM, pH 7,4).  
55

60 Purificación de variantes de Z de unión a IL-17A en fusión con ABD: Se resuspendieron aproximadamente 1-2 g de cada sedimento celular en 30 mL de tampón TST (Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, NaCl 200 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 8,0) suplementado con Benzonase® (Merck). Después de la rotura celular por sonicación y clarificación por centrifugación, cada sobrenadante se aplicó en una columna de flujo por gravedad con 1 mL de agarosa inmovilizada con un ligando anti-ABD (producido internamente). Después de lavar con tampón TST y tampón NH<sub>4</sub>Ac 5 mM pH 5,5,  
65 las variantes de Z fusionadas con ABD se eluyeron con HAc 0,1 M. A las fracciones eluidas en la etapa de purificación por cromatografía de afinidad de agarosa anti-ABD, se añadió acetonitrilo (ACN) hasta una concentración final del

10% y la muestra se cargó en una columna Resource 15RPC de 1 mL (GE Healthcare), previamente equilibrada con disolvente A de RPC (0,1% de TFA, 10% de ACN, 90% de agua). Después de lavar la columna con el disolvente A de RPC, las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de disolvente B de RPC al 0-50% (0,1% de TFA, 80% de ACN, 20% de agua) para 20 mL. Las fracciones que contenían variantes de Z puras fusionadas con ABD se identificaron mediante análisis SDS-PAGE y se combinaron. Después de la purificación por RPC, el tampón de la combinación se cambió a PBS (KCl 2,68 mM, NaCl 137 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, pH 7,4) usando columnas PD-10 (GE Healthcare). Finalmente, las variantes de Z fusionadas con ABD se purificaron en columnas rojas EndoTrap® de 1 mL (Hyglos) para garantizar un bajo contenido de endotoxinas.

10 Las concentraciones de proteína se determinaron midiendo la absorbancia a 280 nm, usando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 y el coeficiente de extinción de la proteína respectiva. La pureza se analizó mediante SDS-PAGE teñida con azul Coomassie y se confirmó la identidad de cada variante de Z purificada usando análisis por LC/MS.

## 15 Resultados

Cultivo y purificación: Las variantes de Z de unión a IL-17A con una etiqueta His<sub>6</sub>, así como las variantes de Z fusionadas en su extremo terminal C a ABD, se expresaron como productos génicos solubles en *E. coli*. La cantidad de proteína purificada de aproximadamente 1-5 g de sedimento bacteriano se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 280 nm y varió de aproximadamente 5 mg a 20 mg para las diferentes variantes de Z de unión a IL-17A. El análisis SDS-PAGE de cada preparación final de proteína mostró que estas contenían predominantemente la variante de Z de unión a IL-17A. La identidad y el peso molecular correctos de cada variante de Z se confirmaron mediante análisis por HPLC-MS.

## 25 Ejemplo 3

Evaluación de la capacidad de bloqueo de variantes primarias de Z de unión a IL-17A

30 Los fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) producen IL-6 tras la estimulación con IL-17A (Chang y Dong 2007, Cell Research 17: 435-440) y la cantidad de IL-6 liberada al sobrenadante se correlaciona con la concentración de IL-17A añadida. Por tanto, el bloqueo de IL-17A conduce a una reducción de IL-6 en el sobrenadante que puede cuantificarse. En este ejemplo, el ensayo se utilizó para evaluar la capacidad de bloqueo de las variantes de Z de unión a IL-17A Z06260 (SEQ ID NO: 1200), Z06282 (SEQ ID NO: 1206) y Z06455 (SEQ ID NO: 1214), solas o en fusión con ABD (PP013; SEQ ID NO: 1224).

## 35 Materiales y métodos

Ensayo de NHDF con variantes de Z etiquetadas con His<sub>6</sub>: Se cultivaron células NHDF (Lonza, cat. No. CC-2511) en medio basal de fibroblastos (Lonza, cat. No. CC-3132) suministradas con factores promotores del crecimiento (Lonza, cat. no. CC-5034). El día antes del experimento, se sembraron 10<sup>5</sup> células en 100 µL por pozo en placas de cultivo de 96 pozos (Greiner, cat. No. 655180). El día del experimento, se prepararon diluciones de las variantes de Z específicas de IL-17A His<sub>6</sub>-Z06260, His<sub>6</sub>-Z06282 y His<sub>6</sub>-Z06455 en una placa de 96 pozos separada. Las variantes de Z se valoraron en tres etapas desde 3130 nM hasta 0,2 nM en medio que contenía hIL-17A 0,031 nM. También se preparó una curva estándar de hIL-17A (0,002-31 nM) así como controles que contenían medio con hIL-17A 0,031 nM o medio solo. Se descartó el medio en la placa con las células NHDF cultivadas durante la noche. Las muestras de prueba, las muestras de la curva estándar y los controles se transfirieron a la placa que contenía las células. Las células NHDF se estimularon durante 18-24 h a 37°C y el contenido de IL-6 en los sobrenadantes se cuantificó posteriormente usando el ELISA específico de IL-6 que se describe a continuación.

50 Ensayo de NHDF con variantes de Z fusionadas con ABD y etiquetadas con His<sub>6</sub>: Se prepararon células NHDF como se describió anteriormente. El día del experimento, se prepararon diluciones de las construcciones variantes de Z específicas de IL-17A His<sub>6</sub>-Z06282, His<sub>6</sub>-Z06455, Z06260-ABD, Z06282-ABD y Z06455-ABD en una placa separada de 96 pozos. Las construcciones de la variante de Z se valoraron en cuatro etapas desde 780 nM a 0,2 nM en medio que contenía IL-17A 0,031 nM y HSA 8 µM. La preparación de una curva estándar de IL-17A y los controles, así como el análisis más adelante, se realizó como se describió anteriormente.

60 ELISA de IL-6: Se recubrieron placas de media área de 96 pozos (Costar, cat. No. 3690) con el anticuerpo monoclonal anti-IL-6 MAB206 (R&D Systems) a una concentración de 4 µg/mL en PBS (50 µL/pozo) y se incubó durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se enjuagaron dos veces con agua del grifo y se bloquearon con PBS + BSA al 2% (Sigma) durante 2 h. Se añadió un estándar de IL-6 (R&D Systems, cat. No. 206-IL-50), titulado en una serie de dilución doble (0,2-50 ng/mL) y los sobrenadantes de la placa de ensayo celular a las placas de ELISA recubiertas (50 µL/pozo) y se incubó durante 1,5 h a TA. Las placas se lavaron 4 veces en una lavadora de ELISA automatizada y se añadieron 0,25 µg/mL (50 µL/pozo) de anticuerpo policlonal anti-IL-6 biotinilado (R&D Systems, BAF206). Después de la incubación durante 1 hora, se lavó la placa y se añadieron a cada pozo 50 µL de estreptavidina-HRP (Thermo Fisher, cat. No. N100) diluido 8000 veces. Después de una hora adicional de incubación y posterior lavado, la placa se reveló con 50 µL de TMB (Thermo Fisher, cat. No. 34021) por pozo y las reacciones se detuvieron con 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M.

Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de 96 pozos (Victor<sup>3</sup>) y se calculó la concentración de IL-6 en cada muestra. Los resultados se presentan como el porcentaje de producción máxima de IL-6, calculado como:

$$100 - [(ABS_{\text{bloqueador de IL-17A}} - ABS_{\text{fondo}}) / (ABS_{\text{producción máx. de IL-6}} - ABS_{\text{fondo}})] \times 100$$

#### Resultados

Los resultados del primer ensayo de NHDF mostraron que las tres variantes de Z His<sub>6</sub>-Z06260, His<sub>6</sub>-Z06282 y His<sub>6</sub>-Z06455 bloquearon la producción de IL-6 inducida por IL-17A de una manera dependiente de la dosis (Figura 2A). Los valores de IC<sub>50</sub> fueron aproximadamente 40-140 nM.

Se repitió el ensayo de NHDF con las mismas variantes de Z fusionadas con ABD así como con la inclusión de HSA en el ensayo para determinar la unión retenida al antígeno cuando se imitan las condiciones *in vivo*. *In vivo*, ABD se unirá a la albúmina y permitirá una vida media en circulación más prolongada. Los resultados mostraron que los tres ligantes en fusión con ABD bloquearon la producción de IL-6 inducida por IL-17A igualmente bien o mejor que las variantes de Z etiquetadas con His<sub>6</sub> (Figura 2B). Los valores de IC<sub>50</sub> del segundo ensayo se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: Valores de IC<sub>50</sub> para variantes primarias de Z que bloquean la producción de IL-6 inducida por IL-17A en presencia de HSA

Analito	SEQ ID NO de la variante de Z	IC <sub>50</sub> (nM)
Z06260-ABD	1200	8
His <sub>6</sub> -Z06282	1206	16
Z06282-ABD	1206	15
His <sub>6</sub> -Z06455	1214	67
Z06455-ABD	1214	15

#### Ejemplo 4

Diseño y construcción de una primera biblioteca madurada de variantes de Z de unión a IL-17A

En este ejemplo, se diseñó y construyó una biblioteca madurada. La biblioteca se utilizó para la selección de variantes de Z de unión a IL-17A adicionales. Normalmente, se espera que las selecciones de bibliotecas maduras den como resultado ligantes con mayor afinidad (Orlova et al., (2006) Cancer Res 66 (8): 4339-48). En este estudio, se generaron enlazadores monocatenarios aleatorizados utilizando síntesis de ADN de grupo dividido, lo que permitió la incorporación de codones definidos en las posiciones deseadas en la síntesis.

#### Materiales y métodos

Diseño de la biblioteca: La biblioteca se basó en las secuencias de las variantes de Z de unión a IL-17A identificadas como se describe en el Ejemplo 1. En la nueva biblioteca, 13 posiciones variables en la estructura de la molécula Z estaban sesgadas hacia ciertos residuos de aminoácidos, de acuerdo con una estrategia basada en las secuencias variantes de Z definidas en la SEQ ID NO: 1200-1216. Se generó un enlazador de ADN usando síntesis de grupo dividido que contiene la siguiente secuencia de 147 pb ordenada a partir de ADN 2.0 (Menlo Park, CA, EE. UU.): 5'-AA ATA AAT CTC GAG GTA GAT GCC AAA TAC GCC AAA GAA NNN NNN NNN GCG NNN NNN GAG ATC NNN NNN TTA CCT AAC TTA ACC NNN NNN CAA NNN NNN GCC TTC ATC NNN AAA TTA NNN GAT GAC CCA AGC CAG AGC TCA TTA TTT A-3' (SEQ ID NO: 1248; los codones aleatorios se denotan como NNN), que comprende una secuencia codificante para una hélice 1 y 2 parcialmente aleatorizada en la secuencia de aminoácidos correspondiente, flanqueada por sitios de restricción para *Xho*I y *Sac*I. Se presentan las distribuciones teóricas de los residuos de aminoácidos en la nueva biblioteca que incluyen 13 posiciones de Z variables (9, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 24, 25, 27, 28, 32 y 35) en la estructura de la molécula Z en la Tabla 4. El tamaño teórico de biblioteca resultante es de 6,1 x 10<sup>9</sup> variantes.

Tabla 4: Diseño de la biblioteca, primera maduración

Posición del aminoácido en la molécula variante de Z	Aleatorización (abreviaturas de los aminoácidos)	No de aminoácidos	Proporción
9	A, H, M, W, Y	5	1/5
10	A, D (60 %), G, L, N	5	1/10, 6/10 (D)
11	D, E, F, N, Q, R, Y	7	1/7
13	A, E, Q, W	4	1/4

(continuación)

Posición del aminoácido en la molécula variante de Z	Aleatorización (abreviaturas de los aminoácidos)	No de aminoácidos	Proporción
14	F, I, L, M, V, W	6	1/6
17	A, F, Q, W	4	1/4
18	A, D, E, L, M, S, T	7	1/7
24	A, H, R, T, W, Y	6	1/6
25	A, D, H, R, V	5	1/5
27	A, G, Q, R, S, W	6	1/6
28	F, H, K, N, R, S, T, V, Y	9	1/9
32	A, G, H, I, Q, R, S, V	8	1/8
35	I, L, N, R	4	1/4

5 Construcción de la biblioteca: La biblioteca se amplificó usando polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, cat. No. 4311816) durante 12 ciclos de PCR, y los productos combinados se purificaron con el kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN, cat. No. 28106) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. El conjunto purificado de fragmentos de biblioteca aleatorizados se digirió con las enzimas de restricción *Xho*I y *Sac*I-HF (New England Biolabs, cat. No. R0146L y cat. No. R3156M, respectivamente) y se concentró usando el kit de purificación de PCR QIAquick. Posteriormente, el producto se sometió a electroforesis en gel utilizando un gel preparativo de agarosa al 2,5% (agarosa Nuisieve GTC, Cambrex, Invitrogen) y se purificó a partir de dicho gel utilizando el kit de extracción de gel QIAGEN (QIAGEN, cat. No. 28706) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

15 El vector fagémido pAY02592 (esencialmente como pAffi1 descrito en Gronwall et al., citado más arriba) se restringió con las mismas enzimas, se purificó usando extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol. Los fragmentos restringidos y el vector restringido se ligaron en una proporción molar de 5:1 con ADN ligasa T4 (Fermentas, cat. No. EL0011) durante 2 horas a TA, seguido de incubación durante la noche a 4 °C. El ADN ligado se recuperó mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol, seguido de disolución en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5. Por lo tanto, la biblioteca resultante en el vector pAY02592 codificó variantes de Z, cada una fusionada a un dominio de unión a albúmina (ABD) derivado de la proteína G estreptocócica.

20 Las reacciones de ligación (aproximadamente 160 ng de ADN/transformación) se electroporaron en células *E. coli* ER2738 electrocompetentes (Lucigen, Middleton, WI, EE.UU., 50 µL). Inmediatamente después de la electroporación, se añadió aproximadamente 1 mL de medio de recuperación (suministrado con células de *E. coli* ER2738). Las células transformadas se incubaron a 37 °C durante 60 min. Se tomaron muestras para valoración y determinación del número de transformantes. A continuación, las células se combinaron y se cultivaron durante la noche a 37 °C en 1 L de medio TSB-YE, suplementado con glucosa al 2%, 10 µg/mL de tetraciclina y 100 µg/mL de ampicilina. Las células se sedimentaron durante 15 min a 4.000 g y se resuspendieron en una solución de PBS/glicerol (aproximadamente 40% de glicerol). Las células se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C. Los clones de la biblioteca de variantes de Z se secuenciaron con el fin de verificar el contenido y evaluar el resultado de la biblioteca construida con respecto al diseño de la biblioteca. La secuenciación se realizó como se describe en el Ejemplo 1 y se verificó la distribución de aminoácidos.

35 Preparación de una solución madre de fagos: Se preparó una solución madre de fagos que contenía la biblioteca de fagémidos en un fermentador de 20 L (Belach Bioteknik). Se inocularon células de una solución madre de glicerol que contenía la biblioteca de fagémidos en 10 L de TSB-YE suplementado con 1 g/L de glucosa, 100 mg/L de ampicilina y 10 mg/L de tetraciclina. Cuando las células alcanzaron una densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de 0,52, se infectó aproximadamente 1,7 L del cultivo usando un exceso molar de 5 veces del fago auxiliar M13K07. Las células se incubaron durante 30 min, después de lo cual se llenó el fermentador hasta 10 L con medio de fermentación complejo [2,5 g/L  $(NH_4)_2SO_4$ ; 5,0 g/L de extracto de levadura; 30 g/L de triptona, 2 g/L de  $K_2HPO_4$ ; 3 g/L de  $KH_2PO_4$ , 1,25 g/L de  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2 H_2O$ ; agente antiespumante Breox FMT30 0,1 mL/L]. Se añadieron los siguientes componentes: 10 mL de carbenicilina de 25 mg/mL; 5 mL de kanamicina de 50 mg/mL; 1 mL de IPTG 1 M; 17,5 mL/L de  $MgSO_4$  1,217 M y 5 mL de una solución de oligoelementos [ $FeCl_3$  129 mM;  $ZnSO_4$  36,7 mM;  $CuSO_4$  10,6 mM;  $MnSO_4$  78,1 mM;  $CaCl_2$  94,1 mM, disuelto en HCl 1,2 M]. Se inició un cultivo de alimentación por lotes limitado en glucosa en el que se alimentó al reactor una solución de glucosa de 600 g/L (3,5 g/h al inicio, 37,5 g/h después de 20 h continuando hasta el final del cultivo). Mediante la adición automática de  $NH_4OH$  al 25%, el pH se controló a pH 7. Se suplementó con aire (5 L/min) y el agitador se ajustó a 500 rpm. Después de 24 h de cultivo alimentado por lotes, la  $DO_{600}$  fue de 19,4. Las células del cultivo se sedimentaron mediante centrifugación a 15.900 g. Las partículas de fago se precipitaron del sobrenadante dos veces en PEG/NaCl, se filtraron y se disolvieron en PBS y glicerol como se describe en el Ejemplo 1. Los patrones de fagos se almacenaron a -80 °C hasta su uso en la selección.

Resultados

5 Construcción de la biblioteca: La nueva biblioteca se diseñó con base en un conjunto de variantes de Z de unión a IL-17A con propiedades de unión verificadas (Ejemplo 1 y 3). El tamaño teórico de la biblioteca diseñada fue de  $6,1 \times 10^9$  variantes de Z. El tamaño real de la biblioteca, determinado por titulación después de la transformación en células de *E. coli* ER2738, fue de  $4,5 \times 10^9$  transformantes.

10 La calidad de la biblioteca se probó secuenciando 96 transformantes y comparando sus secuencias reales con el diseño teórico. Se demostró que el contenido de la biblioteca real en comparación con la biblioteca diseñada era satisfactorio. Por lo tanto, se construyó con éxito una biblioteca madurada de ligantes potenciales de IL-17A.

Ejemplo 5

15 Selección, cribado y caracterización de variantes de Z de la primera biblioteca madurada

Materiales y métodos

20 Selección de presentación en fagos de variantes de Z de unión a IL-17A: Las proteínas objetivo hIL-17A y mL-17A se biotinilaron como se describe en el Ejemplo 1. Se realizaron selecciones de presentación en fagos, usando la nueva biblioteca de moléculas variantes de Z construida como se describe en el Ejemplo 4, en cuatro ciclos contra hIL-17A y mL-17A esencialmente como se describe en el Ejemplo 1, con las siguientes excepciones. Excepción 1: se utilizó PBST al 0,1% como tampón de selección. En el momento de la selección, se añadieron suero de ternera fetal (FCS, Gibco, cat. No. 10108-165) y albúmina de suero humano (HSA, AlbuCult, Novozymes, cat. No. 230-005) al tampón de  
25 selección hasta una concentración final de 10 % y 1,5  $\mu$ M, respectivamente. Excepción 2: se realizó una etapa de preselección en el ciclo 1 incubando la solución madre de fagos con perlas SA. Excepción 3: todos los tubos y perlas utilizados en la selección se bloquearon previamente con PBS suplementado con BSA al 3% y Tween20 al 0,1%. Excepción 4: el tiempo de selección fue de 140, 70, 60 y 50 min en los ciclos 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

30 En la Tabla 5 se muestra una descripción general de la estrategia de selección, que describe una mayor rigurosidad en los ciclos posteriores obtenidos mediante el uso de una concentración objetivo reducida y un mayor número de lavados.

Tabla 5: Resumen de la selección de la primera biblioteca madurada

Ciclo	Carril de selección	Solución madre de fagos de la biblioteca o carril de selección	Objetivo	Conc. objetivo (nM)	Número de lavados de 1 min	Número de lavados de 10 min	Número de lavados durante la noche	Elusión a
1	1	Zlih006IL-17A.I	hIL-17A	25	2	-	-	pH 5,5
1	2	Zlih006IL-17A.I	hIL-17A	12,5	3	-	-	pH 2,2
1	3	Zlih006IL-17A.I	hIL-17A	25	2	-	-	pH 2,2
2	1-1	1	hIL-17A	12,5	6	-	-	pH 5,5
2	2-1	2	hIL-17A	2,5	10	-	-	pH 2,2
2	2-2	2	hIL-17A	5	6	-	-	pH 2,2
2	3-1	3	hIL-17A	7,5	10	-	-	pH 2,2
2	3-2	3	hIL-17A	12,5	6	-	-	pH 2,2
2	3-3	3	mIL-17A	12,5	6	-	-	pH 2,2
3	1-1-1	1-1	hIL-17A	2,5	10	-	-	pH 5,5
3	2-1-1	2-1	hIL-17A	0,05	15	1	-	pH 2,2
3	2-2-1	2-2	hIL-17A	0,5	15	1	-	pH 2,2
3	3-1-1	3-1	hIL-17A	0,75	15	1	-	pH 2,2
3	3-2-1	3-2	hIL-17A	2,5	10	-	-	pH 2,2
3	3-3-1	3-3	hIL-17A	5	10	-	-	pH 2,2
4	1-1-1-1a	1-1-1	hIL-17A	0,05	20	-	-	pH 5,5

(continuación)

Ciclo	Carril de selección	Solución madre de fagos de la biblioteca o carril de selección	Objetivo	Conc. objetivo (nM)	Número de lavados de 1 min	Número de lavados de 10 min	Número de lavados durante la noche	Elusión a
4	1-1-1-1b	1-1-1	hIL-17A	0,05	20	-	1	pH 5,5
4	1-1-1-2a	1-1-1	hIL-17A	1	12	-	-	pH 5,5
4	1-1-1-2b	1-1-1	hIL-17A	1	12	-	1	pH 5,5
4	2-1-1-1a	2-1-1	hIL-17A	0,0025	30	-	-	pH 2,2
4	2-1-1-1b	2-1-1	hIL-17A	0,0025	30	-	1	pH 2,2
4	2-1-1-2a	2-1-1	hIL-17A	0,025	20	-	-	pH 2,2
4	2-1-1-2b	2-1-1	hIL-17A	0,025	20	-	1	pH 2,2
4	2-2-1-1a	2-2-1	hIL-17A	0,005	30	-	-	pH 2,2
4	2-2-1-1b	2-2-1	hIL-17A	0,005	30	-	1	pH 2,2
4	2-2-1-2a	2-2-1	hIL-17A	0,05	20	-	-	pH 2,2
4	2-2-1-2b	2-2-1	hIL-17A	0,05	20	-	1	pH 2,2
4	3-1-1-1 a	3-1-1	hIL-17A	0,025	30	-	-	pH 2,2
4	3-1-1-1 b	3-1-1	hIL-17A	0,025	30	-	1	pH 2,2
4	3-1-1-2a	3-1-1	hIL-17A	0,25	20	-	-	pH 2,2
4	3-1-1-2b	3-1-1	hIL-17A	0,25	20	-	1	pH 2,2
4	3-2-1-1a	3-2-1	hIL-17A	0,05	20	-	-	pH 2,2
4	3-2-1-1b	3-2-1	hIL-17A	0,05	20	-	1	pH 2,2
4	3-2-1-2a	3-2-1	hIL-17A	1	12	-	-	pH 2,2
4	3-2-1-2b	3-2-1	hIL-17A	1	12	-	1	pH 2,2
4	3-3-1-1a	3-3-1	mIL-17A	0,05	20	-	-	pH 2,2
4	3-3-1-1b	3-3-1	mIL-17A	0,05	20	-	1	pH 2,2
4	3-3-1-2a	3-3-1	mIL-17A	1	15	-	-	pH 2,2
4	3-3-1-2b	3-3-1	mIL-17A	1	15	-	1	pH 2,2

5 Los carriles 1-3 en el ciclo 1 se dividieron del segundo al cuarto ciclos, lo que resultó en un total de seis carriles (1-1 a 3-3) en el ciclo 2, seis carriles (1-1-1 a 3-3-1) en el ciclo 3 y 24 carriles (1-1-1-1a a 3-3-1-2b) en el ciclo 4. Los lavados se realizaron utilizando PBST al 0,1% durante 1 min. Sin embargo, para el carril 1-3 en el ciclo 3, uno de los lavados duró 10 minutos.

10 Después del último lavado en el ciclo 4, los complejos objetivo-fago en perlas SA de todos los carriles se dividieron en dos partes iguales. Las partículas de fago unidas de la primera parte se eluyeron inmediatamente, mientras que la segunda parte se sometió a un lavado durante la noche antes de la elución de las partículas de fagos. Las partículas de fago unidas se eluyeron usando dos procedimientos diferentes: 1) con glicina-HCl, pH 2,2, como en el Ejemplo 1, o 2) 500 µL de fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 5,5 y neutralización con 500 µL de PBS .

15 Amplificación de partículas de fagos: La amplificación de partículas de fagos entre el ciclo de selección 1 y 2 se realizó esencialmente como se describe en el Ejemplo 1, con las siguientes tres excepciones. Excepción 1: se utilizó *E. coli* ER2738 para la amplificación de fagos. Excepción 2: se utilizaron fagos auxiliares M13K07 en un exceso de 5 veces. Excepción 3: la amplificación de partículas de fagos entre los ciclos de selección 2 y 4 se realizó de la siguiente manera: después de la infección de *E. coli* ER2738 en fase logarítmica con partículas de fagos, TSB suplementado con glucosa al 2%, se añadieron 10 µg/mL de tetraciclina y 100 µg/mL de ampicilina y seguido por incubación con rotación durante 30 min a 37 °C. A continuación, las bacterias se infectaron con el fago auxiliar M13K07. Las bacterias infectadas se sedimentaron mediante centrifugación, se resuspendieron en medio TSB-YE suplementado con IPTG 100 µM, 25 µg/mL de kanamicina y 100 µg/mL de ampicilina, y se cultivaron durante la noche a 30 °C. Los cultivos de una noche se centrifugaron y las partículas de fago en el sobrenadante se precipitaron dos veces con tampón

20

PEG/NaCl. Por último, los fagos se resuspendieron en el tampón de selección antes de entrar en el siguiente ciclo de selección.

5 En el ciclo de selección final, las bacterias en fase logarítmica se infectaron con eluato y se diluyeron antes de esparcirlas sobre placas TBAB (30 g/L de base de agar sangre triptosa, Oxoid cat. No. CMO233B) suplementado con 0,2 g/L de ampicilina para formar colonias individuales para ser utilizadas en el cribado por ELISA.

10 Secuenciación de ligantes potenciales: Se seleccionaron clones individuales de los diferentes carriles de selección para secuenciación. La amplificación de fragmentos de genes y el análisis de secuencia de fragmentos de genes se realizaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 1.

15 Cribado por ELISA de variantes de Z: Se seleccionaron al azar colonias individuales que contenían variantes de Z (expresadas como proteínas de fusión ABD variantes de Z como se describe en el Ejemplo 1) de los clones seleccionados de la biblioteca madurada, y se hicieron crecer en cultivos esencialmente como se describe en el Ejemplo 1. La preparación de los sobrenadantes periplásmicos y los cribados por ELISA también se realizaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 1 con las dos excepciones siguientes. Excepción 1: se usó hIL-17A biotinilado a una concentración de 0,4 nM. Excepción 2: se usó la fracción periplásmica de la variante de Z Z06282 (SEQ ID NO: 1206) a partir de la selección primaria como control positivo.

20 Análisis de EC<sub>50</sub> de variantes de Z: Una selección de variantes de Z de unión a IL-17A se sometió a un análisis de respuesta frente a una serie de diluciones de b-hIL-17A usando ELISA como se describió anteriormente. Se añadió proteína objetivo biotinilada a una concentración de 6 nM y se diluyó paso a paso 1:3 hasta 8 pM. Como control de fondo, las variantes de Z también se ensayaron sin añadir proteína objetivo. Se incluyeron muestras de periplasma que contenían el ligante primario de IL-17A Z06282 (SEQ ID NO: 1206) como control positivo. Los datos se analizaron usando GraphPad Prism 5 y regresión no lineal, y se calcularon los valores de EC<sub>50</sub> (la mitad de la concentración efectiva máxima).

#### Resultados

30 Selección de presentación en fagos de variantes de Z de unión a IL-17A maduras: La selección se realizó en un total de 24 carriles paralelos que contenían cuatro ciclos cada uno. Los diferentes carriles de selección diferían en la concentración objetivo, el origen de la especie objetivo (IL-17A humana o IL-17A murina), el tiempo de selección, las condiciones de lavado y el pH del tampón de elución. Se demostró que los clones que se originan a partir de los carriles de selección que utilizan solo IL-17 humana y elución a pH 2,2 tienen el mejor rendimiento en el cribado por ELISA.

35 Secuenciación: Se secuenciaron clones seleccionados al azar. A cada variante de Z individual se le dio un número de identificación, Z#####, como se describe en el Ejemplo 1. En total, se identificaron 932 nuevas moléculas variantes de Z únicas. Para las 494 variantes de mejor rendimiento en el cribado por ELISA a continuación, las secuencias de aminoácidos de las variantes de Z largas de 58 residuos de aminoácidos se enumeran en la Figura 1 como la SEQ ID NO: 1-3, SEQ ID NO: 11-16, SEQ ID NO: 28-31, SEQ ID NO: 36-63 y SEQ ID NO: 67-519. Los motivos de unión a IL-17A deducidos se extienden desde el residuo 8 al residuo 36 en cada secuencia. Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de 49 residuos de aminoácidos que se predice que constituyen el haz completo de tres hélices dentro de cada una de estas variantes de Z se extienden desde el residuo 7 al residuo 55.

45 Cribado por ELISA de variantes de Z: Los clones obtenidos después de cuatro ciclos de selección se produjeron en placas de 96 pozos y se cribaron para la actividad de unión a IL-17A humana usando ELISA. Se analizaron todos los clones seleccionados al azar. Se encontró que 494 de las 932 variantes de Z únicas daban una respuesta de 2 veces el control de blanco o superior (0,15-2,0 AU) contra hIL-17A a una concentración de 0,4 nM. Se mostraron señales positivas para los clones procedentes de todos los carriles de selección. Los controles del blanco tenían absorbancias de 0,055-0,075 AU.

50 Análisis de EC<sub>50</sub> de variantes de Z: Se seleccionó un subconjunto de variantes de Z con base en el resultado del experimento de cribado por ELISA descrito anteriormente (absorbancia superior a 1,25 AU) o en función de la variación en la secuencia de aminoácidos, y se sometió a una titulación objetivo en formato de ELISA. Las muestras de periplasma se incubaron con una dilución en serie de b-hIL-17A en el intervalo de 6 nM a 8 pM. Una muestra de periplasma que contenía Z06282 (SEQ ID NO: 1206) identificada en la selección primaria se incluyó como control positivo. Se analizaron los valores obtenidos y se calcularon los respectivos valores de EC<sub>50</sub> (Tabla 6).

60

Tabla 6: Valores de EC<sub>50</sub> calculados a partir del análisis de titulación por ELISA

Variante de Z	SEQ ID NO	EC <sub>50</sub> (M)	Variante de Z	SEQ ID NO	EC <sub>50</sub> (M)
Z10210	36	1,1 x 10 <sup>-9</sup>	Z10703	48	7,5 x 10 <sup>-10</sup>
Z10241	11	3,4 x 10 <sup>-10</sup>	Z10708	49	4,1 x 10 <sup>-10</sup>
Z10255	37	4,6 x 10 <sup>-10</sup>	Z10710	50	5,4 x 10 <sup>-10</sup>
Z10257	38	6,7 x 10 <sup>-10</sup>	Z10718	16	5,1 x 10 <sup>-10</sup>
Z10433	28	9,4 x 10 <sup>-10</sup>	Z10728	51	5,3 x 10 <sup>-10</sup>
Z10459	39	4,7 x 10 <sup>-10</sup>	Z10745	52	6,8 x 10 <sup>-10</sup>
Z10462	12	3,4 x 10 <sup>-10</sup>	Z10756	53	6,4 x 10 <sup>-10</sup>
Z10465	40	5,0 x 10 <sup>-10</sup>	Z10759	54	6,7 x 10 <sup>-10</sup>
Z10470	41	4,7 x 10 <sup>-10</sup>	Z10775	55	5,1 x 10 <sup>-10</sup>
Z10483	42	4,0 x 10 <sup>-10</sup>	Z10778	56	4,7 x 10 <sup>-10</sup>
Z10508	2	3,8 x 10 <sup>-10</sup>	Z10779	57	5,7 x 10 <sup>-10</sup>
Z10529	43	6,4 x 10 <sup>-10</sup>	Z10800	58	6,4 x 10 <sup>-10</sup>
Z10532	1	3,6 x 10 <sup>-10</sup>	Z10807	59	6,0 x 10 <sup>-10</sup>
Z10534	13	4,1 x 10 <sup>-10</sup>	Z10844	60	7,5 x 10 <sup>-10</sup>
Z10550	44	7,9 x 10 <sup>-10</sup>	Z10857	61	4,5 x 10 <sup>-10</sup>
Z10565	45	3,8 x 10 <sup>-10</sup>	Z10858	62	5,2 x 10 <sup>-10</sup>
Z10566	14	5,5 x 10 <sup>-10</sup>	Z10859	31	6,9 x 10 <sup>-10</sup>
Z10675	15	3,6 x 10 <sup>-10</sup>	Z10863	3	4,5 x 10 <sup>-10</sup>
Z10676	46	4,0 x 10 <sup>-10</sup>	Z10914	63	5,1 x 10 <sup>-10</sup>
Z10690	47	5,9 x 10 <sup>-10</sup>	Z06282	1206	5,0 x 10 <sup>-9</sup>

## Ejemplo 6

## 5 Diseño y construcción de una segunda biblioteca madurada de variantes de Z de unión a IL-17A

En este Ejemplo, se construyó una segunda biblioteca madurada esencialmente como se describe en el Ejemplo 4. La biblioteca se usó para selecciones de variantes de Z de unión a IL-17A adicionales.

## 10 Materiales y métodos

Diseño de la biblioteca: La biblioteca se basó en las secuencias de variantes de Z de unión a IL-17A seleccionadas y caracterizadas en el Ejemplo 5. En la nueva biblioteca, las 13 posiciones en la estructura de la molécula Z que se variaron en la biblioteca de maduración descrita en los Ejemplos 4 y 5 estaban sesgadas hacia ciertos residuos de aminoácidos, de acuerdo con una estrategia basada en las secuencias de la variante de Z de las 37 variantes de mejor desempeño en el análisis de EC<sub>50</sub> (Tabla 6). Se generó un enlazador de ADN usando síntesis de grupo dividido y se ordenó a partir de ADN 2.0. Contenia las siguientes 147 pb, que codificaban la hélice 1 y 2 parcialmente aleatorizada de la secuencia de aminoácidos: 5'- AA ATA AAT CTC GAG GTA GAT GCC/GCA AAA TAC GCC AAA GAA/GAG NNN NNN NNN GCG NNN NNN GAG ATC/ATT NNN NNN TTA/CTG CCT/CCC AAC TTA/CTC ACC NNN NNN CAA/CAG NNN NNN GCC TTC ATC NNN AAA TTA NNN GAT GAC CCA AGC CAG AGC TCA TTA TTT A-3' (SEQ ID NO: 1249; los codones aleatorios son denotados NNN) flanqueado por sitios de restricción *Xho*I y *Sac*I. Las distribuciones teóricas de residuos de aminoácidos en la nueva biblioteca, incluidas seis posiciones variables de aminoácidos (11, 14, 18, 25, 28 y 32) y siete posiciones constantes de aminoácidos (9, 10, 13, 17, 24, 27 y 35) en la estructura de la molécula Z se dan en la Tabla 7. El tamaño de biblioteca teórico resultante es de 3,9 x 10<sup>6</sup> variantes.

Construcción de la biblioteca: la biblioteca se construyó esencialmente como se describe en el Ejemplo 4 con la siguiente excepción: las células se cultivaron durante la noche en 0,5 L de medio TSB-YE, suplementado con glucosa al 2%, 10 µg/mL de tetraciclina y 100 µg/mL de ampicilina.

Preparación de la solución madre de fagos: Se preparó la solución madre de fagos que contenía la biblioteca de fagémidos en matraces de agitación. Se inocularon células de una solución madre de glicerol que contenía la biblioteca de fagémidos en 0,5 L de medio TSB-YE, suplementado con glucosa al 2%, 10 µg/mL de tetraciclina y 100 µg/mL de

ampicilina. Los cultivos se hicieron crecer a 37 °C hasta que la DO<sub>600</sub> alcanzó 0,6 y luego se infectaron aproximadamente 83 mL del cultivo usando un exceso molar de 5 veces del fago auxiliar M13K07 y se incubaron durante 40 min a 37 °C. Las células en el cultivo se sedimentaron mediante centrifugación, se disolvieron en medio TSB-YE, suplementado con 100 µg/mL de ampicilina, 25 µg/mL de kanamicina e IPTG 0,1 mM y se cultivaron a 30 °C durante 18 h. Después del cultivo, las células se sedimentaron mediante centrifugación a 4.000 g y las partículas de fago que quedaban en el medio se precipitaron luego dos veces en PEG/NaCl, se filtraron y se disolvieron en PBS y glicerol como se describe en el Ejemplo 1. Las soluciones madre de fagos se almacenaron a -80 °C hasta su uso en la selección.

Tabla 7: Diseño de la biblioteca, segunda maduración

Posición del aminoácido en la molécula de la variante Z	Aleatorización (abreviatura de los aminoácidos)	No. de aminoácidos	Proporción
9	A	1	1/1
10	D	1	1/1
11	A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W	17	1/17
13	A	1	1/1
14	A, F, I, L, M, V, Y	7	1/7
17	A	1	1/1
18	A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W, Y	17	1/17
24	W	1	1/1
25	A, D (50 %), E, F, I, L, M, V, W, Y	10	1/18, 1/2 (D)
27	W	1	1/1
28	A, D, E, F, G, H, I, L, M, Q, W, Y	12	1/12
32	A, D, E, F, G, H, K, L, M, N, Q, R, S, T, W, Y	16	1/16
35	R	1	1/1

#### Resultados

Construcción de la biblioteca: La nueva biblioteca se diseñó basándose en un conjunto de variantes de Z de unión a IL-17A con propiedades de unión verificadas (Ejemplo 5). El tamaño teórico de la biblioteca diseñada fue de  $3,9 \times 10^6$  variantes de Z. El tamaño real de la biblioteca, determinado por titulación después de la transformación con células *E. coli* ER2738 fue de  $1,4 \times 10^9$  transformantes.

La calidad de la biblioteca se probó secuenciando 96 transformantes y comparando sus secuencias reales con el diseño teórico. Se demostró que el contenido de la biblioteca real en comparación con la biblioteca diseñada era satisfactorio. Por lo tanto, se construyó con éxito una biblioteca madurada de aglutinantes potenciales de IL-17A.

#### Ejemplo 7

Selección, cribado y caracterización de variantes de Z de la segunda biblioteca madurada

#### Materiales y métodos

Selección por presentación en fagos de variantes de Z de unión a IL-17A: La proteína objetivo hIL-17A se biotiniló como se describe en el Ejemplo 1. Se realizaron selecciones de presentación en fagos, usando la segunda biblioteca madurada de moléculas variantes de Z construidas como se describe en el Ejemplo 6, contra hIL-17A esencialmente como se describe en el Ejemplo 5 con las siguientes excepciones. Excepción 1: las selecciones se realizaron en solución o en fase sólida a TA. Excepción 2: el tiempo de selección fue de 60 min, 10 min o 1 min en el ciclo 1 y de 30 min, 4 min o 10 seg en los ciclos 2, 3 y 4. La selección en solución fue seguida por la captura de complejos objetivo-fago en perlas SA como se describe en el Ejemplo 1. Excepción 3: durante la selección en fase sólida, el objetivo se capturó en perlas SA antes de la selección.

En la Tabla 8 se muestra una descripción general de la estrategia de selección, que resume las diferencias entre la selección en solución y la selección en fase sólida, así como el aumento de la rigurosidad en los ciclos posteriores obtenidos mediante el uso de una concentración objetivo más baja y un mayor número de lavados.

Los carriles 1-6 en el ciclo 1 se dividieron en el segundo al cuarto ciclo, dando como resultado un total de siete carriles (1-1 a 6-1) en el ciclo 2, ocho carriles (1-1-1 a 6-1-1) en el ciclo 3 y 16 carriles (1-1-1-1 a 6-1-1-1) en el ciclo 4. Se realizaron lavados utilizando PBST al 0,1% durante 1 min. Sin embargo, uno de los lavados duró 15 min en los carriles 2-1-1, 3-1-1 y 5-1-1 en el ciclo 3.

5 Después del último lavado en el ciclo 4, los complejos objetivo-fago en perlas SA de cinco de los carriles (1-1-1-1, 1-2-1-2, 3-1-1-1, 4-1-1-1 y 5-1-1-2) se dividieron en dos partes iguales. Las partículas de fago unidas de la primera parte se eluyeron inmediatamente, mientras que la segunda parte se sometió a un lavado durante aproximadamente 65 h antes de la elución de las partículas de fago. Los fagos unidos se eluyeron usando glicina-HCl, pH 2,2, como se describe en el Ejemplo 1.

10 La amplificación de las partículas de fagos entre los ciclos de selección se realizó esencialmente como se describe en el Ejemplo 1.

15 Tabla 8: Resumen de la selección de la segunda biblioteca madurada

Ciclo	Carril de selección	Solución madre de fagos de la biblioteca o carril de selección	Conc. del objetivo (pM)	Tiempo de selección (min)	Número de lavados de 1 min	Número de lavados de 15 min	Número de lavados de ~65 h	Método de selección
1	1	Zlib006IL-17A.II	12500	60	3	-	-	solución
1	2	Zlib006IL-17A.II	12500	60	3	-	-	solución
1	3	Zlib006IL-17A.II	1250	60	3	-	-	solución
1	4	Zlib006IL-17A.II	12500	10	3	-	-	fase sólida
1	5	Zlib006IL-17A.II	2500	10	3	-	-	fase sólida
1	6	Zlib006IL-17A.II	2500	1	3	-	-	fase sólida
2	1-1	1	5000	30	6	-	-	solución
2	1-2	1	2500	30	10	-	-	solución
2	2-1	2	1000	30	10	-	-	solución
2	3-1	3	100	30	10	-	-	solución
2	4-1	4	5000	4	6	-	-	fase sólida
2	5-1	5	250	4	10	-	-	fase sólida
2	6-1	6	250	0,17	10	-	-	fase sólida
3	1-1-1	1-1	500	30	15	-	-	solución
3	1-2-1	1-2	50	30	15	-	-	solución
3	2-1-1	2-1	25	30	14	1	-	solución
3	3-1-1	3-1	5	30	14	1	-	solución
3	4-1-1	4-1	500	4	15	-	-	fase sólida
3	4-1-2	4-1	50	4	15	-	-	fase sólida
3	5-1-1	5-1	25	4	14	1	-	fase sólida
3	6-1-1	6-1	5	0,17	15	-	-	fase sólida
4	1-1-1-1	1-1-1	50	30	20	-	-	solución

(continuación)

Ciclo	Carril de selección	Solución madre de fagos de la biblioteca o carril de selección	Conc. del objetivo (pM)	Tiempo de selección (min)	Número de lavados de 1 min	Número de lavados de 15 min	Número de lavados de ~65 h	Método de selección
4	1-1-1-1X	1-1-1	50	30	20	-	1	solución
4	1-1-1-2	1-1-1	5	30	20	-	-	solución
4	1-2-1-1	1-2-1	25	30	20	-	-	solución
4	1-2-1-2	1-2-1	5	30	20	-	-	solución
4	1-2-1-2X	1-2-1	5	30	20	-	1	solución
4	2-1-1-1	2-1-1	0,5	30	20	-	-	solución
4	3-1-1-1	3-1-1	0,05	30	20	-	-	solución
4	3-1-1-1X	3-1-1	0,05	30	20	-	1	solución
4	4-1-1-1	4-1-1	50	4	20	-	-	fase sólida
4	4-1-1-1X	4-1-1	50	4	20	-	1	fase sólida
4	4-1-2-1	4-1-2	25	4	20	-	-	fase sólida
4	5-1-1-1	5-1-1	2,5	4	20	-	-	fase sólida
4	5-1-1-2	5-1-1	0,5	4	20	-	-	fase sólida
4	5-1-1-2X	5-1-1	0,5	4	20	-	1	fase sólida
4	6-1-1-1	6-1-1	0,5	0,17	20	-	-	fase sólida

5 Secuenciación de ligantes potenciales: Se seleccionaron clones individuales de los diferentes carriles de selección para secuenciación. La amplificación y el análisis de secuencia de los fragmentos de genes se realizaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 1.

10 Cribado por ELISA de variantes de Z: Se seleccionaron al azar colonias individuales que contenían variantes de Z (expresadas como proteínas de fusión ABD variantes de Z como se describe en el Ejemplo 1) de los clones seleccionados de la segunda biblioteca madurada de IL-17A y se hicieron crecer en cultivos como se describe en el Ejemplo 1. La preparación de los sobrenadantes periplásmicos y los cribados por ELISA se realizaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 1 con las dos excepciones siguientes. Excepción 1: se usó hIL-17A biotinilado a una concentración de 0,2 o 0,33 nM. Excepción 2: la fracción periplásmica de la variante de Z Z10241 (SEQ ID NO: 11), identificada en selecciones de la primera biblioteca madurada, se usó como control positivo y el control de blanco se creó intercambiando la etapa periplásmica con la adición de PBST al 0,05% .

15 Análisis EC<sub>50</sub> de variantes de Z: una selección de variantes de Z de unión a IL-17A se sometió a un análisis de la respuesta contra una serie de diluciones de b-hIL-17A usando ELISA como se describe en el Ejemplo 5. Se añadió proteína biotinilada a concentración de 10 nM y se diluyó por etapas 1:2 ocho veces seguido de una dilución 1:5 hasta 8 pM. Como control de fondo, las variantes de Z también se ensayaron sin añadir proteína objetivo. Se incluyó como control positivo una muestra de periplasma que contenía la variante de Z Z10241 previamente madurada (SEQ ID NO: 11). Los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism 5 y se calcularon los valores de regresión no lineal y EC<sub>50</sub>.

#### Resultados

25 Selección de presentación en fagos de variantes de Z de unión a IL-17A de una segunda biblioteca madurada: La selección se realizó en un total de 16 carriles paralelos que contenían cuatro ciclos cada uno. Los carriles de selección diferían en la concentración objetivo, el tiempo de selección, las condiciones de lavado y si la selección se realizó en solución o en fase sólida.

Secuenciación: Se secuenciaron los clones seleccionados al azar. A cada variante de Z individual se le dio un número de identificación, Z#####, como se describe en el Ejemplo 1. En total, se identificaron 759 nuevas moléculas variantes de Z únicas.

5 Para las 704 variantes de mejor rendimiento en el cribado por ELISA a continuación, las secuencias de aminoácidos de las variantes de Z largas de 58 residuos de aminoácidos se enumeran en la Figura 1 y en el listado de secuencias como la SEQ ID NO: 5-10, SEQ ID NO: 17-27, SEQ ID NO: 32-35, SEQ ID NO: 64-66 y SEQ ID NO: 520-1199. Los motivos de unión a IL-17A deducidos se extienden desde el residuo 8 al residuo 36 en cada secuencia. Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de 49 residuos de aminoácidos que se predice que constituyen el haz completo de tres hélices dentro de cada una de estas variantes de Z se extienden desde el residuo 7 al residuo 55.

15 Cribado por ELISA de variantes de Z: Los clones obtenidos después de cuatro ciclos de selección se produjeron en placas de 96 pozos y se cribaron para la actividad de unión a hIL-17A usando ELISA. Se analizaron todos los clones seleccionados al azar. Se encontró que 704 de las 759 variantes de Z únicas daban una respuesta de 2 veces los controles o blanco o más (0,22-2,2 AU) contra hIL-17A a una concentración de 0,2 o 0,33 nM. Se recogieron señales positivas para los clones procedentes de todos los carriles de selección. La respuesta promedio de los controles de blanco fue de 0,11 AU, con base en un conjunto representativo de placas.

20 Análisis de EC<sub>50</sub> de las variantes de Z: se seleccionó un subconjunto de variantes de Z de unión a IL-17A con base en el resultado del experimento de ELISA descrito anteriormente (variantes de Z con absorbancias sobre la respuesta del control positivo Z10241, SEQ ID NO: 11) y se sometió a una titulación objetivo en formato de ELISA como se describe en el Ejemplo 5. Se analizaron los valores obtenidos y se calcularon sus respectivos valores de EC<sub>50</sub> (Tabla 9).

Tabla 9: Valores de EC<sub>50</sub> calculados a partir del análisis de titulación por ELISA

Variante de Z	SEQ ID NO	EC <sub>50</sub> (M)	Variante de Z	SEQ ID NO	EC <sub>50</sub> (M)
Z12059	17	5,3 x 10 <sup>-10</sup>	Z12211	22	4,6 x 10 <sup>-10</sup>
Z12060	5	5,1 x 10 <sup>-10</sup>	Z12212	64	7,8 x 10 <sup>-10</sup>
Z12073	18	4,3 x 10 <sup>-10</sup>	Z12256	23	4,7 x 10 <sup>-10</sup>
Z12078	8	5,2 x 10 <sup>-10</sup>	Z12264	10	3,9 x 10 <sup>-10</sup>
Z12081	6	5,6 x 10 <sup>-10</sup>	Z12275	24	4,2 x 10 <sup>-10</sup>
Z12115	20	4,2 x 10 <sup>-10</sup>	Z12285	65	9,1 x 10 <sup>-10</sup>
Z12163	9	5,0 x 10 <sup>-10</sup>	Z12439	66	6,1 x 10 <sup>-10</sup>
Z12180	21	3,7 x 10 <sup>-10</sup>			

25 Ejemplo 8

Caracterización *in vitro* de un subconjunto de variantes de Z de unión a IL-17A maduras

30 Materiales y métodos

La subclonación y producción de variantes de Z con una etiqueta His<sub>6</sub> en el terminal N se realizó como se describe en el Ejemplo 2. Se creó una variante adicional, His<sub>6</sub>-Z15167 (SEQ ID NO: 4), mediante mutagénesis dirigida al sitio de His<sub>6</sub>-Z10532 (SEQ ID NO: 1) dando como resultado la sustitución de D en la posición 25 por A. La producción de His<sub>6</sub>-Z15167 se realizó como se describió anteriormente para otras variantes de Z.

40 Análisis de espectroscopía de dicroísmo circular (CD): Las variantes de Z etiquetadas con His<sub>6</sub> purificadas se diluyeron a 0,5 mg/mL en PBS. Para cada variante de Z diluida, se obtuvo un espectro de CD a 250-195 nm a 20 °C. Además, se realizó una medición de temperatura variable (VTM) para determinar la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>). En la VTM, la absorbancia se midió a 221 nm mientras que la temperatura se elevó de 20 a 90 °C, con una pendiente de temperatura de 5 °C/min. Se obtuvo un nuevo espectro de CD a 20 °C después del procedimiento de calentamiento para estudiar la capacidad de replegamiento de las variantes de Z. Las mediciones de CD se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco Escandinavia AB) usando una celda con una longitud de trayectoria óptica de 1 mm.

45 Cribado por ELISA de unión a IL-17: Se recubrieron placas de media área de 96 pozos (Costar, 3690) durante la noche a 4 °C con hIL-17A a 1 µg/mL en PBS en un volumen de 50 µL/pozo. El día del análisis, la placa se enjuagó dos veces con agua del grifo y luego se bloqueó con PBS + BSA al 2% (Sigma) durante 2 h. Se usó Z10241 (SEQ ID NO: 11) como estándar y se valoró en una serie de diluciones de 3 veces (300-0,005 ng/mL) y las otras variantes de Z se agregaron en cuatro diluciones diferentes a la placa de ELISA recubierta (50 µL/pozo) y se incubó durante 1,5 h a TA. La placa se lavó 4 veces en una lavadora de ELISA automática y se añadieron 2 µg/mL (50 µL/pozo) de un anticuerpo de cabra anti-Z. Después de 1 h de incubación, se lavó la placa y se añadieron por pozo 50 µL de IgG-HRP anti-cabra

(DAKO) diluido 5000 veces. La placa se reveló después de otra incubación de 1 hora, se lavó con 50  $\mu$ L de TMB (Thermo Fisher, 34021) por pozo y la reacción se detuvo con 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. Las placas se leyeron en un lector de etiquetas múltiples (Victor<sup>3</sup>, Perkin Elmer).

5 Análisis cinético de Biacore: Se determinaron las constantes cinéticas ( $k_{\text{asociación}}$  y  $k_{\text{disociación}}$ ) y las afinidades ( $K_D$ ) para IL-17A humana para 27 variantes de Z etiquetadas con His<sub>6</sub>. La hIL-17A se inmovilizó en la celda de flujo sobre la capa de dextrano carboxilado de una superficie del chip CM5 (GE Healthcare, cat. No. BR100012). La inmovilización se realizó utilizando química de acoplamiento de amina de acuerdo con el protocolo del fabricante y utilizando HBS-EP (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005% v/v, GE Healthcare, catálogo No. BR100188) como tampón de procesamiento. Se activó y desactivó una superficie de celda de flujo en el chip para su uso como blanco durante las inyecciones de analito. En el experimento cinético, se usó HBS-EP como tampón de procesamiento y el caudal fue de 50  $\mu$ L/min. Los analitos, es decir, las variantes de Z, se diluyeron cada uno en tampón HBS-EP hasta concentraciones finales de 100 nM, 20 nM y 4 nM y se inyectaron durante 4 min, seguido de disociación en tampón de procesamiento durante 8 min. Después de 8 min de disociación, las superficies se regeneraron con dos inyecciones de HCl 10 mM. Las constantes cinéticas se calcularon a partir de los sensoogramas utilizando el modelo Langmuir 1:1 del software BiaEvaluation 4.1 (GE Healthcare).

20 Análisis de especificidad de unión de Biacore: Las interacciones de tres variantes de Z de unión a IL-17A etiquetadas con His<sub>6</sub> (Z10508 (SEQ ID NO: 2), Z10532 (SEQ ID NO: 1) y Z15167 (SEQ ID NO: 4)) con hIL-17A (SEQ ID NO: 1226), hIL-17F (SEQ ID NO: 1228; R&D Systems, cat. No. 1335-IL/CF) y el heterodímero IL-17A/F humano (R&D Systems, cat. No 5194-IL-025/CF) se analizaron en un instrumento Biacore 2000. Las tres variantes diferentes de IL-17 se inmovilizaron en las celdas de flujo en la capa de dextrano carboxilado de una superficie de chip CM5. La inmovilización se realizó usando química de acoplamiento de amina de acuerdo con el protocolo del fabricante y usando HBS-EP como tampón de procesamiento. Se activó y desactivó una superficie de celda de flujo en el chip para su uso como blanco durante las inyecciones de analito. En el experimento de unión, se usó HBS-EP como tampón de procesamiento y el caudal fue de 50  $\mu$ L/min. Los analitos, es decir, las variantes de Z, se diluyeron cada uno en tampón de procesamiento HBS-EP hasta concentraciones finales de 4, 20, 100 y 500 nM y se inyectaron durante 4 min. Después de 15 min de disociación, las superficies se regeneraron con cuatro inyecciones de HCl 10 mM. Los resultados se analizaron mediante el software BiaEvaluation.

30 Bloqueo de la producción de IL-6 inducida por IL-17A en el ensayo de NHDF: El ensayo de NHDF y la cuantificación mediante el ELISA específico de IL-6 se realizaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 3. En resumen, el día antes del experimento, se sembraron 5000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos de media área en 100  $\mu$ L. El día del experimento, se prepararon diluciones de 36 variantes de Z específicas de IL-17A en una placa separada de 96 pozos. Las variantes de Z se valoraron en tres etapas desde 4690 nM hasta 0,08 nM en medio que contenía hIL-17A 0,9 nM. Se preparó una curva estándar de hIL-17A (6,2-0,0001 nM), así como controles que contenían medio con hIL-17A 0,9 nM o medio solo.

#### Resultados

40 Análisis de CD: Los espectros de CD determinados para las variantes de Z de unión a IL-17A con una etiqueta His<sub>6</sub> mostraron que cada una tenía una estructura  $\alpha$ -helicoidal a 20 °C. Los resultados de las mediciones de temperatura variable, en las que se determinaron las temperaturas de fusión ( $T_m$ ), se muestran en la Tabla 10. Se observó un plegado reversible para todas las variantes de Z de unión a IL-17A cuando se midieron los espectros de superposición antes y después del calentamiento a 90 °C.

50 Análisis de la capacidad de unión a IL-17A mediante ELISA: Se cribaron moléculas variantes de Z etiquetadas con His<sub>6</sub> purificadas de la primera y segunda ronda de maduración para determinar su capacidad para unirse a IL-17A en un ensayo de ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 3 como porcentaje de capacidad de unión en comparación con la variante Z10241.

55 Análisis cinético de Biacore: Las interacciones de 28 variantes de Z de unión a IL-17A etiquetadas con His<sub>6</sub> con hIL-17A se analizaron en un instrumento Biacore inyectando diversas concentraciones de las variantes de Z sobre una superficie que contenía IL-17A inmovilizada. En la Tabla 11 se presenta un resumen de los parámetros cinéticos ( $K_D$ ,  $k_a$  ( $k_{\text{asociación}}$ ) y  $k_d$  ( $k_{\text{disociación}}$ )) para la unión de las variantes de Z a hIL-17A usando un modelo de interacción 1:1.

Tabla 10: Temperaturas de fusión ( $T_m$ )

Analito	SEQ ID NO de la variante de Z	$T_m$ (°C)	Analito	SEQ ID NO de la variante de Z	$T_m$ (°C)
His6-Z10241	11	48	His6-Z12081	6	50
His6-Z10433	28	56	His6-Z12115	20	51
His6-Z10462	12	51	His6-Z12163	9	54
His6-Z10508	2	54	His6-Z12180	21	51

(continuación)

Analito	SEQ ID NO de la variante de Z	Tm (°C)	Analito	SEQ ID NO de la variante de Z	Tm (°C)
His6-Z10532	1	57	His6-Z12192	32	45
His6-Z10534	13	41	His6-Z12211	22	49
His6-Z10566	14	51	His6-Z12256	23	47
His6-Z10675	15	52	His6-Z12264	10	54
His6-Z10681	29	52	His6-Z12275	24	46
His6-Z10718	16	48	His6-Z12283	25	45
His6-Z10722	30	51	His6-Z12289	33	51
His6-Z10859	31	52	His6-Z12344	26	49
His6-Z10863	3	51	His6-Z12481	27	49
His6-Z12059	17	50	His6-Z12498	34	48
His6-Z12060	5	52	His6-Z12522	35	51
His6-Z12073	18	49	His6-Z12634	7	50
His6-Z12077	19	52	Z10241-His6	11	47
His6-Z12078	8	51	His6-Z15167	4	57
			Z10199	1217	56

5 Análisis de especificidad de unión de Biacore: La unión de tres variantes de Z de unión a IL-17A etiquetadas con His<sub>6</sub> (Z10508, Z10532 y Z15167) a hIL-17A, hIL-17F y hIL-17A/F se ensayó en un instrumento Biacore inyectando las variantes de Z sobre superficies que contienen las variantes de IL-17. Los niveles de inmovilización del ligando en las superficies fueron 657 RU, 977 RU y 770 RU de IL-17A, IL-17F e IL-17A/F, respectivamente. Todas las variantes de Z probadas mostraron unión a IL-17A humana y unión más débil a IL-17A/F, mientras que no pudo detectarse unión a IL-17F. Las curvas resultantes, de las que se restaron las respuestas de una superficie del blanco, se muestran en la Figura 4. Z15167 mostró la curva de asociación más rápida con IL-17A humana.

10 Bloqueo de la producción de IL-6 inducida por IL-17A en el ensayo de NHDF: Las variantes de Z etiquetadas con His<sub>6</sub> purificadas de la primera y segunda rondas de maduración se cribaron para determinar su capacidad para bloquear la producción de IL-6 inducida por IL-17A en el ensayo de NHDF. Los resultados del ensayo de NHDF mostraron que todos los ligantes maduros probados tenían una capacidad de bloqueo específica de IL-17A aumentada en comparación con el ligante primario His<sub>6</sub>-Z06282. En la Figura 5 se muestra un gráfico que muestra los perfiles de inhibición típicos de una selección de ligantes de la primera biblioteca de maduración, y en la Tabla 12 se muestran los valores de IC<sub>50</sub> calculados para todos los ligantes analizados.

Tabla 11: Parámetros cinéticos para la unión de variantes de Z a hIL-17A

Analito	SEQ ID NO de la variante de Z	k <sub>a</sub> (1/Ms)	k <sub>d</sub> (1/s)	K <sub>D</sub> (M)
His6-Z10241	11	5,2 x 10 <sup>5</sup>	1,2 x 10 <sup>-3</sup>	2,2 x 10 <sup>-9</sup>
His6-Z10433	28	4,7 x 10 <sup>5</sup>	3,1 x 10 <sup>-3</sup>	6,4 x 10 <sup>-9</sup>
His6-Z10508	2	5,1 x 10 <sup>5</sup>	2,0 x 10 <sup>-3</sup>	4,0 x 10 <sup>-9</sup>
His6-Z10532	1	6,2 x 10 <sup>5</sup>	1,5 x 10 <sup>-3</sup>	2,4 x 10 <sup>-9</sup>
His6-Z10566	14	6,1 x 10 <sup>5</sup>	5,7 x 10 <sup>-3</sup>	9,3 x 10 <sup>-9</sup>
His6-Z10675	15	5,7 x 10 <sup>5</sup>	1,1 x 10 <sup>-3</sup>	1,9 x 10 <sup>-9</sup>
His6-Z10681	29	6,7 x 10 <sup>5</sup>	3,5 x 10 <sup>-3</sup>	5,2 x 10 <sup>-9</sup>
His6-Z10859	31	5,6 x 10 <sup>5</sup>	6,8 x 10 <sup>-3</sup>	1,2 x 10 <sup>-8</sup>
His6-Z10863	3	8,3 x 10 <sup>5</sup>	2,5 x 10 <sup>-3</sup>	3,0 x 10 <sup>-9</sup>
His6-Z12060	5	7,5 x 10 <sup>5</sup>	3,3 x 10 <sup>-3</sup>	4,3 x 10 <sup>-9</sup>

20

(continuación)

Analito	SEQ ID NO de la variante de Z	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
His6-Z12073	18	$4,9 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-9}$
His6-Z12077	19	$6,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^{-3}$	$3,1 \times 10^{-9}$
His6-Z12078	8	$4,5 \times 10^5$	$8,1 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-9}$
His6-Z12081	6	$6,2 \times 10^5$	$3,8 \times 10^{-3}$	$6,2 \times 10^{-9}$
His6-Z12163	9	$7,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-9}$
His6-Z12192	32	$4,6 \times 10^5$	$5,6 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-8}$
His6-Z12211	22	$5,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-9}$
His6-Z12256	23	$3,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-3}$	$3,4 \times 10^{-9}$
His6-Z12264	10	$6,0 \times 10^5$	$5,5 \times 10^{-4}$	$9,3 \times 10^{-10}$
His6-Z12275	24	$5,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-9}$
His6-Z12283	25	$5,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^{-3}$	$3,3 \times 10^{-9}$
His6-Z12289	33	$6,2 \times 10^5$	$3,3 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-9}$
His6-Z12344	26	$7,1 \times 10^5$	$6,6 \times 10^{-4}$	$9,2 \times 10^{-10}$
His6-Z12481	27	$5,2 \times 10^5$	$8,9 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-1}$
His6-Z12498	34	$6,0 \times 10^5$	$2,3 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-9}$
His6-Z12522	35	$7,1 \times 10^5$	$4,4 \times 10^{-3}$	$6,2 \times 10^{-9}$
His6-Z12634	7	$6,9 \times 10^5$	$4,3 \times 10^{-3}$	$6,3 \times 10^{-9}$
His6-Z15167	4	$1,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-9}$

Tabla 12: Valores de  $IC_{50}$  para variantes de Z maduras

Analito	SEQ ID NO de la variante de Z:	$IC_{50}$ (nM)	Analito	SEQ ID NO de la variante de Z:	$IC_{50}$ (nM)
His6-Z10241	11	5,3	His6-Z12081	6	8,1
His6-Z10433	28	14	His6-Z12115	20	3,0
His6-Z10462	12	6,6	His6-Z12163	9	7,0
His6-Z10508	2	5,7	His6-Z12180	21	4,3
His6-Z10532	1	6,4	His6-Z12192	32	28
His6-Z10534	13	6,5	His6-Z12211	22	2,9
His6-Z10566	14	9,6	His6-Z12256	23	4,4
His6-Z10675	15	5,3	His6-Z12264	10	4,4
His6-Z10681	29	25	His6-Z12275	24	4,8
His6-Z10718	16	28	His6-Z12283	25	6,9
His6-Z10722	30	35	His6-Z12289	33	18
His6-Z10859	31	26	His6-Z12344	26	4,8
His6-Z10863	3	8,5	His6-Z12481	27	3,0
His6-Z12059	17	3,7	His6-Z12498	34	11
His6-Z12060	5	7,9	His6-Z12522	35	10
His6-Z12073	18	4,0	His6-Z12634	7	9,8

(continuación)

Analito	SEQ ID NO de la variante de Z:	IC <sub>50</sub> (nM)	Analito	SEQ ID NO de la variante de Z:	IC <sub>50</sub> (nM)
His6-Z12077	19	5,5	Z10241-His6	11	3,3
His6-Z12078	8	4,5			

Ejemplo 9

5 Producción de polipéptidos Z-ABD-Z de unión a IL-17

10 IL-17A es una citoquina homodimérica que posee dos sitios de unión al receptor. Se especuló que un polipéptido que comprende dos fracciones de una variante de Z de unión a IL-17A de la presente divulgación bloquearía IL-17A de manera más eficaz que un polipéptido que comprende una de tales fracciones. Este Ejemplo describe el procedimiento general para la subclonación y producción de polipéptidos que comprenden dos variantes de Z en fusión con la variante del dominio de unión a albúmina PP013 (SEQ ID NO: 1224) en el formato general Z-[L1]-ABD-[L2]-Z en el que [L1] y [L2] son enlazadores que separan los fracciones Z y ABD.

15 Materiales y métodos

15 Subclonación de polipéptidos Z-[L1]-ABD-[L2]-Z con diferentes longitudes de enlazador [L1] y [L2]: Los ADN de Z06282 (SEQ ID NO: 1206), Z10241 (SEQ ID NO: 11) y Z10532 (SEQ ID NO: 1) se amplificaron a partir del vector de biblioteca pAY02592 mediante PCR usando ADN polimerasa Pfu Turbo (Agilent Technologies, cat. No. 600254) junto con pares de cebadores adecuados. Las construcciones Z-[L1]-ABD-[L2]-Z se generaron mediante ligación de ADN que codifica cada fracción en el vector de expresión pET26b(+) (Novagen, Madison, WI) en tres etapas de clonación posteriores utilizando ADN ligasa T4 (Fermentas, cat. No. EL0011). El ADN que codifica las tres fracciones se separó mediante ADN que codifica enlazadores hibridados con diferente número de repeticiones de (GGGG)<sub>n</sub>, flanqueado por sitios de enzimas de restricción. Las construcciones codificadas por los vectores de expresión fueron Z#####-[GAP-(G4S)<sub>n</sub>-TS]-PP013-[GT-(G4S)<sub>n</sub>-PR]-Z#####, eran cada una n individualmente 1-4, y como se especifica adicionalmente en la Tabla 13.

Tabla 13: Variantes diméricas de Z fusionadas a ABD a través de diferentes longitudes de [L1] y [L2]

Designación	SEQ ID NO	Polipéptido Z-[L1]-ABD-[L2]-Z
ZAZ3174	1233	Z06282-[GAP-(G4S) <sub>4</sub> -TS]-PP013-[GT-(G4S) <sub>4</sub> -PR]-Z06282
ZAZ3175	1234	Z06282-[GAP-(G4S) <sub>3</sub> -TS]-PP013-[GT-(G4S) <sub>3</sub> -PR]-Z06282
ZAZ3176	1235	Z06282-[GAP-(G4S) <sub>2</sub> -TS]-PP013-[GT-(G4S) <sub>2</sub> -PR]-Z06282
ZAZ3236	1240	Z06282-[GAP-G <sub>4</sub> S-TS]-PP013-[GT-G <sub>4</sub> S-PR]-Z06282
ZAZ3237	1241	Z06282-[GAP-G <sub>4</sub> S-TS]-PP013-[GT-(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -PR]-Z06282
ZAZ3220	1236	Z10241-[GAP-(G4S) <sub>4</sub> -TS]-PP013-[GT-(G4S) <sub>4</sub> -PR]-Z10241
ZAZ3221	1237	Z10532-[GAP-(G4S) <sub>4</sub> -TS]-PP013-[GT-(G4S) <sub>4</sub> -PR]-Z10532

Sitios de restricción (I)-(IV) en el ADN que codifica Z#####-[(I)-(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>-(II)]-PP013-[(III)-(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>-(IV)]-Z##### son escindibles con las enzimas de restricción *AscI* (I), *SpeI* (II), *KpnI* (III) y *SacI* (IV), respectivamente

30 Subclonación de polipéptidos Z-[L1]-ABD-[L2]-Z con un enlazador [L1] mínimo: Se generaron ADN que codifica variantes de Z diméricas adicionales que comprenden Z06282 (SEQ ID NO: 1206) pero con un enlazador mínimo [L1] utilizando técnicas estándar de biología molecular. Las construcciones codificadas por los vectores de expresión fueron Z06282-VDGS-PP013-GT-(G4S)<sub>n</sub>-PR-Z06282 y como se especifica adicionalmente en la Tabla 14.

35 Los genes que codifican Z12876 (SEQ ID NO: 1218), Z14253 (SEQ ID NO: 1219), Z14254 (SEQ ID NO: 1220) y Z14255 (SEQ ID NO: 1221) (correspondientes a Z10241 (SEQ ID NO: 11), Z10532 (SEQ ID NO: 1), Z10508 (SEQ ID NO: 2) y Z10863 (SEQ ID NO: 3), respectivamente, pero comenzando con los residuos de aminoácidos AE en lugar de VD) se amplificaron mediante PCR usando ADN polimerasa Pfu Turbo junto con pares de cebadores adecuados. Las construcciones Z-[L1]-ABD-[L2]-Z se generaron mediante ligación de cada fragmento en el vector de expresión pET26b(+) en tres etapas de clonación posteriores usando ADN ligasa T4. El ADN que codifican las tres fracciones se separó mediante enlazadores modificados adicionalmente mediante mutagénesis dirigida al sitio utilizando técnicas de biología molecular estándar. Las construcciones codificadas por los vectores de expresión fueron Z#####-[VDGS]-PP013-[GT-G<sub>4</sub>S-PK]-Z##### y Z#####-[ASGS]-PP013-[GT-G<sub>4</sub>S]-Z#####, y como se especifica adicionalmente en la Tabla 14.

Tabla 14: Variantes Diméricas Z fusionadas a ABD a través de un enlazador [L1] mínimo

Designación	SEQ ID NO	Polipéptido Z-[L1]-ABD-[L2]-Z	Mutaciones
ZAZ3234	1238	Z06282-[VDGS]-PP013-GT-G <sub>4</sub> S-PR-Z06282	
ZAZ3235	1239	Z06282-[VDGS]-PP013-GT-(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -PR-Z06282	
ZAZ3269	1242	Z12876-[VDGS]-PP013-[GT-G <sub>4</sub> S-PK]-Z12876	R117K
ZAZ3270	1243	Z12876-[ASGS]-PP013-[GT-G <sub>4</sub> S]-Z12876	V59A, D60S, Δ116P, Δ117R
ZAZ3363	1244	Z14253-[ASGS]-PP013-[GT-G <sub>4</sub> S]-Z14253	V59A, D60S, Δ116P, Δ117R
ZAZ3364	1245	Z14254-[ASGS]-PP013-[GT-G <sub>4</sub> S]-Z14254	V59A, D60S, Δ116P, Δ117R
ZAZ3365	1246	Z14255-[ASGS]-PP013-[GT-G <sub>4</sub> S]-Z14255	V59A, D60S, Δ116P, Δ117R
ZAZ3422	1247	Z15166-[ASGS]-PP013-[GT-G <sub>4</sub> S]-Z15166	D25A en ambas fracciones Z14253 en ZAZ3363

Δ: eliminación del residuo de aminoácido indicado

5 Cultivo: Se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) con plásmidos que contenían el fragmento génico de cada polipéptido Z-ABD-Z respectivo y se cultivaron a 37 °C en 800 o 1000 mL de medio TSB-YE suplementado con 50 µg/mL de kanamicina. Con el fin de inducir la expresión de proteínas, se añadió IPTG a una concentración final de 0,2 mM a una DO<sub>600</sub> = 2 y el cultivo se incubó a 37 °C durante otras 5 horas. Las células se recolectaron por centrifugación.

10 Purificación de polipéptidos Z-ABD-Z de unión a IL-17A: los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón TST (Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, NaCl 200 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 8,0) suplementado con Benzonase® (Merck). Después de la rotura celular por sonicación y clarificación por centrifugación, cada sobrenadante se aplicó en una columna empaquetada con agarosa y se inmovilizó con un ligando anti-ABD (producido internamente). Después de lavar con tampón TST y tampón NH<sub>4</sub>Ac 5 mM, pH 5,5, los polipéptidos Z-ABD-Z se eluyeron con HAc 0,1 M. Se añadió acetonitrilo (ACN) a las fracciones eluidas hasta una concentración final del 10% y las muestras se cargaron en columnas SOURCE 15RPC (GE Healthcare), previamente equilibradas con disolvente A de RPC (0,1% de TFA, 10% de ACN, 90% de agua). Después de lavar la columna con el disolvente A de RPC, las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal del disolvente A de RPC al disolvente B de RPC (0,1% de TFA, 80% de ACN, 20% de agua). Las fracciones que contenían polipéptidos Z-ABD-Z puros se identificaron mediante análisis SDS-PAGE y se combinaron. Después de la purificación de RPC, el tampón de la combinación se cambió a PBS (KCl 2,68 mM, NaCl 137 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, pH 7,4) usando columnas Sephadex G-25 (GE Healthcare). Finalmente, las variantes de Z-ABD-Z se purificaron en columnas rojas EndoTrap® (Hyglos) para asegurar un contenido bajo de endotoxinas.

25 Las concentraciones de proteínas se determinaron midiendo la absorbancia a 280 nm, usando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 y el coeficiente de extinción de la proteína respectiva. La pureza se analizó mediante SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie, y se confirmó la identidad de cada variante de Z-ABD-Z purificada mediante análisis por HPLC-MS.

### 30 Resultados

Cultivo y purificación: Las variantes de Z de unión a IL-17A en fusión con ABD se expresaron como productos génicos solubles en *E. coli*. El análisis SDS-PAGE de cada preparación de proteína final mostró que estas contenían predominantemente el polipéptido Z-ABD-Z de unión a IL-17A deseado. La identidad y el peso molecular correctos de cada polipéptido Z-ABD-Z se confirmaron mediante análisis por HPLC-MS.

### 35 Ejemplo 10

#### Solubilidad de polipéptidos Z-ABD-Z

40 Se investigó la solubilidad de tres polipéptidos Z-ABD-Z en tampón fisiológico mediante concentraciones consecutivas de las muestras usando ultrafiltración, seguido de mediciones de concentración mediante lecturas de absorbancia a 280 nm e inspección visual de las muestras.

#### 45 Materiales y métodos

Los polipéptidos Z-ABD-Z ZAZ3363 (SEQ ID NO: 1244), ZAZ3364 (SEQ ID NO: 1245) y ZAZ3422 (SEQ ID NO: 1247) se diluyeron en PBS, pH 7,4, hasta 2,5 mg/mL. Se enjuagaron previamente 12 unidades de filtro centrífugo Amicon

Ultra con un corte de 3 kDa (Millipore, cat. No. UFC800324) mediante centrifugación a 4000 g durante 10 min en una centrífuga de rotor de cubeta oscilante. Los concentradores se vaciaron y se añadieron 4 mL de cada polipéptido Z-ABD-Z a un primer conjunto de tres unidades de filtro centrífugo diferentes. La centrifugación se realizó a 4000 g, 20 °C, durante 13-16 min, dando como resultado aproximadamente 1 mL de concentrado. Se extrajo una muestra de 20 µL de cada concentrado (muestra de UF 1) para análisis adicional y el resto de los volúmenes de muestra se transfirieron a un segundo conjunto de tres unidades de filtro centrífugo. La centrifugación y la extracción de la muestra se repitieron tres veces con tiempos de centrifugado de 8-10 min, 7 min y 13 min, respectivamente, (muestras de UF 2, 3 y 4, respectivamente). Las lecturas de absorbancia se realizaron usando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 y diluyendo las muestras de UF 1-4 en PBS 3, 6, 12 y 24 veces, respectivamente. Las concentraciones se calcularon usando el coeficiente de extinción teórico  $1 \text{ Abs}_{280} = 0,612 \text{ mg/mL}$  (el mismo para los tres polipéptidos Z-ABD-Z). También se realizaron lecturas de absorbancia de los filtrados sin diluir.

#### Resultados

Las concentraciones determinadas por lecturas de absorbancia a 280 nm después de cada etapa de centrifugación se muestran en la Tabla 15. No se detectaron agregados mediante inspección visual de los concentrados. Por lo tanto, se determinó que la solubilidad de ZAZ3363, ZAZ3364 y ZAZ3422 era de al menos 60 mg/mL en PBS, pH 7,4. Las lecturas de absorbancia de los filtrados sin diluir mostraron concentraciones muy cercanas a 0 mg/mL.

Tabla 15: Concentración después de la concentración consecutiva de muestras de Z-ABD-Z

Polipéptido Z-ABD-Z	SEQ ID NO	Concentración (mg/mL)				Tiempo total de centrifugación (min)
		UF1	UF2	UF3	UF4	
ZAZ3363	1244	9,6	21	36	64	44
ZAZ3364	1245	8,2	21	38	60	43
ZAZ3322	1247	9,3	20	35	64	44

#### Ejemplo 11

Análisis de especies cruzadas de unión de Biacore

#### Materiales y métodos

La interacción de los polipéptidos Z-ABD-Z ZAZ3363 (SEQ ID NO: 1244), ZAZ3364 (SEQ ID NO: 1245) y ZAZ3365 (SEQ ID NO: 1246) con hIL-17A e IL-17A de mono cynomolgus (cIL-17A, SEQ ID NO: 1229; Evitria, pedido personalizado) así como la interacción de ZAZ3220 (SEQ ID NO: 1236) con hIL-17A e IL-17A de mono rhesus (rmlL-17-A, SEQ ID NO: 1230; Cusabio, cat. No. CSB-EP011597MOV) se analizaron en un Biacore 2000. Se inmovilizó HSA en la celda de flujo sobre la capa de dextrano carboxilado de una superficie de chip CM5. La inmovilización se realizó usando química de acoplamiento de amina de acuerdo con el protocolo del fabricante y usando HBS-EP como tampón de procesamiento. Los niveles de inmovilización de HSA en las superficies fueron 953 RU (utilizado para ZAZ3363, ZAZ3364 y ZAZ3365) y 493 RU (utilizado para ZAZ3220), respectivamente. Se activó y desactivó una superficie de celda de flujo en el chip para su uso como blanco durante las inyecciones de analito. En los experimentos de unión, se usó HBS-EP como tampón de procesamiento y el caudal de flujo fue de 30 µL/min. Se diluyeron ZAZ3363, ZAZ3364 y ZAZ3365 en tampón de procesamiento HBS-EP hasta una concentración final de 200 nM y se inyectaron durante 5 min, seguido de inyecciones de las variantes de IL-17A. Se diluyó ZAZ3220 en tampón de procesamiento HBS-EP hasta una concentración final de 500 nM y se inyectó durante 4 minutos seguido de inyecciones de las variantes de IL-17A. Se diluyeron cada uno de hIL-17A y cIL-17A en tampón de procesamiento HBS-EP hasta concentraciones finales de 2,5, 10 y 40 nM y se inyectaron durante 5 min sobre superficies con ZAZ3363, ZAZ3364 y ZAZ3365 capturados en HSA. Después de 10 min de disociación, la superficie se regeneró con dos inyecciones de HCl 10 mM. hIL-17A y rmlL-17A se diluyeron en tampón de procesamiento de HBS-EP hasta concentraciones finales de 0,1, 0,3, 0,9, 2,7 y 8,1 nM y 2,7, 8,1, 24,3, 72 y 216 nM, respectivamente, y se inyectaron durante 6 min sobre superficies con ZAZ3220 capturado en HSA. Después de 5 min de disociación, la superficie se regeneró con dos inyecciones de HCl 10 mM. Los resultados se analizaron mediante el software BiaEvaluation.

#### Resultados

La unión de hIL-17A y cIL-17A a ZAZ3363, ZAZ3364 y ZAZ3365, y hIL-17A y rmlL-17A a ZAZ3220 se probaron en un instrumento Biacore inyectando los polipéptidos Z-ABD-Z sobre una superficie que contenía HSA seguido por inyecciones de las variantes de IL-17A. Todas las variantes de Z probadas mostraron unión a las variantes de IL-17A probadas, es decir, ZAZ3363, ZAZ3364 y ZAZ3365 mostraron unión a IL-17A humana y de mono cynomolgus (Figura 6) y ZAZ3220 a IL-17A humana y de mono rhesus.

#### Ejemplo 12

## Análisis de especificidad de unión de Biacore

En este ejemplo, se ensayaron las especificidades de dos polipéptidos Z-ABD-Z analizando su interacción potencial con un conjunto de proteínas de la familia IL-17, con otras interleucinas y con otras proteínas plasmáticas abundantes. También se analizó el mismo conjunto de proteínas analito para determinar su posible interacción con la variante ABD PEP07843.

## Materiales y métodos

La interacción de ZAZ3363 (SEQ ID NO: 1244) o ZAZ3422 (SEQ ID NO: 1247) con paneles de 24 o 12 proteínas diferentes (especificadas en la Tabla 16), respectivamente, se analizaron en un instrumento Biacore 2000. HSA y la variante de ABD PEP07843 (SEQ ID NO: 1225, correspondiente a PP013 (SEQ ID NO: 1224) con una extensión en el terminal N de GSS) se inmovilizaron en la superficie del chip CM5 y se preparó una superficie de blanco como se describe en el Ejemplo 11. Los niveles de inmovilización del ligando en las superficies fueron 1315 RU y 99 RU de HSA y PEP07843, respectivamente, para el chip utilizado en los procedimientos de ZAZ3363, y 791 RU y 100 RU de HSA y PEP07843, respectivamente, para el chip usado en los procedimientos de ZAZ3422. En el experimento de unión, se usó HBS-EP como tampón de procesamiento y el caudal fue de 30 µL/min. ZAZ3363 y ZAZ3422 se diluyeron en HBS-EP o HBS-EP suplementado con NaCl 500 mM hasta una concentración final de 200 nM y se inyectaron durante 7 min seguido de inyecciones de los analitos. Los analitos, es decir, los paneles de 24 o 12 proteínas diferentes, se diluyeron cada uno en HBS-EP o HBS-EP suplementado con NaCl 500 mM hasta concentraciones finales de 0,4 a 250 nM y se inyectaron durante 5 min. Después de 7 (ZAZ3363) o 10 (ZAZ3422) min de disociación, se regeneraron las superficies con cuatro (ZAZ3363) o cinco (ZAZ3422) inyecciones de NaOH 10 mM y dos inyecciones de HCl 10 mM. Los resultados se analizaron mediante el software BiaEvaluation.

Tabla 16: Proteínas analito probadas con ZAZ3363 y ZAZ3422

Primera inyección		Segunda Inyección			Tampón para la dilución de la muestra
ZAZ3363 (200 nM)	ZAZ3422 (200 nM)	Proteína analito	Cat. No.	Conc. de analito (nM)	
Sí	Sí	hIL-17A <sup>1</sup>	200-17	2, 10, 50	HBS-EP and HBS-EP + NaCl
Sí	Sí	hIL-17A/F <sup>2</sup>	5194-IL-025/CF	50, 250	HBS-EP + NaCl
Sí	Sí	hIL-17B <sup>2</sup>	1248-IB-025/CF	50, 250	HBS-EP + NaCl
Sí	Sí	hIL-17C <sup>2</sup>	1234-IL-025/CF	50, 250	HBS-EP
Sí	Sí	hIL-17D <sup>2</sup>	1504-IL-025/CF	50, 250	HBS-EP + NaCl
Sí	Sí	hIL-17E <sup>2</sup>	1258-IL-025/CF	50, 250	HBS-EP
Sí	Sí	hIL-17F <sup>2</sup>	1335-IL/CF	50, 250	HBS-EP + NaCl
Sí	Sí	hIL-1beta <sup>1</sup>	200-1 B	50, 250	HBS-EP
Sí	Sí	hIL-6 <sup>2</sup>	206IL/CF	50, 250	HBS-EP
Sí	Sí	hIL23 <sup>2</sup>	1290-IL	50, 250	HBS-EP
Sí	Sí	hGM-CSF <sup>2</sup>	215-GM/CF	50, 250	HBS-EP
Sí	Sí	IgG (RoActemra) <sup>3</sup>	ATC L04AC07	50, 250	HBS-EP
Sí	No	IgA <sup>4</sup>	P80-102	50, 250	HBS-EP
Sí	No	IL-17RA <sup>2</sup>	177-IR	50, 250	HBS-EP
Sí	No	IL-1R1 <sup>2</sup>	269-1R/CF	50, 250	HBS-EP
Sí	No	Alfa-2-HS-glicoproteína (HEK Humana con AHSG) <sup>5</sup>	PRO-1644	50, 250	HBS-EP

(continuación)

Primera inyección		Segunda inyección			Tampón para la dilución de la muestra
ZAZ3363 (200 nM)	ZAZ3422 (200 nM)	Proteína analito	Cat. No.	Conc. de analito (nM)	
Sí	No	Haptoglobina Humana (parece ser una cadena beta) <sup>5</sup>	PRO-567	50, 250	HBS-EP
Sí	No	Alfa-1-antitripsina (SERPINA1 Humana) <sup>5</sup>	PRO-529	50, 250	HBS-EP
Sí	No	Macroglobulina a-2 Humana <sup>6</sup>	10952-H08B	50, 250	HBS-EP
Sí	No	Hemopexina Humana/ Proteína HPX <sup>6</sup>	10870-H08H	50, 250	HBS-EP
Sí	No	AMBp/microglobulina alfa 1 <sup>6</sup>	13141-H08H1	50, 250	HBS-EP
Sí	No	Microglobulina beta-2-/B2M <sup>6</sup>	11976-H08H	50, 250	HBS-EP
Sí	No	Transtiretina/ TTR/ prealbúmina/ proteína PALB <sup>6</sup>	12091-H08H	50, 250	HBS-EP
Sí	No	holo-Transferrina <sup>7</sup>	T4132	50, 250	HBS-EP
Sí	No	IL-17RA <sup>2</sup>	177-IR	50, 250	HBS-EP
Sí	No	IL-1R1 <sup>2</sup>	269-1R/CF	50, 250	HBS-EP

Proveedores: <sup>1</sup>Peprotech; <sup>2</sup>R&D Systems; <sup>3</sup>Roche/Apoteket AB; <sup>4</sup>Bethyl; <sup>5</sup>ProSpec; <sup>6</sup>Sino Biological Inc; <sup>7</sup>Sigma

## Resultados

5 Se ensayó la especificidad de ZAZ3363 y ZAZ3422 en un instrumento Biacore investigando su interacción con 24 o 12 proteínas analito, respectivamente. Los polipéptidos Z-ABD-Z se inyectaron sobre superficies que contenían HSA seguido de la inyección de las proteínas analito. Las únicas interacciones detectadas para ZAZ3363 y ZAZ3422 fueron una unión fuerte por hIL-17A y una unión más débil por hIL-17A/F, como se esperaba y en línea con los resultados presentados en el Ejemplo 8. Las proteínas analito también se evaluaron por su interacción potencial con la variante ABD PEP07843, pero no se detectaron interacciones. Por lo tanto, los polipéptidos Z-ABD-Z parecen ser altamente

10 específicos.

## Ejemplo 13

## Mediciones cinéticas de complejos de Z-ABD-Z, IL-17A y HSA usando KinExA®

15 Las limitaciones técnicas de SPR para determinar con precisión los parámetros cinéticos para interacciones de alta afinidad y la mayor complejidad para determinar la afinidad entre dos objetivos diméricos por SPR justificaron el uso de la tecnología Ensayo de exclusión cinética (KinExA®) para analizar adicionalmente la unión de polipéptidos Z- ABD-Z en complejo con HSA a IL-17A, así como la unión de polipéptidos Z-ABD-Z solos o en complejo con IL-17A a HSA. El KinExA® mide la afinidad de unión en equilibrio y la cinética entre moléculas no modificadas en fase de solución (Darling and Brault, 2004. Assay and Drug Dev Tech 2 (6): 647-657).

20

## Materiales y métodos

25 Los polipéptidos Z-ABD-Z ZAZ3220 (SEQ ID NO: 1236), ZAZ3363 (SEQ ID NO: 1244) y ZAZ3422 (SEQ ID NO: 1247), así como HSA (Novozymes, cat. No. 230- 005), IL-17A humana (Peprotech, cat. No. 200-17), IL-17A humana biotinilada (como se describe en el Ejemplo 1), anticuerpo monoclonal de ratón anti-HSA (Abcam, cat. No. 10241) y un anticuerpo policlonal de cabra anti-Z producidos internamente se enviaron a Sapidyne Instruments Inc (Boise, Idaho, EE. UU.), que realizó las mediciones y análisis con KinExA®.

30

Unión de Z-ABD-Z/HSA a IL-17A: Para la determinación de la afinidad, es decir, KD, se usó el polipéptido Z-ABD-Z respectivo, en complejo con HSA, como compañero de unión constante (CBP) y se utilizó IL-17A como titulante. El análisis de datos se realizó utilizando el software KinExA® Pro y aplicando un análisis de mínimos cuadrados para ajustar las soluciones óptimas para el KD y la concentración del sitio de unión activo (ABC) a una curva representativa de una interacción bimolecular reversible 1:1.

35

Para la determinación de ka, se aplicó el análisis de la curva de unión directa, usando la misma IL-17A inmovilizada como reactivo de captura para experimentos cinéticos que para experimentos de equilibrio. La cantidad de Z-ABD-

Z/HSA libre en la muestra se midió antes del equilibrio, produciendo puntos de datos que monitorearon la disminución en Z-ABD-Z/HSA libre a medida que la muestra se movía hacia el equilibrio.

5 Unión de Z-ABD-Z y Z-ABD-Z/IL-17A a HSA: El polipéptido Z-ABD-Z ZAZ3363 se analizó adicionalmente para determinar la unión a HSA en presencia o ausencia de IL-17A. Para la determinación de  $K_D$ , se utilizó ZAZ3363, libre o en complejo con IL-17A, como socio de unión constante (CBP) y HSA como titulante. El análisis de datos se realizó utilizando el software KinExA® Pro como se describió anteriormente.

10 Para la determinación de  $k_a$ , se aplicó el análisis de la curva de unión directa, usando la misma HSA inmovilizada como reactivo de captura para experimentos cinéticos que para experimentos de equilibrio. La cantidad de ZAZ3363/IL-17A en la muestra se midió antes del equilibrio, obteniendo puntos de datos que monitorearon la disminución de ZAZ3363/IL-17A libre a medida que la muestra se movía hacia el equilibrio.

15 Resultados

En un primer conjunto de mediciones de KinExA®, se demostró que los polipéptidos Z-ADB-Z ZAZ3220, ZAZ3363 y ZAZ3422, respectivamente, en complejo con HSA se unen a IL-17A con una afinidad excepcionalmente alta, con valores de  $K_D$  en el intervalo subpicomolar hasta femtomolar. Los parámetros cinéticos calculados cuando se asume una unión monovalente entre estos polipéptidos Z-ABD-Z y la IL-17A dimérica se muestran en la Tabla 17.

20 En un segundo conjunto de mediciones de KinExA®, se midió la interacción entre ZAZ3363, libre o en complejo con IL-17A, y HSA. Los parámetros cinéticos calculados a partir de estos análisis se muestran en la Tabla 18. La afinidad de ZAZ3363 por HSA no se vio afectada significativamente por la presencia de IL-17A.

25 Para resumir, las mediciones que utilizan la tecnología KinExA® indicaron una afinidad excepcionalmente alta de los polipéptidos Z-ABD-Z por IL-17A. La  $K_D$  medida de <0,33 pM es superior a las afinidades informadas para dos de los comparadores clínicamente más avanzados, secukinumab ( $K_D = 122$  pM; documentos WO2006/013107 y WO2012/125680) e ixekizumab ( $K_D = 2$  pM; documento WO2007/070750). Además, se demostró la unión simultánea a IL-17A y albúmina, es decir, ambas funciones de unión están intactas en la proteína de fusión Z-ABD-Z.

30

Tabla 17: Parámetros cinéticos para la unión de polipéptidos Z-ABD-Z a IL-17A

CBP	SEQ ID NO	$k_a^a$ [*] ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ [*] (M)
ZAZ3220/HSA	1236	$1,35 \times 10^7$ [ $1,25 \times 10^7 - 1,46 \times 10^7$ ]	$1,51 \times 10^{-7}$	$<6,5 \times 10^{-14}$ [**]
ZAZ3363/HSA	1244	$4,78 \times 10^6$ [ $5,64 \times 10^6 - 4,04 \times 10^6$ ]	$1,55 \times 10^{-6}$	$3,23 \times 10^{-13}$ [ $1,54 \times 10^{-13} - 5,54 \times 10^{-13}$ ]
ZAZ3422/HSA	1247	$7,80 \times 10^6$ [ $6,37 \times 10^6 - 9,56 \times 10^6$ ]	$6,08 \times 10^{-7}$	$7,85 \times 10^{-14}$ [ $1,63 \times 10^{-14} - 1,73 \times 10^{-13}$ ]

\* Intervalo de confianza del 95%  
 \*\* El intervalo de confianza del 95% para  $K_D$  no se resolvió

Tabla 18: Parámetros cinéticos para la unión de un polipéptido Z-ABD-Z a HSA

CBP	SEQ ID NO	$k_a$ [*] ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ [*] (M)
ZAZ3363	1244	n.d.	n.d.	$4,85 \times 10^{-11}$ [ $3,23 \times 10^{-11} - 6,87 \times 10^{-11}$ ]
ZAZ3363/IL-17A	1244	$1,21 \times 10^6$ [ $9,35 \times 10^5 - 1,50 \times 10^6$ ]	$3,56 \times 10^{-5}$	$2,94 \times 10^{-11}$ [ $1,72 \times 10^{-11} - 4,64 \times 10^{-11}$ ]

\* Intervalo de confianza del 95%

35 Ejemplo 14

Caracterización de polipéptidos Z-ABD-Z en el ensayo de NHDF

40 Materiales y métodos

40

Bloqueo de la producción de IL-6 inducida por IL-17A en el ensayo de NHDF: Se cultivaron células NHDF (Lonza, cat. No. CC-2511) en medio basal de fibroblastos (Lonza, cat. No. CC-3132) que contenían factores promotores del crecimiento (Lonza, cat.no. CC-5034). El día antes del experimento, se sembraron 5000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos de área media (Greiner, catálogo No. 675180) en 100  $\mu$ L. El día del experimento, se prepararon diluciones de polipéptidos Z-ABD-Z específicos de IL-17A con diferentes longitudes de enlazador entre los fracciones Z y ABD (ZAZ3174 (SEQ ID NO: 1233), ZAZ3175 (SEQ ID NO: 1234), ZAZ3176 (SEQ ID NO: 1235), ZAZ3220 (SEQ ID NO: 1236), ZAZ3221 (SEQ ID NO: 1237), ZAZ3234 (SEQ ID NO: 1238), ZAZ3235 (SEQ ID NO: 1239), ZAZ3236 (SEQ ID NO: 1240), ZAZ3237 (SEQ ID NO: 1241), ZAZ3269 (SEQ ID NO: 1242) y ZAZ3270 (SEQ ID NO: 1243)) en

45

una placa separada de 96 pozos. Los polipéptidos Z-ABD-Z se valoraron en tres etapas desde 190 nM a 0,003 nM en medio que contenía hIL-17A 0,9 nM y HSA 8 µM. También se preparó una curva de IL-17A estándar (6,2-0,0001 nM), así como controles que contenían medio con IL-17A 0,9 nM o medio solo. El medio en la placa con células NHDF cultivadas durante la noche se descartó y se transfirieron 100 µL/pozo de la muestra a la placa de células, que se colocó en una incubadora a 37 °C durante 18-24 h. Al día siguiente, se cuantificó el contenido de IL-6 en los sobrenadantes usando ELISA específico de IL-6 como se describe en el Ejemplo 3. Polipéptidos Z-ABD-Z adicionales (ZAZ3363 (SEQ ID NO: 1244), ZAZ3364 (SEQ ID NO: 1245), ZAZ3365 (SEQ ID NO: 1246) y ZAZ3422 (SEQ ID NO: 1247)) se analizaron en ensayos de NHDF posteriores esencialmente como se describió anteriormente, pero usando una línea celular NHDF de ATCC (cat. No. PSC-201-012). Las capacidades de bloqueo de estos polipéptidos Z-ABD-Z también se analizaron después de la incubación de los polipéptidos a 40 °C durante 2 y 4 semanas.

## Resultados

Se investigó la capacidad de los polipéptidos Z-ABD-Z para bloquear la producción de IL-6 inducida por IL-17A en el ensayo de NHDF. Primero, se observó que el formato de Z-ABD-Z aumentó la capacidad de bloqueo significativamente en comparación con el formato monomérico de His<sub>6</sub>-Z, como se muestra en la Figura 7A, en la que se muestran las curvas inhibitorias para His<sub>6</sub>-Z10241 y ZAZ3220 (que comprende Z10241). La forma de la curva para ZAZ3220 sugiere que se alcanza el límite de detección para este ensayo de células, con un efecto de inhibición uno a uno del ZAZ3220, y es probable que el polipéptido Z-ABD-Z tenga incluso un mejor efecto inhibitor que el que se puede apreciar en este experimento. Se contempla que la potencia de ZAZ3220 aumenta hasta el límite del ensayo debido al fuerte efecto de avidéz obtenido al unirse a la IL-17A homodimérica. En segundo lugar, una comparación de polipéptidos Z-ABD-Z con diferentes longitudes de enlazador y que comprenden las variantes de Z Z06282 (SEQ ID NO: 1206) y Z12876 (SEQ ID NO: 1218) reveló que la longitud del enlazador tenía un efecto menor en la capacidad de bloqueo. En la Figura 7B se muestra un conjunto de polipéptidos Z-ABD-Z que comprenden Z06282 con diferentes longitudes de enlazador. Se analizaron polipéptidos Z-ABD-Z adicionales, ZAZ3363, ZAZ3364, ZAZ3365 y ZAZ3422, en ensayos posteriores de NHDF, también después de la incubación de los polipéptidos Z-ABD-Z a 40 °C durante dos y cuatro semanas. La capacidad inhibitoria de IL-17A se mantuvo incluso después de cuatro semanas de incubación a 40 °C. Los valores de IC<sub>50</sub> calculados, que reflejan la capacidad de diferentes polipéptidos Z-ABD-Z para inhibir IL-17A, se resumen en la Tabla 19. Estos valores de IC<sub>50</sub> son más de tres veces más bajos que la actividad neutralizante de la producción de hIL-6 reportada (IC<sub>50</sub> = 2,1 ± 0,1 nM) del anticuerpo monoclonal inhibitor de IL-17A secukinumab, AIN457, (documentos WO2006/013107 y WO2012/125680) actualmente en desarrollo clínico.

Tabla 19: Valores de IC<sub>50</sub> calculados a partir de ensayos de NHDF

Polipéptido Z-ABD-Z	SEQ ID NO	Incubación a 40 °C (semanas)	IC <sub>50</sub> (nM)
ZAZ3174	1233	n.a.	0,63
ZAZ3175	1234	n.a.	0,56
ZAZ3176	1235	n.a.	0,50
ZAZ3220	1236	n.a.	0,27
ZAZ3221	1237	n.a.	0,39
ZAZ3234	1238	n.a.	0,66
ZAZ3235	1239	n.a.	0,60
ZAZ3236	1240	n.a.	0,54
ZAZ3237	1241	n.a.	0,49
ZAZ3269	1242	n.a.	0,42
ZAZ3270	1243	n.a.	0,41
ZAZ3363	1244	0	0,38
ZAZ3363	1244	2	0,25
ZAZ3363	1244	4	0,49
ZAZ3364	1245	0	0,20
ZAZ3364	1245	2	0,40

(continuación)

Polipéptido Z-ABD-Z	SEQ ID NO	Incubación a 40 °C (semanas)	IC <sub>50</sub> (nM)
ZAZ3364	1245	4	0,47
ZAZ3365	1246	0	0,45
ZAZ3365	1246	2	0,34
ZAZ3365	1246	4	0,55
ZAZ3422	1247	0	0,38
ZAZ3422	1247	2	0,45
ZAZ3422	1247	4	0,42

## Ejemplo 15

5 Neutralización *in vivo* de hIL-17A

IL-17A humana es capaz de unirse y estimular el receptor de IL-17 de ratón, lo que conduce a la elevación y posterior secreción de la quimiocina KC (CXCL1) de ratón.

## 10 Materiales y métodos

Neutralización *in vivo* de hIL-17A en el modelo de ratón KC: Se realizaron experimentos de intervalo de dosis para identificar la dosis óptima de IL-17A humana para la inducción de KC de ratón. Estos experimentos revelaron que una dosis de 150 µg/kg de IL-17A humana indujo un nivel adecuado de KC en el suero de ratón recogido 2 h después de la administración de IL-17A. Se analizaron ZAZ3174 (SEQ ID NO: 1233) y ZAZ3220 (SEQ ID NO: 1236) en este modelo en dos ocasiones diferentes. En el primer experimento, se administró ZAZ3174 sc a ratones en tres dosis diferentes; 0,25, 2,5 y 25 mg/kg, 9 h antes de una inyección subcutánea de IL-17A humana. Los ratones se sacrificaron 2 h después de la administración de IL-17A humana y los niveles de KC se determinaron mediante ELISA usando un kit disponible comercialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (KC Quantikine; R&D Systems, cat. No. D1700). En el segundo experimento, se administró ZAZ3220 sc a ratones a tres dosis diferentes, 0,05, 0,1, 0,4 mg/kg, 9 h antes de una inyección subcutánea de IL-17A humana. Los ratones se sacrificaron 2 h después de la administración de IL-17A humana y los niveles de KC se determinaron mediante ELISA como anteriormente.

## 25 Resultados

Neutralización *in vivo* de hIL-17A en el modelo de ratón KC: Los polipéptidos Z-ABD-Z ensayados bloquean la capacidad de la IL-17A humana para estimular el receptor de IL-17 de ratón, lo que conduce a la inhibición de una elevación de KC de ratón, de una manera dependiente de la dosis. ZAZ3174 a una dosis de 2,5 mg/kg en las condiciones descritas, bloqueó completamente la inducción de KC, como se muestra en la Figura 8A. El segundo experimento reveló que el polipéptido Z-ABD-Z ZAZ3220, que comprende una variante de Z madurada por afinidad, bloqueó completamente la respuesta de KC inducida por IL-17A a una dosis de 0,4 mg/kg (Figura 8B). Esto corresponde a un efecto de bloqueo *in vivo* mejorado 6 veces en comparación con ZAZ3174. Se obtuvo una inhibición del 72% con 0,1 mg/kg de ZAZ3220.

## 35 Ejemplo 16

Farmacocinética *in vivo* de polipéptidos Z-ABD-Z en ratas

Este ejemplo describe dos experimentos separados en los que se determinaron los parámetros farmacocinéticos en ratas para dos polipéptidos Z-ABD-Z diferentes después de inyecciones subcutánea (sc) y/o intravenosa (iv).

## Materiales y métodos

En un primer experimento, ZAZ3220 (SEQ ID NO: 1236) formulado en PBS se administró iv (n = 3) a ratas macho Sprague Dawley (SD) (Charles River, Alemania) a una dosis de 1,2 mg/kg correspondiente a 57 nmol/kg. Se recogieron muestras de sangre de la vena de la cola de cada rata en los puntos de tiempo 0,08, 8, 24, 48, 72, 120, 168, 240, 336, 408 y 504 h después de la administración.

En un segundo experimento, ZAZ3363 (SEQ ID NO: 1244) formulado en PBS se administró iv (n = 5) o sc (n = 6) a ratas macho SD a una dosis de 1,2 mg/kg correspondiente a 64 nmol/kg. Se recolectaron muestras de sangre de la vena de la cola de cada rata en los puntos de tiempo 0, 0,08, 0,5, 1, 3, 8, 24, 72, 120, 168, 216, 264, 336, 408, 456 y 504 h después de la administración iv o en los puntos de tiempo 0, 0,08, 0,5, 1, 3, 8, 24, 72, 120 y 168 h después de la administración sc.

Se preparó suero a partir de las muestras de sangre y se almacenó a -20 °C hasta el análisis. La cuantificación de ZAZ3220 y ZAZ3363 en suero de ratas se realizó usando un PK-ELISA.

5 PK-ELISA: Se recubrieron placas de 96 pozos de media área (50 µL/pozo) con 4 µg/pozo de Ig de cabra anti-Z (producido internamente) en tampón de recubrimiento (Sigma, cat. No. C3041) durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se bloquearon con PBS + caseína al 0,5% durante 1,5 h. Se añadió a las placas individuales suero de rata, diluido mínimamente 10 veces en PBS-caseína + combinación de suero de rata al 10% (matriz de ensayo) y se valoró en series de dilución doble. En una placa se incluyó el estándar de cada polipéptido Z-ABD-Z (titulado entre 300 ng/mL y 3 pg/mL) y en cada placa cuatro controles de cada polipéptido Z-ABD-Z diluidos a una concentración dentro del intervalo lineal del ensayo. El estándar y los controles se diluyeron en la matriz de ensayo. El estándar diluido, los controles y las muestras se prepararon en placas separadas y se transfirieron a las placas de ELISA recubiertas. Las placas se incubaron durante 1,5 h a TA seguido de 1,5 h de incubación con una Ig de conejo anti-ABD de detección personalizada (4 µg/mL, CUV002) y una incubación de 1 h con IgG de burro anti-conejo conjugado con HRP (Jackson Immunoresearch, cat. No. 711-035-152). La reacción se desarrolló con TMB (Thermo Fisher) y la reacción de desarrollo se detuvo después de 15 min con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. La absorbancia se leyó a 450 nm en un lector de ELISA (Victor<sup>3</sup>, Perkin Elmer). Las concentraciones de la variante de Z-ABD-Z respectiva en las muestras se calcularon a partir de la curva estándar utilizando GraphPad Prism5 y un ajuste de curva logístico de cuatro parámetros (4-PL).

15 Análisis farmacocinético: El análisis farmacocinético se basó en la concentración individual de suero de rata frente al tiempo. La vida media terminal (T<sub>1/2</sub>) y la biodisponibilidad se estimaron utilizando Microsoft Excel y GraphPad Prism y aplicando un modelo de dos compartimentos.

## 25 Resultados

Los perfiles de concentración media en suero-tiempo de los polipéptidos Z-ABD-Z ZAZ3220 y ZAZ3363 después de administraciones únicas de 1,2 mg/kg a ratas SD se muestran en la Figura 9A y la Figura 9B, respectivamente, y los parámetros farmacocinéticos calculados usando un análisis de dos compartimentos se resumen en la Tabla 20. La vida media (t<sub>1/2</sub>) estimada fue de aproximadamente 49 h tanto para ZAZ3220 como para ZAZ3363 después de administración iv. La t<sub>1/2</sub> para ZAZ3363 administrado sc fue de 45 h y la biodisponibilidad se calculó para el 45%.

Tabla 20: Parámetros farmacocinéticos medios de los polipéptidos Z-ABD-Z después de una sola administración iv o sc a ratas SD

Parámetro farmacocinético	ZAZ3220 iv	ZAZ3363 iv	ZAZ3363 sc
C <sub>máx.</sub> (nmol/L)	1905	1870	330
T <sub>máx.</sub> (h)	0,08	0,08	24
AUC <sub>0-t</sub> (h*nmol/L)	46369	42757	19351
t <sub>1/2</sub> de eliminación (h)	49	49	45
MRT (h)	35	33	47
CL (L/h/kg)	0,003	0,003	0,003
F (%)	n.a.	n.a.	45

C<sub>máx.</sub>: concentración máxima en suero; T<sub>máx.</sub>: Tiempo para alcanzar la concentración máxima en suero; AUC<sub>0-t</sub>: Área bajo la curva concentración-tiempo desde el tiempo cero hasta la última concentración cuantificable; T<sub>1/2</sub>: Vida media; MRT: tiempo medio de residencia; CL: Eliminación; F: Porcentaje de biodisponibilidad absoluta, calculado como  $F = [(AUC_{sc} \text{ media} \times Dosis_{iv}) / (AUC_{iv} \text{ media} \times Dosis_{sc})] \times 100$

## 35 Ejemplo 17

Administración tópica de la variante de Z en ojos de conejos

40 La administración local al ojo es beneficiosa en los trastornos oftalmológicos, por ejemplo, enfermedades de uveítis o de ojo seco. La administración tópica permite concentraciones locales de fármaco extremadamente altas con un riesgo mínimo de efectos secundarios sistémicos. En este Ejemplo, se investigó la posibilidad de administrar tópicamente moléculas variantes de Z a los ojos en conejos. Se midió la concentración de una molécula variante de Z y una IgG de control en la cámara anterior (humor acuoso), en el humor vítreo y en suero después de cuatro dosis tópicamente repetidas.

45 Materiales y métodos

Producción de la variante de Z: La variante de Z Z10199 (SEQ ID NO: 1217) derivada de Z06282 (SEQ ID NO: 1206) pero el AE inicial se subclonó sin ninguna etiqueta pero con la adición al terminal C de residuos de aminoácidos de VD. La expresión se realizó esencialmente como se describe en el Ejemplo 2, y la purificación se llevó a cabo mediante intercambio aniónico y cromatografía de fase inversa. Se cambió el tampón de la muestra a PBS pH 7,2 y se eliminaron las endotoxinas usando una columna 10 roja EndoTrap® (Hyglos).

Estudio con animales: Se administraron 48 nmol (1 gota, 50 µL) de Z10199 y ZAZ3174 (SEQ ID NO: 1233), respectivamente, tópicamente a cada ojo de los conejos (n = 2 por molécula) en los puntos de tiempo 0, 1, 2 y 3 horas. Se administró un anticuerpo IgG humano de control (Xolair; Novartis) de la misma manera a dos conejos diferentes. Como control negativo, solo se administró PBS a un conejo. Después de cada administración, los párpados se mantuvieron cerrados durante aproximadamente 30 s para mantener la muestra en la córnea. Después de 4 h se recogieron humor vítreo, humor acuoso y suero. Las muestras se centrifugaron para eliminar los residuos de tejido y los agregados y los niveles de Z10199, ZAZ3174 y anticuerpos, respectivamente, se cuantificaron mediante ELISA.

Cuantificación por ELISA: La concentración de Z10199 y ZAZ3174, respectivamente, en las muestras recolectadas se analizó mediante un ELISA tipo sándwich usando una inmunoglobulina de cabra policlonal anti-proteína Z producida internamente para captura, una inmunoglobulina de conejo policlonal anti-proteína Z producida internamente como anticuerpo primario e IgG de cabra anti-conejo conjugada con HRP (Dako cat. No. P0448) como anticuerpo secundario. La detección se realizó mediante incubación con TMB ImmunoPure durante 15 min a TA y la reacción se detuvo mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. Se midió la absorción a 450 nm con el lector de microplacas Victor<sup>3</sup>. La concentración de Z10199 se calculó a partir de una curva estándar preparada con la misma molécula y utilizando GraphPad Prism5 y una fórmula de regresión no lineal.

La concentración de IgG en las muestras recogidas se analizó mediante un kit de ELISA para IgG (Abcam 100547) y se realizó como lo describe el fabricante, usando una curva estándar proporcionada y el análisis por regresión no lineal como anteriormente.

#### Resultados

La Figura 10 muestra que tanto Z10199 como ZAZ3174 penetraron en el ojo después de la administración tópica y estaban presentes en el humor acuoso y vítreo a concentraciones bajas de nM. Por el contrario, el anticuerpo IgG de control no se detectó ni en el humor acuoso ni en el vítreo. Las muestras de suero podrían considerarse negativas tanto para la variante de Z como para IgG. Por lo tanto, las moléculas variantes de Z de la presente divulgación pueden administrarse por esta vía alternativa de administración, que no está disponible para los anticuerpos, y puede lograrse un efecto local que evite la exposición sistémica.

#### Ejemplo 18

Análisis farmacocinético de la administración duodenal de formulaciones de ZAZ3363 en ratas

#### Materiales y métodos

Ítem de prueba: ZAZ3363 (SEQ ID NO: 1244) se formuló en 1) OAF1: quenodesoxicolato de sodio 0,12 M (Sigma, cat. No. C8261) y galato de propilo 0,12 M (Sigma, cat. No. P3130), pH 7,4; 2) OAF2: 50 mg/mL de caprato de sodio (Sigma, cat. No. C4151); o 3) fosfato de sodio 50 mM (PBS), pH 7,0, a una concentración de 50 mg/mL (OAF1 y OAF2) o 100 mg/mL (PBS).

Ensayo de células NHDF: La actividad de ZAZ3363 (SEQ ID NO: 1244) formulado en OAF1, OAF2 o PBS se verificó en el ensayo de células NHDF dependientes de IL-17 descrito en el Ejemplo 14.

Administración duodenal: Se anestesiaron ratas macho Sprague Dawley (Charles River) con isoflurano y se realizó una pequeña incisión para localizar el duodeno. Se insertó quirúrgicamente un catéter permanente (R-DUOD, AgnTho's, Suecia) en el duodeno a 20 mm de su origen en un área de vasculatura mínima. El catéter se tunelizó por vía subcutánea en la espalda de los animales. La musculatura abdominal se cerró con suturas, mientras que la incisión de la piel abdominal y el sitio de exteriorización subescapular se cerraron con grapas de acero inoxidable para heridas. Se dejó que los animales se recuperaran durante 5-6 días antes de llevarlos al estudio. Se administró analgesia postoperatoria sc antes de la cirugía (carprofeno 5 mg/kg y buprenorfina 0,05 mg/kg). El carprofeno se administró una vez al día también los dos días posteriores a la cirugía. Se administraron dosis adicionales de buprenorfina cuando fue necesario. Se administraron antibióticos (enrofloxacin 0,3 mg/mL) en el agua de bebida durante el período de recuperación (3-5 días), así como durante el experimento. Para enmascarar el sabor amargo de la enrofloxacin, se añadió un trozo de azúcar a 500 mL de agua potable. Para asegurar una permeabilidad mantenida, el catéter duodenal se lavó diariamente con agua estéril (0,2-0,5 mL).

Se administró ZAZ3363 directamente en el duodeno a una dosis de 5,4 µmol/kg de peso corporal formulado en OAF1 o OAF2 (n = 2) o a razón de 10,8 µmol/kg formulado en PBS (n = 2) en un volumen de 0,5 mL en el punto cero del tiempo. Se tomaron muestras de sangre bajo anestesia con isoflurano a las 1, 3, 8, 24, 72, 120 y 168 h después de la

administración y el suero se preparó mediante procedimientos estándar. La concentración de ZAZ3363 en suero se midió mediante el PK-ELISA cuantitativo descrito en el Ejemplo 16, pero titulando el estándar de ZAZ3363 entre 70 y 1 ng/mL.

5 Análisis farmacocinético: El análisis farmacocinético se basó en la concentración individual en suero de rata frente al tiempo. La vida media terminal ( $T_{1/2}$ ) y la biodisponibilidad se estimaron utilizando Microsoft Excel y GraphPad Prism.

Resultados

10 Actividad de ZAZ3363 formulado: La actividad de ZAZ3363 formulado en OAF1 y OAF2, respectivamente, se comparó con la formulación en PBS en el ensayo de células NHDF. La Figura 11 muestra las curvas de valoración de OAF1 en comparación con ZAZ3363 formulado con PBS (Figura 11A) y OAF2 en comparación con ZAZ3363 formulado con PBS (Figura 11B). El experimento mostró que la actividad de ZAZ3363 en las dos formulaciones era idéntica a la de PBS, es decir, la actividad biológica de ZAZ3363 no se vio afectada por los diferentes excipientes.

15 Captación intraduodenal de ZAZ3363: Se examinó la captación intestinal de OAF1, OAF2 y ZAZ3363 formulado con PBS en un modelo de rata de administración intraduodenal (id). El experimento mostró una mayor absorción con las formulaciones de OAF1 y OAF2 en comparación con PBS (Figura 12). Las biodisponibilidades fueron 0,2, 0,8 y 0,0007 para OAF1, OAF2 y PBS, respectivamente, como se muestra en la Tabla 21. ZAZ3363 formulado con OAF2 mostró la mejor absorción, en promedio 1160 veces mejor en comparación con la formulación en PBS, aunque se observó una gran variación individual. La formulación de ZAZ3363 en OAF1 fue en promedio 260 veces mejor que la formulación en PBS.

25 Tabla 21: Biodisponibilidad y  $T_{1/2}$  después de la administración intraduodenal de ZAZ3363 en tres formulaciones diferentes

Formulación	$T_{1/2}$ (h)	Biodisponibilidad (%)
PBS	43	0,0007 +/- 0,0002
OAF1	43	0,2 +/- 0,02
OAF2	50	0,8 +/- 1,2

Ejemplo 19

30 Caracterización de complejos anti-IL-17A/anti-TNF en el ensayo de NHDF

Materiales y métodos

35 Producción de complejos y anticuerpo de control: Se construyeron dos complejos diferentes dirigidos a IL-17A y TNF, así como un anticuerpo con afinidad por TNF. El anticuerpo denominado "Ada", que tiene las mismas secuencias de CDR y especificidad que el anticuerpo monoclonal adalimumab disponible comercialmente, se construyó utilizando las secuencias de cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) HC<sub>Ada</sub> (SEQ ID NO: 1231) y LC<sub>Ada</sub> (SEQ ID NO: 1232). La fracción Z14253 de la variante de Z dirigida a IL-17A (SEQ ID NO: 1219) se fusionó genéticamente, a través de un enlazador flexible de 15 residuos (GGGGS)<sub>3</sub>, a los extremos terminales C de HC<sub>Ada</sub> o LC<sub>Ada</sub>, dando como resultado los complejos HC<sub>Ada</sub>-Z14253 y LC<sub>Ada</sub>-Z14253, respectivamente. En la Figura 13A se muestra un esquema de los complejos construidos. La síntesis de genes, la clonación, la producción por expresión génica transitoria en células CHO y la purificación mediante cromatografía de afinidad de proteína A fue realizada por Evitria AG (Suiza).

40 Bloqueo de la producción de IL-6 inducida por IL-17A en el ensayo de NHDF: El ensayo de NHDF se realizó esencialmente como se describe en el Ejemplo 14, titulando las muestras de estudio HC<sub>Ada</sub>-Z14253 y LC<sub>Ada</sub>-Z14253 y sus comparadores en tres etapas desde 63 nM a 0,003 nM en un medio que contiene rhIL-17A 0,9 nM. Los comparadores fueron ZAZ3363 (SEQ ID NO: 1244), el anticuerpo anti-TNF Ada, así como una variante de Z de control negativo Z04726 (SEQ ID NO: 1223; taq polimerasa dirigida) fusionada recombinantemente con la variante de ABD PP013 (SEQ ID NO: 1224) a través de un enlazador de VDSS (denominado Z04726-PP013), como se describe en el Ejemplo 2. También se preparó una curva estándar de IL-17A (6,2-0,0001 nM) así como controles que contenían medio con IL-17A 0,9 nM o solo medio. El contenido de IL-6 en los sobrenadantes se cuantificó usando el ELISA específico para IL-6 descrito en el Ejemplo 3.

45 Bloqueo de la producción de IL-8 inducida por TNF o TNF/IL-17A en el ensayo de NHDF: Se cultivaron células NHDF (Lonza, cat. No. CC-2511) en medio basal de fibroblastos (Lonza, cat. No. CC-3132) provisto de factores promotores del crecimiento (Lonza, cat. No. CC-5034). El día antes del experimento, se sembraron 5000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos de media área (Greiner, cat. No. 675180) en 100  $\mu$ L. El día del experimento, se prepararon diluciones de HC<sub>Ada</sub>-Z14253 y LC<sub>Ada</sub>-Z14253 y los comparadores descritos anteriormente en una placa separada de 96 pozos. Los complejos y comparadores se valoraron en tres etapas de 5 nM a 0,0007 nM en medio que contenía TNF humano 0,1 nM (R&D Systems, cat. No. 2210-TA/CF) o una mezcla de rhIL-17A 0,05 nM y 0,1 nM.

También se prepararon controles que contenían medio con TNF 0,1 nM o una mezcla de rhIL-17A 0,05 nM y 0,1 nM o medio solo. El medio en la placa con las células NHDF cultivadas durante la noche se descartó y se transfirieron 100  $\mu$ L/pozo de la muestra a la placa de células. La placa se colocó en una incubadora a 37 °C durante 18-24 h. Al día siguiente, se cuantificó el contenido de IL-8 en los sobrenadantes usando un ELISA específico de IL-8.

5 ELISA DE IL-8: IL-8 se cuantificó mediante un kit de ELISA DuoSet (R&D Systems, cat. No. DY208). Se recubrieron placas de media área (Costar, cat. No. 3690) con el anticuerpo de captura anti-IL-8, 4  $\mu$ g/mL en PBS, 50  $\mu$ L/pozo, durante la noche a 4 °C. El día del análisis, la placa se enjuagó dos veces con agua del grifo y luego se bloqueó con PBS + BSA al 1% durante 2 h. IL-8 estándar (R&D Systems, cat. No. 890806), titulado en una serie de dilución doble (20-0,01 ng/mL) y los sobrenadantes de la placa de ensayo de células se agregaron a la placa de ELISA recubierta (50  $\mu$ L/pozo) y se incubó durante 1,5 h a TA. La placa se lavó 4 veces en una lavadora de ELISA automatizada y se añadieron 20 ng/mL (50  $\mu$ L/pozo) de anticuerpo de detección anti-IL-8 biotinilado. Después de otra hora de incubación, se lavó la placa y se añadieron por pozo 50  $\mu$ L de estreptavidina-HRP (Thermo Fisher, cat. No. N100) diluido 8000 veces. La placa se reveló después de una hora adicional de incubación y lavado, con 50  $\mu$ L de TMB (Thermo Fisher, cat. No. 34021) por pozo, y la reacción se detuvo con 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. Las absorbancias se leyeron en un lector de etiquetas múltiples (Victor<sup>3</sup>, Perkin Elmer).

#### Resultados

20 Bloqueo de la producción de IL-6 inducida por IL-17A en el ensayo de NHDF: Los dos complejos HC<sub>Ada</sub>-Z14253 y LC<sub>Ada</sub>-Z14253 se estudiaron con respecto a su capacidad para bloquear la producción de IL-6 inducida por IL-17A en el ensayo de NHDF. Los resultados del ensayo de NHDF se presentan en la Figura 13B. Tanto HC<sub>Ada</sub>-Z14253 como LC<sub>Ada</sub>-Z14253 tienen una capacidad similar para bloquear IL-17A como ZAZ3363. Como se esperaba, no se observó inhibición para Ada o el control negativo Z04726-PP013.

25 Bloqueo de la producción de IL-8 inducida por TNF o TNF/IL-17A en el ensayo de NHDF: Los dos complejos HC<sub>Ada</sub>-Z14253 y LC<sub>Ada</sub>-Z14253 se estudiaron con respecto a su capacidad para bloquear la producción de IL-8 inducida por TNF o una mezcla de TNF/IL-17A en el ensayo de NHDF. Los resultados del ensayo de NHDF mostraron que HC<sub>Ada</sub>-Z14253 y LC<sub>Ada</sub>-Z14253 tienen perfiles inhibidores similares a los del anticuerpo anti-TNF Ada con respecto a la capacidad de bloqueo de TNF específica (Figura 13C). Sin embargo, HC<sub>Ada</sub>-Z14253 y LC<sub>Ada</sub>-Z14253 tenían perfiles inhibidores superiores en comparación con Ada y ZAZ3363 en el ensayo de combinación, en el que se investigó el efecto de bloqueo de TNF e IL-17 (Figura 13D).

#### Ejemplo 20

##### Farmacocinética *in vivo* del polipéptido Z-ABD-Z en monos

Este ejemplo describe un estudio de dosis repetidas realizado durante 10 días en monos cynomolgus a los que se les administró el polipéptido Z-ABD-Z ZAZ3363. Los resultados se utilizaron para estimar la vida media de ZAZ3363 en cynomolgus.

#### Materiales y métodos

45 Se administró ZAZ3363 (SEQ ID NO: 1244) a 20 mg/kg (n = 2; 1 macho y 1 hembra) y 40 mg/kg (n = 4; 2 machos y 2 hembras) como una infusión iv corta en los días 1, 4, 7 y 10. Se recogieron muestras de plasma para la determinación de la concentración de ZAZ3363 en relación con la primera dosis el día 1 (en los puntos de tiempo 0 (antes de la dosis), 5 min, 0,5, 1, 2, 6, 24 y 48 h después de la administración) y la última dosis el día 10 (en los puntos de tiempo 0 (antes de la dosis), 5 min, 0,5, 1, 2, 6, 24, 48 h, 5, 7, 10, 12, 14 y 21 días después de la administración). La cuantificación de ZAZ3363 en muestras de plasma se realizó mediante LC-MS/MS con base en los péptidos obtenidos después de la digestión triptica de ZAZ3363. Los perfiles de concentración-tiempo se evaluaron usando métodos no compartimentales con análisis separados para el día 1 y día 10 y métodos compartimentales que evalúan los datos para el día 1 y el día 10 combinados para cada animal.

#### Resultados

55 Los perfiles de concentración media en plasma-tiempo de ZAZ3363 después de la administración el día 1 y el día 10 se muestran en la Figura 14A y la Figura 14B, respectivamente. A pesar de que ZAZ3363 no se administró como una dosis única con una evaluación farmacocinética completa, los resultados disponibles después de dosis múltiples permiten predecir el perfil de concentración-tiempo después de dosis únicas. Las concentraciones plasmáticas disminuyeron en dos fases de acuerdo con un comportamiento bicompartimental. El t<sub>1/2</sub> de la segunda fase estimada a partir de este y un segundo estudio de dosis repetidas (datos no mostrados) fue de aproximadamente 4-7,5 días, lo que está de acuerdo con el t<sub>1/2</sub> informado para la albúmina de mono (Deo et al., 1974, J Nutr 104: 858-64). No se observaron diferencias de género significativas.

#### Ejemplo 21

Administración oral del polipéptido Z-ABD-Z en perros

Materiales y métodos

- 5 Preparación de cápsulas: Se formuló ZAZ3363 (SEQ ID NO: 1244) en OAF1 (véase el Ejemplo 18) a una concentración de 100 mg/mL. La formulación se liofilizó y se cargó en cápsulas de cubierta dura, posteriormente recubiertas entéricamente (realizado por Catalent Pharma Soluciones, Beinheim, Francia). Cada cápsula contenía aproximadamente 25 mg de ZAZ3363.
- 10 Estudio con animales: El estudio con animales se realizó en Huntingdon Life Science (Cambridgeshire, Reino Unido). Los perros Beagle en ayunas (n = 3; individuos hembras) recibieron cada uno seis cápsulas que contenían ZAZ3363 (aproximadamente 150 mg). Se tomaron muestras de suero a las 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 96 h después de la administración.
- 15 Cuantificación: La concentración de ZAZ3363 en muestras de suero se cuantificó usando un ELISA en sándwich PK esencialmente como se describe en el Ejemplo 16, pero usando una IgG monoclonal anti-Z producida internamente en la primera etapa de recubrimiento.

Resultados

- 20 En la Figura 15 se muestran las concentraciones en suero de perros individuales frente a los perfiles de tiempo de ZAZ3363. Los resultados mostraron una absorción intestinal de ZAZ3363 en los tres animales, pero con alguna variación entre los individuos. La concentración en suero de ZAZ3363 alcanzó un máximo de 2-30 nM. Una vez en la circulación, los niveles en suero de ZAZ3363 permanecen estables al menos hasta 96 h, lo que se atribuye a la
- 25 interacción con albúmina de perro de la fracción de ABD PP013 (SEQ ID NO: 1223) dentro de ZAZ3363. La capacidad de PP013 para unirse a albúmina de perro se ha demostrado previamente (documento WO2012/004384).

## REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de unión a IL-17A, que comprende un motivo de unión *BM* a IL-17A, cuyo motivo consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:
- 5 i)  $EX_2DX_4AX_6X_7EIX_{10}X_{11}LPNLX_{16}X_{17}X_{18}QX_{20}X_{21}AFIX_{25}X_{26}LX_{28}X_{29}$   
 en la que, independientemente uno de otro,
- 10  $X_2$  es A;  
 $X_4$  se selecciona de D y Q;  
 $X_6$  es A;  
 $X_7$  es V;  
 $X_{10}$  es A;  
 $X_{11}$  se selecciona de A, D y S;  
 15  $X_{16}$  se selecciona de N y T;  
 $X_{17}$  es W;  
 $X_{18}$  se selecciona de A y D;  
 $X_{20}$  es W;  
 $X_{21}$  se selecciona de F e Y;  
 20  $X_{25}$  se selecciona de Q y S;  
 $X_{26}$  se selecciona entre K y S;  
 $X_{28}$  es R; y  
 $X_{29}$  es D;
- 25 en la que la secuencia i) corresponde a la secuencia desde la posición 8 a la posición 36 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-1216; y  
 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 89% de identidad con la secuencia definida en i), siempre que cualquier polipéptido de unión a IL-17A que comprenda una *BM* como se define en ii) sea capaz de unirse a IL-17A de manera que el valor  $K_D$  de la interacción es como máximo  $1 \times 10^{-8}$  M.
- 30 2. Polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia i) corresponde a la secuencia desde la posición 8 a la posición 36 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-66.
- 35 3. Polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la secuencia i) es la secuencia desde la posición 8 a la posición 36 en la SEQ ID NO: 1.
4. Polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende un módulo de unión a IL-17A, *BMod*, definido como:
- 40  $K-[BM]-DPSQS X_aX_bLLX_cEAKKL X_dX_eX_fQ$ ;  
 en el que
- [BM]* es un motivo de unión a IL-17A como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 siempre que  $X_{29}$  sea D;
- 45  $X_a$  se selecciona de A y S;  
 $X_b$  se selecciona de N y E;  
 $X_c$  se selecciona de A, S y C;  
 $X_d$  se selecciona de E, N y S;  
 $X_e$  se selecciona de D, E y S; y  
 50  $X_f$  se selecciona de A y S.
5. Polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho módulo de unión a IL-17A es la secuencia desde la posición 7 a la posición 55 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-1216.
- 55 6. Polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende la secuencia de aminoácidos:  
 $YA-[BMod]-AP$ ;  
 en la que *[BMod]* es un módulo de unión a IL-17A como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4-5.
- 60 7. Polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende la secuencia de aminoácidos definida por:  
 $VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK$ ;  
 en la que *[BM]* es un motivo de unión a IL-17A como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 65

8. Polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha secuencia de aminoácidos se selecciona de la SEQ ID NO: 1-1216.
- 5 9. Polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende la secuencia de aminoácidos definida por:  
AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK;  
en la que [BM] es un motivo de unión a IL-17A como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 10 10. Polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha secuencia de aminoácidos se selecciona de la SEQ ID NO: 1217-1222.
- 15 11. Polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que es capaz de unirse a IL-17A de manera que el valor  $K_D$  de la interacción sea como máximo de  $1 \times 10^{-6}$  M, tal como máximo de  $1 \times 10^{-7}$  M, tal como máximo de  $1 \times 10^{-8}$  M, tal como máximo de  $1 \times 10^{-9}$  M.
- 20 12. Proteína de fusión o conjugado que comprende
- una primera fracción que consiste en un polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con cualquier reivindicación anterior; y
  - una segunda fracción que consiste en un polipéptido que tiene una actividad biológica deseada.
- 25 13. Complejo, que comprende al menos un polipéptido de unión a IL-17A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o al menos una proteína de fusión o conjugado de acuerdo con la reivindicación 12, y al menos un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 30 14. Polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
- 35 15. Composición que comprende un polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado o complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable
- 40 16. Polipéptido, proteína de fusión, conjugado o complejo de unión a IL-17A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o una composición de acuerdo con la reivindicación 15 para uso como medicamento, agente de diagnóstico *in vivo* o agente de pronóstico *in vivo*.
17. Método para determinar *in vitro* la presencia de IL-17A en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de:
- poner en contacto una muestra aislada del sujeto con un polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado o complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o una composición de acuerdo con la reivindicación 15, y
  - obtener un valor correspondiente a la cantidad del polipéptido de unión a IL-17A, proteína de fusión, conjugado, complejo o composición que se ha unido a dicha muestra.

Número Z	SECUENCIA	SEQ ID NO
Z10532	VDAKYAKEADDAAVEIAASLPNLTWDQWYAFIQIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1
Z10508	VDAKYAKEADDAAVEIAAALPNLTWDQWYAFISKIRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	2
Z10863	VDAKYAKEADQAAVEIAIDLPNLTWAQWYAFIQIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	3
Z15167	VDAKYAKEADDAAVEIAASLPNLTWAQWYAFIQIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	4
Z12060	VDAKYAKEADAAAVEIAELPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	5
Z12081	VDAKYAKEADDAALEIAIDLPNLTWDQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	6
Z12634	VDAKYAKEADRAAVEIAIDLPNLTWDQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	7
Z12078	VDAKYAKEADDAAYEIAAYLPNLTWDQWYAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	8
Z12163	VDAKYAKEADQAAVEIAFLPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	9
Z12264	VDAKYAKEADDAAYEIAFLPNLTWDQWYAFIQIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	10
Z10241	VDAKYAKEADDAAVEIAIDLPNLTWDQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	11
Z10462	VDAKYAKEADEAAVEIAIDLPNLTWDQWYAFIQIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	12
Z10534	VDAKYAKEADDAAVEIAIDLPNLTWAQWYAFIQIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	13
Z10566	VDAKYAKEADDAEIAIASLPNLTWDQWYAFIQIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	14
Z10675	VDAKYAKEADDAAVEIAIDLPNLTWDQWYAFIQIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	15
Z10718	VDAKYAKEADDAAVEIAIDLPNLTWDQWYAFIQIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	16
Z12059	VDAKYAKEADDAAYEIAFLPNLTWDQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	17
Z12073	VDAKYAKEADDAAVEIAIDLPNLTWDQWYAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	18
Z12077	VDAKYAKEADLAAVEIAIDLPNLTWDQWYAFIQIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	19
Z12115	VDAKYAKEADDAAYEIAAYLPNLTWDQWYAFIQIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	20
Z12180	VDAKYAKEADDAAVEIAAALPNLTWDQWYAFIQIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	21
Z12211	VDAKYAKEADEAAVEIAIDLPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	22
Z12256	VDAKYAKEADDAAVEIAIDLPNLTWDQWYAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	23
Z12275	VDAKYAKEADDAAVEIAIDLPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	24
Z12283	VDAKYAKEADDAAYEIAFLPNLTWEQWYAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	25
Z12344	VDAKYAKEADDAAVEIAAYLPNLTWDQWYAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	26
Z12481	VDAKYAKEADDAAVEIAIDLPNLTWDQWYAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	27
Z10433	VDAKYAKEADDAAFEIAAALPNLTWDQWYAFIILKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	28

Z10681	VDAKYAKEADEAAVEIAELPNLTDWQWYAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	29
Z10722	VDAKYAKEADDAALEIAELPNLTDWQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	30
Z10859	VDAKYAKEADFAAAVEIAELPNLTDWQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	31
Z12192	VDAKYAKEADDAAVEIADLPNLTDWQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	32
Z12289	VDAKYAKEADDAAYEIAGLPNLTDWQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	33
Z12498	VDAKYAKEADDAAYEIASLPNLTDWQWYAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	34
Z12522	VDAKYAKEADRAAAVEIADLPNLTDWQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	35
Z10210	VDAKYAKEMDYAQWEIWLPLNLTWQGHAFISKLIDDPQSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	36
Z10255	VDAKYAKEADDAAVEIADLPNLTDWQWYAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	37
Z10257	VDAKYAKEADDAAFEIAMLPNLTDWQWYAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	38
Z10459	VDAKYAKEADNAAVEIADLPNLTDWQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	39
Z10465	VDAKYAKEADDAAVEIAELPNLTDWQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	40
Z10470	VDAKYAKEADDAAVEIASLPNLTDWQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	41
Z10483	VDAKYAKEADQAAVEIADLPNLTDWQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	42
Z10529	VDAKYAKEADDAAVEIAMLPNLTDWQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	43
Z10550	VDAKYAKEADNAAVEIADLPNLTDWQWYAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	44
Z10565	VDAKYAKEADEAAVEIADLPNLTDWQWYAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	45
Z10676	VDAKYAKEADDAAVEIADLPNLTDWQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	46
Z10690	VDAKYAKEADDAAVEIAMLPNLTDWQWYAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	47
Z10703	VDAKYAKEADRAAMEIAELPNLTDWQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	48
Z10708	VDAKYAKEADDAAVEIAELPNLTDWQWYAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	49
Z10710	VDAKYAKEADNAAVEIAMLPNLTDWQWYAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	50
Z10728	VDAKYAKEADDAAVEIAALPNLTDWQWYAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	51
Z10745	VDAKYAKEADNAAVEIASLPNLTDWQWYAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	52
Z10756	VDAKYAKEADDAAVEIALLPNLTDWQWYAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	53
Z10759	VDAKYAKEADDAAVEIASLPNLTDWQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	54
Z10775	VDAKYAKEADDAAVEIADLPNLTDWQWYAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	55
Z10778	VDAKYAKEADDAAVEIADLPNLTDWQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	56
Z10779	VDAKYAKEADDAAVEIAALPNLTDWQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	57

Z10800	VDKDYAKEADNAAVEIAIDLPNLTDQWYAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	58
Z10807	VDKDYAKEADEAAVEIAELPNLTDQWYAFI GKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	59
Z10844	VDKDYAKEADNAAMEIADLPNLTDQWFAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	60
Z10857	VDKDYAKEADDAAVEIAALPNLTDQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	61
Z10858	VDKDYAKEADDAAVEIAELPNLTDQWFAFI GKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	62
Z10914	VDKDYAKEADEAAVEIAIDLPNLTDQWFAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	63
Z12212	VDKDYAKEADDAAVEIAALPNLTDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	64
Z12285	VDKDYAKEADNAALEIANLPNLTDQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	65
Z12439	VDKDYAKEADMAAVEIAELPNLTDQWAFI GKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	66
Z10249	VDKDYAKEADEAAVEIAMLPNLTDQWHAFI HKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	67
Z10424	VDKDYAKEADNAAVEIASLPNLTDQWFAFI GKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	68
Z10449	VDKDYAKEADRAAVEIAELPNLTDQWHAFI GKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	69
Z10454	VDKDYAKEADDAAMEIADLPNLTDQWNAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	70
Z10463	VDKDYAKEADNAAVEIAALPNLTDQWSAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	71
Z10485	VDKDYAKEADEAAVEIAELPNLTDQWFAFI GKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	72
Z10505	VDKDYAKEADDAAVEIALPNLTDQWFAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	73
Z10516	VDKDYAKEADDAAVEIADLPNLTDQWNAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	74
Z10531	VDKDYAKEADNAAEIAALPNLTDQWHAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	75
Z10539	VDKDYAKEADNAAMEIADLPNLTDQWHAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	76
Z10540	VDKDYAKEADNAAVEIAALPNLTDQWFAFI HKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	77
Z10556	VDKDYAKEADDAALEIADLPNLTDQWFAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	78
Z10663	VDKDYAKEADQAAVEIADLPNLTDQWYAFIVKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	79
Z10664	VDKDYAKEADDAAVEIATLPNLTDQWSAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	80
Z10668	VDKDYAKEADEAAFEIAALPNLTDQWFAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	81
Z10674	VDKDYAKEADDAAVEIAALPNLTDQWFAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	82
Z10693	VDKDYAKEADDAAVEIADLPNLTDQWFAFI GKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	83
Z10733	VDKDYAKEADDAAVEIADLPNLTDQWHAFI IKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	84
Z10734	VDKDYAKEADDAAFEIAALPNLTDQWFAFI GKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	85
Z10746	VDKDYAKEADEAAFEIADLPNLTDQWFAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	86

Z10748	VDAKYAKEADQAAVEIADLPNLTWDQWFAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	87
Z10757	VDAKYAKEADDAAMEIAELPNLTWAQWSAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	88
Z10774	VDAKYAKEADDAAEI AEI AELPNLTWDQWYAFI GKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	89
Z10780	VDAKYAKEADDAAFEI AALPNLTWDQWSAFI QKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	90
Z10790	VDAKYAKEADEAAMEIAELPNLTWDQWFAFI SKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	91
Z10791	VDAKYAKEADDAAFEIAALPNLTWDQWFAFI SKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	92
Z10793	VDAKYAKEADEAAVEIASLPNLTWDQWHAFI IKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	93
Z10805	VDAKYAKEADRAAAVEIASLPNLTWAQWHAFI QKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	94
Z10868	VDAKYAKEADNAAAVEIAALPNLTWDQWHAFI QKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	95
Z10880	VDAKYAKEADEAAMEIADLPNLTWVQWSAFI SKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	96
Z10881	VDAKYAKEADEAAVEIATLPNLTWDQWFAFI QKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	97
Z10887	VDAKYAKEADDAAVEIAALPNLTWDQWHAFI GKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	98
Z10892	VDAKYAKEADEAAVEIASLPNLTWDQWYAFI RKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	99
Z10893	VDAKYAKEADDAALEIAELPNLTWDQWYAFI VKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	100
Z10896	VDAKYAKEADDAAFEIAALPNLTWDQWFAFI QKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	101
Z10897	VDAKYAKEADDAAVEIADLPNLTWRQWYAFI QKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	102
Z10903	VDAKYAKEADDAAVEIAELPNLTWDQWFAFI RKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	103
Z10912	VDAKYAKEADDAAVEIADLPNLTWAQWYAFI VKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	104
Z10916	VDAKYAKEADDAAMEIADLPNLTWDQWFAFI SKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	105
Z10931	VDAKYAKEADDAAVEIADLPNLTWRQWFAFI QKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	106
Z10932	VDAKYAKEADDAAVEIAALPNLTWHQWNAFI QKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	107
Z10947	VDAKYAKEADQAAVEIAALPNLTWRQWYAFI GKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	108
Z10958	VDAKYAKEADDAAVEIADLPNLTWAQWHAFI QKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	109
Z10960	VDAKYAKEADEAAVEIAALPNLTWHQWHAFI SKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	110
Z10964	VDAKYAKEADQAAVEIADLPNLTTAQWYAFI QKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	111
Z10966	VDAKYAKEADQAAVEIADLPNLTWDQWHAFI IKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	112
Z10970	VDAKYAKEADYAAFEIASLPNLTWDQWFAFI GKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	113
Z10972	VDAKYAKEADDAAFEIAELPNLTWDQWHAFI SKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	114
Z10201	VDAKYAKEYDEAWFEI WALPNLTWDQAVAFI RKLNDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	115

Z10202	VDKDYAKEADEAWFEIWTLPNLTHTAQVAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	116
Z10203	VDKDYAKEMDDAWWEIWSLPNLT YDQYAFIVKLL DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	117
Z10204	VDKDYAKEHDNAWFEIWSLPNLTWDQARAFIVKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	118
Z10205	VDKDYAKEADYAWFEIWMLENTYDQKAFIVKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	119
Z10206	VDKDYAKEWDDAQWEIWL LPNLTWDQGHAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	120
Z10207	VDKDYAKEMADAQWEIWMLENTWAQGNAFISKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	121
Z10209	VDKDYAKEMDDAQWEIWMLENTWHQSHAFIRKLL DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	122
Z10211	VDKDYAKEMAYAQWEIWL LPNLT YDQGHAFIVKLL DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	123
Z10212	VDKDYAKEMDEAWFEIWMLENTYVQVAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	124
Z10213	VDKDYAKEHDYAWFEIWA LPNLTWDQQVAFIHKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	125
Z10214	VDKDYAKEMDEAQWEIWL LPNLTWDQSNAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	126
Z10216	VDKDYAKEWDEAQWEIWL LPNLTWHQONAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	127
Z10217	VDKDYAKEYDYAWFEIWE LPNLTWDQYAFIQKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	128
Z10218	VDKDYAKEADEAWWEIWSLENTIYAQAYAFIQKLL DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	129
Z10219	VDKDYAKEADFAWFEIWMLENTYDQYAFISKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	130
Z10220	VDKDYAKEMDEAQWEIWL LPNLTWHQONAFIRKLL DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	131
Z10221	VDKDYAKEMDDAQWEIWL LPNLTWAQSNAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	132
Z10222	VDKDYAKEMDEAQWEIWTLPNI.TWAQSHAFISKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	133
Z10223	VDKDYAKEADEAWFEIWA LPNLTWDQAVAFIHKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	134
Z10224	VDKDYAKEYDYAWFEIWL LPNLTWVQQTAFIHKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	135
Z10225	VDKDYAKEADYAWFEIWL LPNLTWDQYAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	136
Z10226	VDKDYAKEADEAWWEIWSLENTHTDQGVAFIRKLL DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	137
Z10227	VDKDYAKEMDEAQWEIWL LPNLTWAQSRAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	138
Z10228	VDKDYAKEMDEAWWEIWL LPNLTHTDQGFATISKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	139
Z10229	VDKDYAKEYDYAWFEIWTLPNLTWDQKAFIHKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	140
Z10230	VDKDYAKEMDYAQWEIWL LPNLTWDQGHAFISKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	141
Z10231	VDKDYAKEHDDAWFEIWL LPNLTWDQAYAFIVKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	142
Z10232	VDKDYAKEMGYAQLEIWL LPNLTWHQSNAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	143
Z10233	VDKDYAKEMDEAQWEIWL LPNLTHTDQQTAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	144

Z10234	VDKAYAKEMDYAQWEIWLPLNLTWDDQGNAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	145
Z10235	VDKAYAKEMDEFAQWEIWLPLNLTWDDQSNAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	146
Z10236	VDKAYAKEADYAWWEIWLPLNLTWDDQVAFIQKLLDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	147
Z10237	VDKAYAKEMDYAQWEIWLPLNLTWDDQGHAFIQKLLDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	148
Z10238	VDKAYAKEMDDAQWEIWLPLNLTWDDQSHAFIVKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	149
Z10239	VDKAYAKEYDQAWFEIWLPLNLTWDDQRAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	150
Z10240	VDKAYAKEMDNAQWEIWLPLNLTWDDQGRAFIVKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	151
Z10242	VDKAYAKEHDEAWFEIWLPLNLTWDDQRAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	152
Z10243	VDKAYAKEMDDAQIEIWLPLNLTWDDQGHAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	153
Z10244	VDKAYAKEADYAQWEIWLPLNLTWDDQGTAFIQKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	154
Z10245	VDKAYAKEMDEFAQWEIWLPLNLTWDDQAHAFIQKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	155
Z10246	VDKAYAKEYDEAWFEIWLPLNLTWDDQYAFIVKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	156
Z10247	VDKAYAKEHDYAWFEIWLPLNLTWDDQVAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	157
Z10248	VDKAYAKEMDYAWFEIWLPLNLTWDDQARAFIVKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	158
Z10250	VDKAYAKEMDEAWWEIWLPLNLTWDDQARAFIVKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	159
Z10251	VDKAYAKEMDEAQWEIWLPLNLTWDDQNAFISKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	160
Z10252	VDKAYAKEMDDAQWEIWLPLNLTWDDQGNAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	161
Z10254	VDKAYAKEMDEAQWEIWLPLNLTWDDQNAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	162
Z10256	VDKAYAKEADNAQWEIWLPLNLTWDDQGHAFIQKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	163
Z10258	VDKAYAKEMDEAQWEIWLPLNLTWDDQNAFISKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	164
Z10259	VDKAYAKEMDDAWFEIWLPLNLTWDDQYAFIQKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	165
Z10260	VDKAYAKEMDEFAQWEIWLPLNLTWDDQNAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	166
Z10261	VDKAYAKEHAEAWFEIWLPLNLTWDDQYAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	167
Z10262	VDKAYAKEMDEAQWEIWLPLNLTWDDQGHAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	168
Z10263	VDKAYAKEMDYAQWEIWLPLNLTWDDQGHAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	169
Z10265	VDKAYAKEMDDAQWEIWLPLNLTWDDQGNAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	170
Z10266	VDKAYAKEHDQAWFEIWLPLNLTWDDQVAFIVKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	171
Z10267	VDKAYAKEADEAWWEIWLPLNLTWDDQYAFIVKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	172
Z10268	VDKAYAKEMDYAWFEIWLPLNLTWDDQYAFISKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	173

Z10269	VDKAYAKEADFAWWEIWSLPLNLTHHQAKAFIVKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	174
Z10270	VDKAYAKEMDYAQWEIWMPLPNLTWDQSHAFIQKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	175
Z10271	VDKAYAKEMDDAQWEIWMPLPNLTHDQKAFIQKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	176
Z10272	VDKAYAKEADEAWFEIWMPLPNLTYAQVAFIRKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	177
Z10273	VDKAYAKEMDEAQWEIWLPLPNLTYAQSAFIQKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	178
Z10274	VDKAYAKEMDFAQWEIWLPLNLTWDDQSHAFIQKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	179
Z10275	VDKAYAKEMDDAWWEIWAIPNLTYDQYAFIAKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	180
Z10276	VDKAYAKEMDEAQWEIWMPLPNLTWDQSHAFIQKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	181
Z10277	VDKAYAKEHDYAWFEIWLPLNLTYDQSHAFIVKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	182
Z10278	VDKAYAKEMDYAWWEIWLPLNLTHDQAKAFIQKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	183
Z10279	VDKAYAKEADEAQWEIWTPLPNLTWDQGHAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	184
Z10280	VDKAYAKEMDYAQWEIWLPLNLTHAQQNAFIQKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	185
Z10282	VDKAYAKEADYAWWEIWLPLNLTHAQQTAFIHKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	186
Z10292	VDKAYAKEMDYAQWEIWMPLPNLTHAQSRAFIQKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	187
Z10336	VDKAYAKEYDYAWFEIWAIPNLTHHQVAFIRKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	188
Z10341	VDKAYAKEMDDAWWEIWLPLNLTHDQRAFIOKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	189
Z10343	VDKAYAKEMDNAAWWEIWTPLPNLTHAQARAFIVKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	190
Z10344	VDKAYAKEMDFAQWEIWLPLNLTHHQNAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	191
Z10361	VDKAYAKEADQAWWEIWAIPNLTHDQAVAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	192
Z10366	VDKAYAKEYDYAWFEIWAIPNLTRAQATAFISKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	193
Z10367	VDKAYAKEADYAWFEIWSLPLNLTYAQVAFIRKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	194
Z10369	VDKAYAKEAGYAWFEIWSLPLNLTHRQVAFIRKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	195
Z10375	VDKAYAKEHGDWFEIWLPLNLTWDDQRAFIVKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	196
Z10376	VDKAYAKEADEAWFEIWAIPNLTHDQKAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	197
Z10377	VDKAYAKEADYAWWEIWLPLNLTHDQARAFISKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	198
Z10379	VDKAYAKEADEAWWEIWAIPNLTHAQVAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	199
Z10380	VDKAYAKEADYAWFEIWSLPLNLTWDSRAFIGKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	200
Z10385	VDKAYAKEMDFAWFEIWAIPNLTHVQVAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	201
Z10387	VDKAYAKEADEAWFEIWAIPNLTYDQSKAFIRKLIIDDPSSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	202

Z10389	VDAKYAKEADYAWFEIWAIPNLTHAQQYAFIQKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	203
Z10390	VDAKYAKEIYAWMEIWTLPNLTWDQARAFIVKLLDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	204
Z10391	VDAKYAKEYDFAWFEIWAIPNLTHDQCKAFISKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	205
Z10401	VDAKYAKEADYAWWEIWSLPNLTHAQAYAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	206
Z10402	VDAKYAKEADYAWWEIWAIPNLTHAQAVAFIQKLLDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	207
Z10404	VDAKYAKEMDYAWWEIWLIPNLTHDQQVAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	208
Z10409	VDAKYAKEWDYAWWEIWAIPNLTHDQARAFI IKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	209
Z10410	VDAKYAKEMDFAWWEIWSLPNLTHAQARAFIVKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	210
Z10415	VDAKYAKEADYAWWEIWAIPNLTHAQQVAFISKLLDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	211
Z10417	VDAKYAKEADYAWWEIWSLPNLTHAQAKAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	212
Z10420	VDAKYAKEHDYAWFEIWMIPNLTHAQQVAFIHKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	213
Z10422	VDAKYAKEMDYAWFEIWDIPNLTYDQAVAFIHKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	214
Z10423	VDAKYAKEYD YAWFEIWAIPNLTHAQQVAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	215
Z10426	VDAKYAKEYD YAWFEIWLIPNLTYDQQRAFIVKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	216
Z10428	VDAKYAKEHDYAWFEIWSLPNLTWDDQVAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	217
Z10430	VDAKYAKEYDEAWWEIWLIPNLTHDQAYAFIHKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	218
Z10431	VDAKYAKEMDYAQWEIWLIPNLTWAGSNAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	219
Z10434	VDAKYAKEADYAWFEIWDIPNLTYDQQYAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	220
Z10435	VDAKYAKEMDYAWFEIWAIPNLTHDQAVAFIQKLLDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	221
Z10438	VDAKYAKEADYAWFEIWAIPNLTHAQQTAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	222
Z10440	VDAKYAKEADYAQWEIWLIPNLTWDDQHAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	223
Z10441	VDAKYAKEMDYAWFEIWLIPNLTYDQQHAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	224
Z10442	VDAKYAKEMDEAQWEIWLIPNLTWVQGNAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	225
Z10443	VDAKYAKEYD NAWFEIWLIPNLTHDQQRAFIVKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	226
Z10444	VDAKYAKEMDEAQWEIWMIPNLTYDQGHAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	227
Z10445	VDAKYAKEMDFAQLEIWTIPNLTWAGGHAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	228
Z10446	VDAKYAKEHDYAWFEIWLIPNLTWDDQGF IHKLNDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	229
Z10447	VDAKYAKEMDQAWWEIWLIPNLTHQSHAFISKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	230
Z10450	VDAKYAKEADYAWFEIWAIPNLTHDQARAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	231

Z10451	VDKAKEMDDAQWEIWLLENLTLTWDQOQAFIVKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	232
Z10452	VDKAKAYEYDDAWFEIWLIPNLTLTWDQOYAFIHKLNDDPSQSELLSEAKKLNDSQAPK	233
Z10453	VDKAKAYEMDEAWWEIWLIPNLTYAQYAFIQKLLDDPSQSELLSEAKKLNDSQAPK	234
Z10455	VDKAKAYEADYAWFEIWSLLENLTHAQYAFIVKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	235
Z10456	VDKAKAYEMDDAQWEIWMIPNLTLTWDQSHAFIAKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	236
Z10457	VDKAKAYEMDYAQWEIWMIPNLTLTWDQSNAFIRKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	237
Z10458	VDKAKAYEADYAWFEIWALENLTHDQARAFIVKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	238
Z10460	VDKAKAYEADYAWWEIWLIPNLTLTWDQOQRAFIKLNDDPSQSELLSEAKKLNDSQAPK	239
Z10461	VDKAKAYEADYAWWEIWLIPNLTYDQGTAFIRKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	240
Z10464	VDKAKAYEMDEAQWEIWLIPNLTLTWDQOQHAFIQKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	241
Z10467	VDKAKAYEYDEAWFEIWLIPNLTHDQARAFIKNDDPSQSELLSEAKKLNDSQAPK	242
Z10469	VDKAKAYEMDRAQWEIWLIPNLTLTWHQONAFIRKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	243
Z10472	VDKAKAYEADYAWWEIWLIPNLTLTWDQOQRAFIKLNDDPSQSELLSEAKKLNDSQAPK	244
Z10474	VDKAKAYEMDQAQWEIWMIPNLTLTWDQGHAFIRKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	245
Z10475	VDKAKAYEADYAWFEIWMIPNLTLTWDQOQRAFIGLIKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	246
Z10476	VDKAKAYEADYAWFEIWMIPNLTYDQOQRAFIKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	247
Z10477	VDKAKAYEMDRAQWEIWLIPNLTLTWAQSNAFIRKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	248
Z10478	VDKAKAYEADYAWFEIWMIPNLTLTWDQOQVAFIRKLNDDPSQSELLSEAKKLNDSQAPK	249
Z10480	VDKAKAYEMDNAQWEIWLIPNLTLTWDQOQNAFIRKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	250
Z10481	VDKAKAYEADYAWFEIWALENLTYAQGRAFIKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	251
Z10482	VDKAKAYEADYAWFEIWLIPNLTLTWDQOQTAFIKLNDDPSQSELLSEAKKLNDSQAPK	252
Z10487	VDKAKAYEMDDAQWEIWLIPNLTLTWDQOQHAFIQKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	253
Z10488	VDKAKAYEMNEAQWEIWLIPNLTLTWDQGHAFIAKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	254
Z10489	VDKAKAYEMDDAQWEIWMIPNLTLTWDQOQHAFIRKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	255
Z10490	VDKAKAYEMDYAQWEIWLIPNLTLTWHQGHAFIQKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	256
Z10491	VDKAKAYEYDYAWFEIWLIPNLTYAQOQRAFIKLNDDPSQSELLSEAKKLNDSQAPK	257
Z10493	VDKAKAYEMDQAQWEIWLIPNLTYDQOYAFIQKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	258
Z10494	VDKAKAYEMDNAQWEIWMIPNLTLTWDQSHAFIVKLIIDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	259
Z10495	VDKAKAYEMDYAWFEIWSLLENLTHAQAVAFIRKLNDDPSQSELLSEAKKLNDSQAPK	260

Z10496	VDAKYAKEADYAWFEIWAIPNLTYAQAVAFIRKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	261
Z10498	VDAKYAKEMDDAQWEIWLLPNLTHWQNAFIAKLIDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	262
Z10499	VDAKYAKEHDYAWFEIWMPLNLTWDQQTAFIHKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	263
Z10500	VDAKYAKEAADAWFEIWLPLNLTHAQVAFIRKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	264
Z10501	VDAKYAKEYDYAWFEIWMPLNLTTHAQAFIQLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	265
Z10502	VDAKYAKEYDEAWFEIWAIPNLTWQQRAFIVKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	266
Z10503	VDAKYAKEMDDAWFEIWMPLNLTHDQAYAFIQKLIDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	267
Z10504	VDAKYAKEMGEAQLEIWMPLNLTWDQGNFIRKLIIDDPSSSELLSEAKKLNDSQAPK	268
Z10506	VDAKYAKEMDDAQWEIWLLPNLTYDQGTAFIRKLIIDDPSSSELLSEAKKLNDSQAPK	269
Z10507	VDAKYAKEAGEAWFEIWLPLNLTQYAFIRKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	270
Z10509	VDAKYAKEYDDAWFEIWLPLNLTHAQAKAFIHKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	271
Z10511	VDAKYAKEADYAWFEIWMPLNLTHDQAYAFIQKLNDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	272
Z10512	VDAKYAKEMDYAWFEIWLPLNLTQYAFIQKLIDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	273
Z10513	VDAKYAKEYDYAWFEIWLPLNLTHDQYAFIRKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	274
Z10514	VDAKYAKEYDYAWFEIWLPLNLTHAQASAFIVKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	275
Z10515	VDAKYAKEMGDAQWEIWLLPNLTHWQNAFIAKLIDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	276
Z10517	VDAKYAKEADFAWFEIWLPLNLTHDQRAFIVKLLDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	277
Z10518	VDAKYAKEHDYAWFEIWAIPNLTWQAVAFIHKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	278
Z10519	VDAKYAKEHDNAWFEIWLPLNLTQYAFIHKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	279
Z10520	VDAKYAKEMDEAQWEIWLLPNLTHDQSRAFIQKLIDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	280
Z10521	VDAKYAKEADEAWFEIWAIPNLTHAQAVAFIRKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	281
Z10522	VDAKYAKEMDYAQWEIWSLPLNLTWQGNFIRKLIIDDPSSSELLSEAKKLNDSQAPK	282
Z10523	VDAKYAKEAAEAQLEIWLPLNLTWDQGHAFI IKLIDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	283
Z10524	VDAKYAKEMAYAQWEIWLPLNLTHWQNAFIRKLIIDDPSSSELLSEAKKLNDSQAPK	284
Z10525	VDAKYAKEMDNAQWEIWMPLNLTHWQHAFIQKLIDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	285
Z10526	VDAKYAKEYDQAWFEIWLPLNLTWQAYAFIQKLNDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	286
Z10527	VDAKYAKEWDYAWFEIWEIPLNLTWQARAFI IKNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	287
Z10528	VDAKYAKEADYAWFEIWSLPLNLTWQQRAFIHKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	288
Z10530	VDAKYAKEADFAQWEIWLPLNLTWQCHAFIQKLIDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	289

Z10535	VDKAYAKEYDEAWFEIWLPLNLTYYDQQRAFIIVKLNDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	290
Z10536	VDKAYAKEMDDAQWEIWMPLNLTWDQGHAFIRKLLDDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	291
Z10537	VDKAYAKEMDEAWWEIWLPLNLTYYDQYAFIAKLLDDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	292
Z10541	VDKAYAKEADDAQWEIWLPLNLTWDQSHAFIQKLIIDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	293
Z10542	VDKAYAKEMDDAWFEIWLPLNLTYYDQYAFIQKLIIDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	294
Z10543	VDKAYAKEMDEAQWEIWMPLNLTWAQSHAFIQKLIIDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	295
Z10544	VDKAYAKEYDFAWFEIWLPLNLTWAQQRAFISKLNDDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	296
Z10545	VDKAYAKEHANAWFEIWLPLNLTYYDQYAFIRKLNDDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	297
Z10546	VDKAYAKEYDNAWFEIWLPLNLTYYDQATAFIHKLNDDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	298
Z10547	VDKAYAKEWDEAWFEIWLPLNLTWAQARAFIQKLIIDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	299
Z10548	VDKAYAKEYDFAWFEIWLPLNLTYYDQAVAFIRKLNDDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	300
Z10549	VDKAYAKEADYAWFEIWLPLNLTWAQQRAFIIVKLNDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	301
Z10551	VDKAYAKEADYAWWEIWLPLNLTYYDQQRAFIVKLNDDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	302
Z10553	VDKAYAKEHDYAWFEIWLPLNLTWDQKQAFIAKLNDDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	303
Z10554	VDKAYAKEADYAWFEIWMPLNLTYYDQAVAFIIVKLNDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	304
Z10555	VDKAYAKEMDFAQWEIWLPLNLTWDQSHAFISKLIIDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	305
Z10557	VDKAYAKEMGEAQIWIWLPLNLTYYDQGHAFIQKLIIDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	306
Z10558	VDKAYAKEADYAWFEIWLPLNLTYYDQARAFIQKLIIDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	307
Z10560	VDKAYAKEADYAWWEIWSLPLNLTWAQARAFIVKLIIDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	308
Z10561	VDKAYAKEYDQAWFEIWLPLNLTWDQAKAFIIVKLNDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	309
Z10564	VDKAYAKEADEAWWEIWLPLNLTWDQGHAFIRKLIIDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	310
Z10567	VDKAYAKEMDYAQWEIWMPLNLTWDQGHAFIRKLIIDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	311
Z10568	VDKAYAKEYDFAQWEIWLPLNLTWDQSHAFIQKLIIDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	312
Z10569	VDKAYAKEADYAWFEIWLPLNLTWDQQTAFISKLNDDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	313
Z10570	VDKAYAKEMDYAQWEIWLPLNLTWHQSNAFIRKLIIDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	314
Z10571	VDKAYAKEHAEAWFEIWLPLNLTWDQARAFIVKLNDDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	315
Z10572	VDKAYAKEADYAWFEIWLPLNLTYYDQGFARIRKLIIDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	316
Z10573	VDKAYAKEYDNAWFEIWMPLNLTWAQAVAFIRKLNDDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	317
Z10576	VDKAYAKEADFAWWEIWLPLNLTWDQQRAFIVKLIIDPQSSELLSEAKKLNDSQAPK	318

Z10587	VDKDYAKEADFAMFEI WALPNLTHDQAVAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	319
Z10588	VDKDYAKEHDYAWFEI WMLPNLTYDQAHAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	320
Z10589	VDKDYAKEADEAWWEI WLLPNLTYDQAHAFIVKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	321
Z10590	VDKDYAKEMDYAWWEI WLLPNLTHDQAYAFIVKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	322
Z10592	VDKDYAKELYAWFEI WTLPNLTYDQAVAFIRKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	323
Z10593	VDKDYAKEYDDAWFEI WTLPNLTRDQQTAFI IKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	324
Z10594	VDKDYAKEMDEAWFEI WSLPNLTYAQYAFIVKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	325
Z10596	VDKDYAKEADYAWFEI WSLPNLTHVQQVAFIRKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	326
Z10599	VDKDYAKEADEAWFEI WSLPNLTHAQARAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	327
Z10603	VDKDYAKEYDEAWFEI WMLPNLTRDQASAFI IKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	328
Z10605	VDKDYAKEHADAWFEI WSLPNLTHVQARAFI IKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	329
Z10606	VDKDYAKEADFAWWEI WLLPNLTHAQQTAFIRKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	330
Z10610	VDKDYAKEADYAWFEI WSLPNLTHAQATAFISKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	331
Z10611	VDKDYAKEYDYAWFEI WELPNLTDWQQTAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	332
Z10612	VDKDYAKEADYAWWEI WLLPNLTHDQATAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	333
Z10613	VDKDYAKEADYAWWEI WSLPNLTHDQQVAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	334
Z10614	VDKDYAKEADFAWWEI WSLPNLTHVQQVAFIRKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	335
Z10615	VDKDYAKEADYAWFEI WALPNLTHAQQVAFIAKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	336
Z10620	VDKDYAKEADYAWFEI WALPNLTHAQAVAFIGKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	337
Z10623	VDKDYAKEADFAWFEI WSLPNLTHDQARAFISKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	338
Z10624	VDKDYAKEMDEAQWEI WLLPNLTHHQANAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	339
Z10625	VDKDYAKEADYAWFEI WALPNLTDQAHAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	340
Z10628	VDKDYAKEADQAWWEI WLLPNLTHDQQVAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	341
Z10632	VDKDYAKEADEAWWEI WSLPNLTHDQAKAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	342
Z10633	VDKDYAKEHGYAWFEI WALPNLTHDQAKAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	343
Z10634	VDKDYAKEADYAWWEI WSLPNLTHVQQVAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	344
Z10636	VDKDYAKEYDEAWFEI WMLPNLTYDQGRAFIGKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	345
Z10637	VDKDYAKEADFAWWEI WALPNLTHVQAVAFIRKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	346
Z10639	VDKDYAKEADDAWFEI WALPNLTHAQAVAFIQKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	347

Z10640	VDKAYAKEADQAWWEI WALPNLTHDQGVAFIRKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	348
Z10641	VDKAYAKEYDEAWFEI WLLPNLNTADQARAFIVKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	349
Z10644	VDKAYAKEADYAWWEI WALPNLTYDQQYAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	350
Z10645	VDKAYAKEADDAWWEI WMLPNLTHDQARAFIQKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	351
Z10646	VDKAYAKEADEAWWEI WALPNLTHRQQVAFIQKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	352
Z10647	VDKAYAKEADFAWFEI WALPNLTHDQATAFIVKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	353
Z10651	VDKAYAKEMDDAWWEI WALPNLTHAQAVAFIRKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	354
Z10653	VDKAYAKEADEAWWEI WALPNLTHHQAVAFIHKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	355
Z10654	VDKAYAKEADYAWWEI WTLPNLTHDQQYAFIQKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	356
Z10655	VDKAYAKEMDFAQWEI WLLPNLTHWQSNAFIRKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	357
Z10657	VDKAYAKEWDEAWFEI WSLPNLTYDQGRAFI I KLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	358
Z10658	VDKAYAKEADEAQWEI WLLPNLTHDQSNAFIRKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	359
Z10659	VDKAYAKEADYAWWEI WALPNLTHAQQKAFIRKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	360
Z10660	VDKAYAKEMDEAQWEI WMLPNLTHDQSHAFIAKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	361
Z10661	VDKAYAKEADYAWWEI WSLPNLTHDQQVAFIRKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	362
Z10662	VDKAYAKEMDDAWWEI WLLPNLTYDQQYAFIQKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	363
Z10665	VDKAYAKEMDDAQWEI WLLPNLTHWVQQNAFIRKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	364
Z10666	VDKAYAKEMDEAQWEI WLLPNLTHWQQNAFIRKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	365
Z10667	VDKAYAKEHDYAWFEI WALPNLTHAQAVAFI I KLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	366
Z10669	VDKAYAKEADFAWWEI WLLPNLTYDQQHAFIVKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	367
Z10670	VDKAYAKEMLDAQWEI WMLPNLTHDQGHAFIVKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	368
Z10671	VDKAYAKEMDNWFEI WTLPNLTYAQHAFIVKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	369
Z10672	VDKAYAKEADYAWFEI WTLPNLTYDQQKAFIQKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	370
Z10677	VDKAYAKEMDEAQIEI WLLPNLTHWQGNAFIRKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	371
Z10678	VDKAYAKEMDNAQWEI WLLPNLTYDQSHAFIAKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	372
Z10679	VDKAYAKEADFAWFEI WSLPNLTHDQAVAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	373
Z10683	VDKAYAKEMDYAQWEI WMLPNLTHDQGHAFIQKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	374
Z10685	VDKAYAKEADYAWFEI WMLPNLTHDQQTAFISKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	375
Z10687	VDKAYAKEMDYAQWEI WLLPNLTHAQGTAFIRKLLDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	376

Z10689	VDAKYAKEMDYAWFEIWLPLENLTYDQAHAFI IKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	377
Z10691	VDAKYAKEMDEAWWEIWLPLENLTYDQAHAFIVKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	378
Z10696	VDAKYAKEADQAWWEIWLPLENLTHDQAVAFIRKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	379
Z10697	VDAKYAKEADEAWWEIWLPLENLTHDQAKAFI IKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	380
Z10698	VDAKYAKEAAEAWFEIWLPLENLTYDQAVAFIHKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	381
Z10699	VDAKYAKEADYAWFEIWLPLENLTHVQRAFIOKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	382
Z10700	VDAKYAKEMDQAWFEIWLPLENLTHWQARAFIVKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	383
Z10701	VDAKYAKEHDEAWFEIWSLPLENLTYDQRAFIIKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	384
Z10702	VDAKYAKEYDEAWFEIWLPLENLTYDQAVAFISKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	385
Z10704	VDAKYAKEHDQAWFEIWLPLENLTYAQARAFISKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	386
Z10705	VDAKYAKEMDFAQWEIWLPLENLTHQSNAFIOKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	387
Z10706	VDAKYAKEMDFAQWEIWLPLENLTHDQSNAFIOKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	388
Z10707	VDAKYAKEMDNAQWEIWLPLENLTHWQSNAFIRKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	389
Z10709	VDAKYAKEADYAWFEIWLPLENLTYDQAFAFIOKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	390
Z10711	VDAKYAKEMDYAQWEIWLPLENLTHVQSHAFIOKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	391
Z10713	VDAKYAKEADFAWWEIWLPLENLTHVQAKAFIOKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	392
Z10715	VDAKYAKEMDYAQWEIWLPLENLTHDQSHAFIVKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	393
Z10716	VDAKYAKEADFAWWEIWLPLENLTHDQAVAFIVKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	394
Z10717	VDAKYAKEMDNAQWEIWLPLENLTYAQAHAFIOKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	395
Z10719	VDAKYAKEADYAWWEIWSLPLENLTHVQARAFI IKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	396
Z10720	VDAKYAKEHDEAWFEIWLPLENLTHAQARAFISKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	397
Z10724	VDAKYAKEADYAWFEIWLPLENLTYDQYAFIOKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	398
Z10725	VDAKYAKEMDRAQWEIWLPLENLTYDQSHAFIOKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	399
Z10726	VDAKYAKEMDEAWWEIWLPLENLTYDQYAFIAKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	400
Z10727	VDAKYAKEYDYAWFEIWLPLENLTHWQYAFIHKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	401
Z10735	VDAKYAKEADFAWFEIWSLPLENLTHDQARAFI IKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	402
Z10736	VDAKYAKEADFAWFEIWLPLENLTHDQKAFIHKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	403
Z10737	VDAKYAKEYDQAWFEIWLPLENLTHWQYAFIOKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	404
Z10738	VDAKYAKEMDDAQWEIWLPLENLTHDQAHAFIAKLLDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	405

Z10739	VDKAYAKEMDEAQWEIWLPLNLTWQGHAFIQKLLDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	406
Z10741	VDKAYAKEADYAWFEIWMPLNLTHDQQYAFIHKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	407
Z10742	VDKAYAKEADYAWFEIWLPLNLTHVQQVAFIHKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	408
Z10747	VDKAYAKEADYAWFEIWLPLNLTHAQVAFIRKLLDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	409
Z10749	VDKAYAKEMGQAQLEIWMPLNLTWQGHAFIQKLLDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	410
Z10750	VDKAYAKEMDEAQWEIWLPLNLTHQSHAFISKLIDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	411
Z10751	VDKAYAKEMDYAQWEIWLPLNLTHHQHAFIVKLLDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	412
Z10755	VDKAYAKEADEAQWEIWLPLNLTWQSNAFIRKLLDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	413
Z10758	VDKAYAKEYDYAWFEIWLPLNLTRDQRAFIIKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	414
Z10761	VDKAYAKEHAEAWFEIWLPLNLTWQARAFIVKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	415
Z10762	VDKAYAKEADYAWFEIWLPLNLTYHQVAFIHKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	416
Z10764	VDKAYAKEYDFAWFEIWLPLNLTWQVAFISKLNDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	417
Z10765	VDKAYAKEMDEAQWEIWLPLNLTWQSNAFIRKLLDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	418
Z10767	VDKAYAKEMDEAQIEIWLPLNLTHAQGHAFIQKLLDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	419
Z10768	VDKAYAKEADYAWFEIWLPLNLTYHQYAFIQKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	420
Z10769	VDKAYAKEMDEAQWEIWLPLNLTWQONAFIRKLLDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	421
Z10770	VDKAYAKEYDQAWFEIWLPLNLTYAQVAFIRKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	422
Z10777	VDKAYAKEMGEAQLEIWLPLNLTHQONAFIRKLLDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	423
Z10782	VDKAYAKEMDYAQWEIWLPLNLTYDQGHAFIVKLLDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	424
Z10786	VDKAYAKEMDEAWFEIWLPLNLTYAQGRAFIVKLLDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	425
Z10787	VDKAYAKEMDEANWEIWLPLNLTYDQYAFISKLIDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	426
Z10794	VDKAYAKEYDYAWFEIWMPLNLTYDQVAFISKLNDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	427
Z10796	VDKAYAKEMDEAQWEIWMPLNLTWQONAFIRKLLDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	428
Z10797	VDKAYAKEMDFAQWEIWMPLNLTWQSHAFIQKLLDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	429
Z10798	VDKAYAKEYDYAWFEIWLPLNLTYDQGHAFIVKLNDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	430
Z10802	VDKAYAKEADEFAWFEIWLPLNLTHDQARAFIVKLLDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	431
Z10804	VDKAYAKEADYAWFEIWLPLNLTYDQATAFISKLNDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	432
Z10806	VDKAYAKEMDYAQWEIWLPLNLTHDQGRAFIQKLLDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	433
Z10808	VDKAYAKEMDEAQWEIWLPLNLTWQGNAFISKLIDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	434

Z10809	VDKYAKEADYAWWEIWSLPNLTHTAQAYAFIVKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	435
Z10810	VDKYAKEYDNEWFEIWA LPNLTYAQAYAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	436
Z10812	VDKYAKEMDEAQWEIWM LPNLTYAQSHAFIVKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	437
Z10813	VDKYAKEADYAWFEIWM LPNLTTRDQATAFI IKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	438
Z10814	VDKYAKEADYAWFEIWA LPNLTWHQATAFI IKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	439
Z10815	VDKYAKEADYAWFEIWA LPNLTWQQRAFISKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	440
Z10816	VDKYAKEADYAWWEIWT LPNLTVDQSRAFIVKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	441
Z10817	VDKYAKEADYAWFEIWE LPNLTVDQAVAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	442
Z10818	VDKYAKEMDEAQWEIWL LPNLTVDQGRAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	443
Z10819	VDKYAKEMDNAQWEIWL LPNLTWHQSNAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	444
Z10821	VDKYAKEMDDAQWEIWL LPNLTWQQSNAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	445
Z10822	VDKYAKEMDEAQWEIWL LPNLTWHQQHAFIVKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	446
Z10823	VDKYAKEHGYAWFEIWA LPNLTWQQVAFI IKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	447
Z10824	VDKYAKEMDYAQWEIWL LPNLTWQSNAFIAKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	448
Z10825	VDKYAKEMDEAQWEIWM LPNLTWHQSHAFIVKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	449
Z10826	VDKYAKEMDFAQWEIWL LPNLTWVQSNAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	450
Z10827	VDKYAKEMDNAQWEIWL LPNLTVDQGNAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	451
Z10830	VDKYAKEYDYAWFEIWL LPNLTWQATAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	452
Z10831	VDKYAKEMDYAQWEIWL LPNLTVDQGHAFI IKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	453
Z10832	VDKYAKEMDQAQWEIWL LPNLTWQQRAFIVKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	454
Z10833	VDKYAKEMDEAQWEIWL LPNLTWHQSHAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	455
Z10834	VDKYAKEYDQAWFEIWL LPNLTWQAVAFI IKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	456
Z10835	VDKYAKEMGDAQWEIWL LPNLTWQQNAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	457
Z10836	VDKYAKEMDEAQWEIWL LPNLTWAGHAFISKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	458
Z10837	VDKYAKEMDDAQWEIWT LPNLTWHQQNAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	459
Z10838	VDKYAKEADDAWWEIWA LPNLTWQQARAFIVKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	460
Z10840	VDKYAKEMDFAQWEIWL LPNLTWQQHAFISKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	461
Z10842	VDKYAKEMDFAWFEIWA LPNLTVDQVAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	462
Z10843	VDKYAKEWDEAWFEIWA LPNLTVDQAVAFIHKLNDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	463

Z10846	VDAKYAKEMDNAQWEIWLPLNLTWDDQSHAFIVKLLDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	464
Z10847	VDAKYAKEYDDAWFEIWLPLNLTWYVQQYAFIRKLNDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	465
Z10848	VDAKYAKEHAEAWFEIWSLPLNLTWDDQVAFVFKLNDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	466
Z10849	VDAKYAKEMGEAQWEIWLPLNLTWYDQSHAFIVKLLDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	467
Z10850	VDAKYAKEHDYAWFEIWLPLNLTWDDQARAFVHKLNDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	468
Z10851	VDAKYAKEADYAWFEIWLPLNLTWDDQARAFVHKLNDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	469
Z10854	VDAKYAKEADYAWFEIWSLPLNLTWYHQRARAFVQKLLDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	470
Z10855	VDAKYAKEADYAWFEIWLPLNLTWYDQAVAFVFKLNDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	471
Z10856	VDAKYAKEMDRAQLEIWLPLNLTWYDQAVAFVFKLNDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	472
Z10860	VDAKYAKEMNAQWEIWLPLNLTWYHQRARAFVQKLLDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	473
Z10862	VDAKYAKEHAEAWFEIWLPLNLTWYRQARAFVHKLNDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	474
Z10864	VDAKYAKEMDQAQWEIWLPLNLTWYDQSHAFIVKLLDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	475
Z10871	VDAKYAKEMDEAQWEIWLPLNLTWYHQRARAFVQKLLDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	476
Z10873	VDAKYAKEMDEAQWEIWLPLNLTWYHQRARAFVQKLLDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	477
Z10874	VDAKYAKEMDEAWFEIWLPLNLTWYDQARAFVHKLNDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	478
Z10876	VDAKYAKEYDYAWFEIWLPLNLTWYHQRARAFVHKLNDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	479
Z10884	VDAKYAKEHAEAWFEIWLPLNLTWYDQARAFVHKLNDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	480
Z10885	VDAKYAKEMDDAQWEIWLPLNLTWYDQSHAFVAKLLDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	481
Z10888	VDAKYAKEYDEAWFEIWLPLNLTWYHQRARAFVHKLNDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	482
Z10890	VDAKYAKEYDFAWFEIWLPLNLTWYDQARAFVHKLNDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	483
Z10894	VDAKYAKEMDEAQWEIWLPLNLTWYHQRARAFVHKLNDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	484
Z10898	VDAKYAKEHDFAWFEIWLPLNLTWYDQVAFVHKLNDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	485
Z10902	VDAKYAKEMDEAQWEIWLPLNLTWYDQSHAFVQKLLDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	486
Z10907	VDAKYAKEMGRAQIEIWLPLNLTWYDQGNARAFVHKLNDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	487
Z10917	VDAKYAKEMDDAQWEIWLPLNLTWYHQRARAFVQKLLDDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	488
Z10919	VDAKYAKEADYAWFEIWLPLNLTWYDQYAFVHKLNDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	489
Z10920	VDAKYAKEADYAWFEIWLPLNLTWYDQAKAFVHKLNDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	490
Z10925	VDAKYAKEMDEAQWEIWLPLNLTWYHQRARAFVHKLNDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	491
Z10927	VDAKYAKEMDYAQWEIWLPLNLTWYDQGNARAFVHKLNDPSSQSELLSEAKKLNDSQAPK	492

Z10935	VDAKYAKEADYAWWEIWPALPNLTHDQAVAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	493
Z10938	VDAKYAKEADYAWFEIWPALPNLTHRQQVAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	494
Z10942	VDAKYAKEMDQAQWEIWLPLNLTWHQCHAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	495
Z10945	VDAKYAKEMNEAQLEIWLPLNLTWAQCHAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	496
Z10952	VDAKYAKEADEAWWEIWPALPNLTHHQAVAFIRKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	497
Z10954	VDAKYAKEYDYAWFEIWLPLNLTYSQARAFI IKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	498
Z10961	VDAKYAKEMGEAQWEIWLPLNLTWDQCHAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	499
Z10962	VDAKYAKEYDYAWFEIWLPLNLTADQRAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	500
Z10963	VDAKYAKEHDEAWFEIWLPLNLTWDQAVAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	501
Z10971	VDAKYAKEYDDAWFEIWLPLNLTWAQRAFISKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	502
Z10973	VDAKYAKEYDEAWFEIWLPLNLTDRDQKAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	503
Z10979	VDAKYAKEYDDAWFEIWLPLNLTQAARAFIVKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	504
Z10986	VDAKYAKEHAEAWFEIWLPLNLTYSQAVAFISKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	505
Z10988	VDAKYAKEADYAWFEIWMPLNLTDRDQAVAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	506
Z10990	VDAKYAKEMDEAQWEIWLPLNLTWHQKAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	507
Z10992	VDAKYAKEADYAWFEIWMPLNLTYSQARAFIVKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	508
Z11015	VDAKYAKEMDEAQWEIWLPLNLTQAARAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	509
Z11017	VDAKYAKEMDYAQWEIWLPLNLTWHQSNAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	510
Z11021	VDAKYAKEMDEAQWEIWLPLNLTYSQARAFIVKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	511
Z11027	VDAKYAKEMDYAQWEIWLPLNLTWDQSRAFIVKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	512
Z11030	VDAKYAKEMDQAQWEIWLPLNLTYSQARAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	513
Z11045	VDAKYAKEMDYAQWEIWLPLNLTWDQSRAFISKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	514
Z11052	VDAKYAKEMDEAQWEIWMPLNLTQAARAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	515
Z11063	VDAKYAKEMDEAWWEIWTLPNLTYSQARAFIVKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	516
Z11069	VDAKYAKEMDQAQWEIWLPLNLTWDQSRAFIQKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	517
Z11085	VDAKYAKEADYAWFEIWTLPNLTDRDQARAFIRKLNDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	518
Z11086	VDAKYAKEMDQAQWEIWLPLNLTWDQSRAFIVKLI DDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	519
Z12058	VDAKYAKEADDAAYEIAFLPNLTWDQWYAFIQKLRDDEPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	520
Z12061	VDAKYAKEADLAAYEIAELPNLTWDQWYAFIQKLRDDEPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	521

Z12062	VDAKYAKEADDAALEIADLPNLTWEQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	522
Z12064	VDAKYAKEADQAAEYIAYLPNLTWDQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	523
Z12065	VDAKYAKEADQAAVEIADLPNLTWDQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	524
Z12066	VDAKYAKEADEAAMEIADLPNLTWDQWFAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	525
Z12067	VDAKYAKEADMAAFEIALLPNLTWDQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	526
Z12068	VDAKYAKEADDAAVEIADLPNLTWDQWFAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	527
Z12069	VDAKYAKEADDAAVEIAELPNLTWEQWYAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	528
Z12070	VDAKYAKEADEAAVEIAALPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	529
Z12071	VDAKYAKEADEAAVEIAFLPNLTWDQWYAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	530
Z12072	VDAKYAKEADNAALEIADLPNLTWDQWYAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	531
Z12074	VDAKYAKEADDAAVEIANLPNLTWDQWFAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	532
Z12075	VDAKYAKEADEAAVEIAFLPNLTWDQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	533
Z12076	VDAKYAKEADDAALEIADLPNLTWDQWIAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	534
Z12079	VDAKYAKEADNAAMEIADLPNLTWDQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	535
Z12080	VDAKYAKEADDAAFEIAFLPNLTWDQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	536
Z12082	VDAKYAKEADDAAMEIAELPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	537
Z12083	VDAKYAKEADDAAVEIAYLPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	538
Z12084	VDAKYAKEADSAAVEIADLPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	539
Z12085	VDAKYAKEADEAAVEIAFLPNLTWDQWAAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	540
Z12086	VDAKYAKEADMMAAMEIADLPNLTWDQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	541
Z12087	VDAKYAKEADDAAVEIADLPNLTWDQWFAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	542
Z12088	VDAKYAKEADEAAMEIADLPNLTWDQWEAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	543
Z12089	VDAKYAKEADEAAVEIADLPNLTWDQWYAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	544
Z12090	VDAKYAKEADEAAVEIASLPNLTWDQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	545
Z12091	VDAKYAKEADDAAVEIANLPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	546
Z12092	VDAKYAKEADDAAVEIAYLPNLTWDQWFAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	547
Z12093	VDAKYAKEADDAAVEIAALPNLTWDQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	548
Z12094	VDAKYAKEADNAAMEIAELPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	549
Z12095	VDAKYAKEADEAAVEIAYLPNLTWDQWFAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	550

Z12096	VDAKYAKEADDAAFEIALPNLNTWDQWHAFIGLKRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	551
Z12097	VDAKYAKEADMAAVEIAGLPNLTWDQWYAFIGLKRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	552
Z12098	VDAKYAKEADMAAVEIAELPNLNTWDQWVAFIGLKRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	553
Z12099	VDAKYAKEADDAAVEIAGLPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	554
Z12100	VDAKYAKEADAAAIVEIADLPNLTWDQWVAFIQIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	555
Z12101	VDAKYAKEADDAAVEIADLPNLTWDQWYAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	556
Z12102	VDAKYAKEADDAAVEIAELPNLTWEQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	557
Z12103	VDAKYAKEADDAAVEIAELPNLTWEQWAAFIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	558
Z12104	VDAKYAKEADDAVEIAELPNLTWDQWVAFINLKRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	559
Z12105	VDAKYAKEADDAAFEIAMLPNLTWDQWEAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	560
Z12106	VDAKYAKEADDAAMEIADLPNLTWDQWEAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	561
Z12107	VDAKYAKEADEAAVEIAELPNLTWDQWAAAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	562
Z12108	VDAKYAKEADDAAFEIAELPNLTWDQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	563
Z12109	VDAKYAKEADDAAVEIASLPNLTWDQWEAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	564
Z12110	VDAKYAKEADAAAIVEIADLPNLTWDQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	565
Z12111	VDAKYAKEADEAAVEIAELPNLTWDQWVAFIMLKRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	566
Z12112	VDAKYAKEADEAAVEIAFLPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	567
Z12113	VDAKYAKEADAAAIVEIAFLPNLTWDQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	568
Z12114	VDAKYAKEADRAAFEIAELPNLTWDQWVAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	569
Z12116	VDAKYAKEADDAAVEIAELPNLTWDQWMAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	570
Z12117	VDAKYAKEADDAAVEIAYLPNLTWDQWFAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	571
Z12118	VDAKYAKEADDAAMEIADLPNLTWDQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	572
Z12119	VDAKYAKEADDAAYEIAFLPNLTWEQWVAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	573
Z12120	VDAKYAKEADMAAYEIASLPNLTWDQWFAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	574
Z12121	VDAKYAKEADDAAFEIANLPNLTWDQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	575
Z12122	VDAKYAKEADSAAMEIADLPNLTWDQWMAFIQIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	576
Z12123	VDAKYAKEADMAAVEIASLPNLTWDQWHAFIMLKRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	577
Z12124	VDAKYAKEADAAAIVEIADLPNLTWDQWHAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	578
Z12125	VDAKYAKEADDAAVEIANLPNLTWAQWEAFIMLKRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	579

Z12126	VDKAYAKEADIAAMEIADLPNLTWDQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	580
Z12127	VDKAYAKEADHAAVEIAGLPNLTWDQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	581
Z12128	VDKAYAKEADEAAEYIEAELPNLTWDQWAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	582
Z12129	VDKAYAKEADEAAFEIAELPNLTWDQWAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	583
Z12130	VDKAYAKEADAAAIVEIANLPNLTWDQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	584
Z12131	VDKAYAKEADDAAMEIAALPNLTWFQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	585
Z12132	VDKAYAKEADDAAVEIAELPNLTWDQWAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	586
Z12133	VDKAYAKEADEAAFEIASLPNLTWEQWLAFTAKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	587
Z12134	VDKAYAKEADDAAEIAYLPNLTWDQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	588
Z12135	VDKAYAKEADDAAVEIAFLPNLTWDQWYAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	589
Z12136	VDKAYAKEADDAAYEIAQLPNLTWDQWAAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	590
Z12137	VDKAYAKEADDAAVEIALLPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	591
Z12138	VDKAYAKEADEAAEYIEAYLPNLTWEQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	592
Z12139	VDKAYAKEADEAAVEIALLPNLTWDQWFAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	593
Z12140	VDKAYAKEADAAAIEIADLPNLTWDQWMAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	594
Z12141	VDKAYAKEADDAAYEIAFLPNLTWDQWEAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	595
Z12142	VDKAYAKEADDAAMEIAELPNLTWDQWAAAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	596
Z12144	VDKAYAKEADNAAMEIAGLPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	597
Z12145	VDKAYAKEADDAAYEIAELPNLTWLQWEAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	598
Z12146	VDKAYAKEADEAAEYIEIAMPLPNLTWDQWFAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	599
Z12147	VDKAYAKEADEAAEYIEAELPNLTWDQWFAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	600
Z12148	VDKAYAKEADDAAYEIASLPNLTWDQWQAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	601
Z12149	VDKAYAKEADDAAYEIAFLPNLTWDQWFAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	602
Z12150	VDKAYAKEADMAAFELASLPNLTWAQWAAAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	603
Z12152	VDKAYAKEADNAAYEIAELPNLTWDQWYAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	604
Z12153	VDKAYAKEADDAAVEIASLPNLTWVQWDAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	605
Z12154	VDKAYAKEADDAAVEIAYLPNLTWDQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	606
Z12155	VDKAYAKEADDAAFEIALLPNLTWDQWDAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	607
Z12156	VDKAYAKEADDAAVEIADLPNLTWDQWFAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	608

Z12157	VDKAKEADDAAVEIADLPNLTWDQWEAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	609
Z12158	VDKAKEADMAAIEIADLPNLTWDQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	610
Z12159	VDKAKEADDAAVEIADLPNLTWDQWAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	611
Z12160	VDKAKEADDAAFEIAALPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	612
Z12161	VDKAKEADDAAFEIASLPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	613
Z12162	VDKAKEADAAAAEIAADLPNLTWDQWAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	614
Z12164	VDKAKEADDAAYEIAFLPNLTWDQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	615
Z12165	VDKAKEADDAAVEIANLPNLTWDQWFAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	616
Z12166	VDKAKEADDAAVEIAALPNLTWDQWDAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	617
Z12167	VDKAKEADIAAMEIAELPNLTWDQWAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	618
Z12168	VDKAKEADDAAMEIAILPNLTWDQWEAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	619
Z12169	VDKAKEADSAAVEIADLPNLTWDQWYAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	620
Z12170	VDKAKEADEAAVEIADLPNLTWDQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	621
Z12171	VDKAKEADAAAAYEIAYLPNLTWDQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	622
Z12172	VDKAKEADDAAYEIAALPNLTWDQWYAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	623
Z12173	VDKAKEADIAAVEIAELPNLTWDQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	624
Z12174	VDKAKEADRAAMEIAELPNLTWQWEAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	625
Z12175	VDKAKEADDAAVEIANLPNLTWDQWEAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	626
Z12176	VDKAKEADEAAAMEIAELPNLTWDQWAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	627
Z12178	VDKAKEADEAAVEIANLPNLTWDQWEAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	628
Z12179	VDKAKEADDAAMEIADLPNLTWDQWIAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	629
Z12181	VDKAKEADDAAYEIAFLPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	630
Z12182	VDKAKEADDAAVEIADLPNLTWEQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	631
Z12183	VDKAKEADAAAAVEIAELPNLTWDQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	632
Z12184	VDKAKEADEAAVEIAFLPNLTWDQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	633
Z12185	VDKAKEADDAAYEIAELPNLTWDQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	634
Z12186	VDKAKEADAAAAVEIAGLPNLTWDQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	635
Z12187	VDKAKEADDAAYEIAFLPNLTWDQWDAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	636
Z12188	VDKAKEADDAAVEIAQLPNLTWDQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	637

Z12189	VDAKYAKEADQAAEYIEAFLPNLTWDQWEAFIFKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	638
Z12190	VDAKYAKEADSAAVEIADLPNLTWAQWDAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	639
Z12191	VDAKYAKEADAAAAMEIANIPNLTWDQWEAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	640
Z12193	VDAKYAKEADGALEIAELPNLTWDQWEAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	641
Z12194	VDAKYAKEADEAAVEIADLPNLTWDQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	642
Z12195	VDAKYAKEADDAAYEIAELPNLTWDQWFAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	643
Z12196	VDAKYAKEADDAAFEIAALPNLTWEQWMAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	644
Z12197	VDAKYAKEADDAAYEIAAYLPNLTWDQWYAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	645
Z12198	VDAKYAKEADQAAMEIADLPNLTWDQWAAAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	646
Z12199	VDAKYAKEADDAAYETAYLPNLTWDQWMAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	647
Z12200	VDAKYAKEADDAAMEIASLPNLTWDQWMAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	648
Z12201	VDAKYAKEADEAAVEIADLPNLTWEQWMAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	649
Z12202	VDAKYAKEADDAAYEIAELPNLTWDQWMAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	650
Z12203	VDAKYAKEADAAAAYEIAELPNLTWDQWDAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	651
Z12204	VDAKYAKEADNAAMEIADLPNLTWDQWMAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	652
Z12205	VDAKYAKEADHAAMEIAELPNLTWDQWMAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	653
Z12206	VDAKYAKEADAAAAYEIAALPNLTWDQWMAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	654
Z12207	VDAKYAKEADEAAFEIALLPNLTWDQWLAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	655
Z12208	VDAKYAKEADDAALEIAADLPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	656
Z12209	VDAKYAKEADKAAMEIADLPNLTWDQWEAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	657
Z12210	VDAKYAKEADDAAMEIADLPNLTWDQWMAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	658
Z12213	VDAKYAKEADNAAVEIAELPNLTWDQWFAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	659
Z12214	VDAKYAKEADDAAYEIAELPNLTWDQWMAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	660
Z12215	VDAKYAKEADQAAYEIAELPNLTWDQWFAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	661
Z12216	VDAKYAKEADQAAYEIAAGLPNLTWDQWMAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	662
Z12217	VDAKYAKEADTAAYEIAMLPNLTWEQWMAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	663
Z12218	VDAKYAKEADNAAYEIAAGLPNLTWDQWMAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	664
Z12219	VDAKYAKEADDAAYEIAELPNLTWDQWYAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	665
Z12220	VDAKYAKEADEAAVEIADLPNLTWAQWMAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	666

Z12221	VDKAYAKEADDAAVEIAYLPNLTWDQWYAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	667
Z12222	VDKAYAKEADKAAVEIAYLPNLTWDQWAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	668
Z12223	VDKAYAKEADDAAYEIAADLPNLTWDQWMAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	669
Z12224	VDKAYAKEADDAAVEIADLPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	670
Z12225	VDKAYAKEADDAAVEIADLPNLTWDQWAAAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	671
Z12226	VDKAYAKEADTAAMEIADLPNLTWDQWLAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	672
Z12227	VDKAYAKEADAAAAYEIAADLPNLTWDQWYAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	673
Z12228	VDKAYAKEADDAAVEIAELPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	674
Z12229	VDKAYAKEADDAAVEIAALPNLTWDQWEAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	675
Z12230	VDKAYAKEADDAAYEIAAYLPNLTWDQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	676
Z12231	VDKAYAKEADQAAAYEIAADLPNLTWDQWFAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	677
Z12232	VDKAYAKEADEAAAYEIAELPNLTWDQWAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	678
Z12233	VDKAYAKEADDAAYEIAFLPNLTWDQWHAFFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	679
Z12234	VDKAYAKEADKAAVEIADLPNLTWDQWFAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	680
Z12235	VDKAYAKEADDAAYEIAELPNLTWDQWMAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	681
Z12236	VDKAYAKEADEAAVEIAELPNLTWDQWMAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	682
Z12237	VDKAYAKEADDAAYEIAELPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	683
Z12238	VDKAYAKEADDAAVEIAGLPNLTWDQWAAAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	684
Z12239	VDKAYAKEADSAAYEIAADLPNLTWDQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	685
Z12240	VDKAYAKEADEAAVEIADLPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	686
Z12241	VDKAYAKEADDAAMEIADLPNLTWDQWMAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	687
Z12242	VDKAYAKEADDAAVEIALLPNLTWDQWMAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	688
Z12243	VDKAYAKEADDAAVEIADLPNLTWEQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	689
Z12244	VDKAYAKEADEAAVEIADLPNLTWDQWFAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	690
Z12245	VDKAYAKEADQAAVEIAELPNLTWDQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	691
Z12246	VDKAYAKEADEAAVEIAYLPNLTWDQWMAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	692
Z12247	VDKAYAKEADDAAMEIADLPNLTWDQWAAFIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	693
Z12248	VDKAYAKEADDAAFEIALLPNLTWVQWEAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	694
Z12249	VDKAYAKEADDAAYEIAQLPNLTWDQWYAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	695

Z12250	VDAKYAKEADMAAVEIADLPNLTWQWHAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	696
Z12251	VDAKYAKEADDAAFEIAQLPNLTWQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	697
Z12252	VDAKYAKEADDAAVEIAELPNLTWQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	698
Z12253	VDAKYAKEADDAAYEIAAYLPNLTWQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	699
Z12254	VDAKYAKEADDAAMEIANLPNLTWQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	700
Z12257	VDAKYAKEADEAAEYIAMLPNLTWQWDAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	701
Z12258	VDAKYAKEADEAAFEIAQLPNLTWQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	702
Z12259	VDAKYAKEADDAAVEIAELPNLTWQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	703
Z12260	VDAKYAKEADNAAFEIAGLPNLTWQWDAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	704
Z12261	VDAKYAKEADMAAVEIAALPNLTWQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	705
Z12262	VDAKYAKEADDAAFEIAFLPNLTWQWNAFIOKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	706
Z12263	VDAKYAKEADKAAVEIADLPNLTWQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	707
Z12265	VDAKYAKEADSAAVEIADLPNLTWQWNAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	708
Z12266	VDAKYAKEADDAAMEIAALPNLTWQWFAFIOKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	709
Z12267	VDAKYAKEADDAAFEIAQLPNLTWQWNAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	710
Z12268	VDAKYAKEADQAAVEIASLPNLTWEQWYAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	711
Z12269	VDAKYAKEADEAAEYIEAELPNLTWQWNAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	712
Z12270	VDAKYAKEADMAAVEIADLPNLTWQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	713
Z12271	VDAKYAKEADDAAVEIADLPNLTWQWNAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	714
Z12272	VDAKYAKEADDAAYEIAAGLPNLTWQWYAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	715
Z12273	VDAKYAKEADEAAVEIADLPNLTWEQWNAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	716
Z12274	VDAKYAKEADDAAVEIADLPNLTWQWNAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	717
Z12276	VDAKYAKEADDAAVEIAELPNLTWQWYAFIOKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	718
Z12277	VDAKYAKEADQAAVEIADLPNLTWQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	719
Z12278	VDAKYAKEADKAAVEIAFLPNLTWQWYAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	720
Z12279	VDAKYAKEADNAAVEIAELPNLTWQWNAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	721
Z12280	VDAKYAKEADQAAFEIAELPNLTWQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	722
Z12281	VDAKYAKEADDAAMEIANLPNLTWQWNAFIOKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	723
Z12282	VDAKYAKEADDAAVEIASLPNLTWQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	724

Z12284	VDKAYAKEADDAAYEIAFLPNLITWDQWWAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	725
Z12286	VDKAYAKEADDAAYEIAELPNLITWDQWWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	726
Z12287	VDKAYAKEADDAAYEIAADLPNLTWDQWWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	727
Z12288	VDKAYAKEADDAAYEIAMLPNLTWDQWDAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	728
Z12290	VDKAYAKEADDAAYEIAAYLPNLTWDQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	729
Z12291	VDKAYAKEADDAAYEIAADLPNLTWDQWWAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	730
Z12292	VDKAYAKEADDAAYEIAQLPNLITWDQWFAFIYKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	731
Z12293	VDKAYAKEADNAAYEIAADLPNLTWDQWYAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	732
Z12294	VDKAYAKEADEAAAYEIAALPNLITWDQWEAFIKKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	733
Z12295	VDKAYAKEADGAAYEIANLPNLTWDQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	734
Z12296	VDKAYAKEADDAAYEIAELPNLITWDQWWAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	735
Z12297	VDKAYAKEADDAAYEIAQLPNLITWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	736
Z12298	VDKAYAKEADDAAYEIALLPNLTWDQWLAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	737
Z12299	VDKAYAKEADDAAYEIAADLPNLTWDQWEAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	738
Z12300	VDKAYAKEADAAAAYEIAADLPNLTWEQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	739
Z12301	VDKAYAKEADEAAAYEIAMLPNLTWDQWDAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	740
Z12302	VDKAYAKEADLAAYEIAELPNLITWAQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	741
Z12303	VDKAYAKEADDAAYEIALLPNLTWDQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	742
Z12304	VDKAYAKEADQAAYEIAELPNLITWDQWEAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	743
Z12305	VDKAYAKEADDAAYEIAELPNLITWDQWEAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	744
Z12306	VDKAYAKEADMAAYEIASLPNLTWDQWYAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	745
Z12307	VDKAYAKEADNAAYEIAADLPNLTWDQWWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	746
Z12308	VDKAYAKEADDAAYEIASLPNLTWDQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	747
Z12309	VDKAYAKEADAAAYEIAADLPNLTWDQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	748
Z12310	VDKAYAKEADDAAYEIALLPNLTWDQWDAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	749
Z12311	VDKAYAKEADMAAYEIAADLPNLTWDQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	750
Z12312	VDKAYAKEADDAAYEIAAGLPNLTWDQWFAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	751
Z12313	VDKAYAKEADEAAAYEIAFLPNLITWDQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	752
Z12314	VDKAYAKEADIAAYEIAADLPNLTWDQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	753

Z12315	VDKAKEADDAAEIAELPNTLTDQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	754
Z12316	VDKAKEADIAAMEIADLPNLTWDQWAFI GKL RDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	755
Z12317	VDKAKEADNAAMEIADLPNLTWDQWYAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	756
Z12318	VDKAKEADDAAYEIA DLPNLTWQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	757
Z12319	VDKAKEADEAAVEIASLPNLTWDQWAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	758
Z12320	VDKAKEADAAA VEIADLPNLTWQWEAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	759
Z12321	VDKAKEADMAAVEIAELPNTLTDQWYAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	760
Z12322	VDKAKEADEAAMEIADLPNLTWDQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	761
Z12323	VDKAKEADDAAFEIAQLPNTLTDQWFAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	762
Z12324	VDKAKEADDAAFEIASLPNLTWDQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	763
Z12325	VDKAKEADDAAVEIAILPNTLTDQWFAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	764
Z12326	VDKAKEADLAAVEIAELPNTLTDQWEAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	765
Z12327	VDKAKEADLAAVEIADLPNLTWEQWFAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	766
Z12328	VDKAKEADSAAYEIAFLPNTLTDQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	767
Z12329	VDKAKEADDAAMEIADLPNLTWDQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	768
Z12330	VDKAKEADNAAVEIADLPNLTWDQWFAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	769
Z12331	VDKAKEADDAAFEIAMLPNLTWDQWAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	770
Z12332	VDKAKEADEAAVEIADLPNLTWEQWAFI GKL RDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	771
Z12333	VDKAKEADSAAYEIAFLPNTLTDQWFAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	772
Z12334	VDKAKEADDAAYEIAFLPNTLTDQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	773
Z12335	VDKAKEADDAAYEIAFLPNTWEQWHA FIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	774
Z12336	VDKAKEADLAALEIAELPNTLTDQWDAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	775
Z12337	VDKAKEADDAAYEIAFLPNTLTDQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	776
Z12338	VDKAKEADDAAEIAELPNTLTDQWFAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	777
Z12339	VDKAKEADDAAEIAELPNTLTDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	778
Z12340	VDKAKEADMAAMEIAELPNTLTDQWEAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	779
Z12341	VDKAKEADDAAYEIAFLPNTLTDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	780
Z12342	VDKAKEADDAAVEIADLPNLTWDQWEAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	781
Z12343	VDKAKEADDAAMEIADLPNLTWDQWAFI GKL RDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	782

Z12345	VDKAYAKEADRAAMEIADLPNLTWDQWDAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	783
Z12346	VDKAYAKEADDAAYEIAFLPNLTWDQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	784
Z12347	VDKAYAKEADMAAVEIADLPNLTWDQWAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	785
Z12348	VDKAYAKEADDAAVEIANLPNLTWDQWAFIQLKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	786
Z12350	VDKAYAKEADDAAFEIALLPNLTWDQWAFIILKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	787
Z12351	VDKAYAKEADDAAVEIAELPNLTWVQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	788
Z12352	VDKAYAKEADEEALEIADLPNLTWDQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	789
Z12353	VDKAYAKEADDAAVEIADLPNLTWDQWAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	790
Z12354	VDKAYAKEADDAAAEIAADLPNLTWDQWAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	791
Z12355	VDKAYAKEADDAAMEIADLPNLTWDQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	792
Z12356	VDKAYAKEADEAAEYIADLPNLTWDQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	793
Z12357	VDKAYAKEADNAAYEIAFLPNLTWDQWDAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	794
Z12358	VDKAYAKEADAAAVEIADLPNLTWAQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	795
Z12360	VDKAYAKEADAAAYEIAFLPNLTWDQWAFIQLKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	796
Z12361	VDKAYAKEADAAAVEIADLPNLTWEQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	797
Z12362	VDKAYAKEADAAAYEIAALPNLTWDQWAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	798
Z12363	VDKAYAKEADNAAFEIAELPNLTWDQWAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	799
Z12364	VDKAYAKEADQAAMEIADLPNLTWDQWYAFIQLKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	800
Z12365	VDKAYAKEADQAAMEIAELPNLTWDQWDAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	801
Z12366	VDKAYAKEADEAAFEIAELPNLTWDQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	802
Z12367	VDKAYAKEADDAAVEIAFLPNLTWEQWFAFIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	803
Z12368	VDKAYAKEADDAAVEIANLPNLTWDQWEAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	804
Z12369	VDKAYAKEADMAAIEIADLPNLTWDQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	805
Z12370	VDKAYAKEADQAAYEIANLPNLTWDQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	806
Z12371	VDKAYAKEADQAAMEIAYLPNLTWDQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	807
Z12372	VDKAYAKEADKAAVEIAELPNLTWDQWAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	808
Z12373	VDKAYAKEADEAAVEIASLPNLTWDQWYAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	809
Z12374	VDKAYAKEADMAAVEIADLPNLTWDQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	810
Z12375	VDKAYAKEADAAAMEIAMLPNLTWDQWDAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	811

Z12376	VDAKYAKEADDAAYEIAFLPNLTDQWDAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	812
Z12377	VDAKYAKEADNAAEYIADLPNLTWDQWFAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	813
Z12378	VDAKYAKEADDAAVEIAGLPNLTWDQWVAFI GKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	814
Z12379	VDAKYAKEADDAAVEIAGLPNLTWDQWDAFIIKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	815
Z12380	VDAKYAKEADNAAEYIAELPNLTWDQWDAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	816
Z12381	VDAKYAKEADMAAMEIASLPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	817
Z12382	VDAKYAKEADHAAVEIAALPNLTWDQWDAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	818
Z12383	VDAKYAKEADEAAEYIADLPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	819
Z12384	VDAKYAKEADNAAVEIADLPNLTWDQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	820
Z12385	VDAKYAKEADDAAVEIAELPNLTWDQWDAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	821
Z12386	VDAKYAKEADDAAVEIALLPNLTWDQWVAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	822
Z12387	VDAKYAKEADKAAVEIAYLPNLTWDQWYAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	823
Z12388	VDAKYAKEADNAAFEIAELPNLTWDQWYAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	824
Z12389	VDAKYAKEADAAAYEIAFLPNLTWDQWAAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	825
Z12390	VDAKYAKEADQAAVEIADLPNLTWDQWDAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	826
Z12391	VDAKYAKEADDAAVEIAALPNLTWDQWVAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	827
Z12392	VDAKYAKEADEAAEYIADLPNLTWDQWVAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	828
Z12393	VDAKYAKEADFAAVEIASLPNLTWDQWAAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	829
Z12394	VDAKYAKEADEAAVEIAELPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	830
Z12395	VDAKYAKEADMAAYEIAELPNLTWDQWQAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	831
Z12396	VDAKYAKEADDAAMEIADLPNLTWQWYAFI GKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	832
Z12397	VDAKYAKEADDAAVEIAALPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	833
Z12398	VDAKYAKEADSAAYEIAFLPNLTWDQWYAFIIKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	834
Z12399	VDAKYAKEADAAAYEIAFLPNLTWDQWYAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	835
Z12400	VDAKYAKEADQAAFEIAELPNLTWDQWYAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	836
Z12401	VDAKYAKEADEAAVEIANLPNLTWDQWEAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	837
Z12402	VDAKYAKEADMAAYEIAGLPNLTWDQWYAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	838
Z12403	VDAKYAKEADAAAFEIADLPNLTWDQWVAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	839
Z12404	VDAKYAKEADIAAMEIADLPNLTWDQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	840

Z12405	VDAKYAKEADEAAVEIAELPNLTWDQWFAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	841
Z12406	VDAKYAKEADLAAVEIADLPNLTWDQWFAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	842
Z12407	VDAKYAKEADDAAFEIASLPNLTWDQWLAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	843
Z12408	VDAKYAKEADMAAVEIADLPNLTWDQWFAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	844
Z12409	VDAKYAKEADDAAVEIAYLPNLTWDQWYAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	845
Z12410	VDAKYAKEADRAAYEIAELPNLTWDQWDAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	846
Z12411	VDAKYAKEADEAAVEIAGLPNLTWDQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	847
Z12412	VDAKYAKEADHAAVEIADLPNLTWEQWAAAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	848
Z12413	VDAKYAKEADIAALEIAGLPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	849
Z12414	VDAKYAKEADEAAVEIAFLPNLTWDQWFAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	850
Z12415	VDAKYAKEADRAAVEIAALPNLTWDQWDAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	851
Z12416	VDAKYAKEADEAAVEIAELPNLTWDQWLAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	852
Z12417	VDAKYAKEADDAAMEIADLPNLTWDQWAAAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	853
Z12418	VDAKYAKEADEAAVEIAALLPNLTWDQWDAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	854
Z12419	VDAKYAKEADSAAVEIASLPNLTWDQWLAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	855
Z12420	VDAKYAKEADEAAVEIAYLPNLTWDQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	856
Z12421	VDAKYAKEADMAAYEIAFLPNLTWDQWFAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	857
Z12422	VDAKYAKEADAAAMEIADLPNLTWDQWAAAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	858
Z12423	VDAKYAKEADDAAYEIAFLPNLTWDQWLAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	859
Z12424	VDAKYAKEADDAAVEIADLPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	860
Z12425	VDAKYAKEADEAAVEIADLPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	861
Z12426	VDAKYAKEADNAAVEIAELPNLTWDQWDAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	862
Z12427	VDAKYAKEADDAAYEIAFLPNLTWDQWAAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	863
Z12428	VDAKYAKEADNAAEIADLPNLTWDQWAAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	864
Z12429	VDAKYAKEADDAAYEIAELPNLTWDQWFAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	865
Z12430	VDAKYAKEADGAAFEIAALPNLTWDQWAAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	866
Z12431	VDAKYAKEADDAAFEIAQLPNLTWDQWAAAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	867
Z12432	VDAKYAKEADMAALEIADLPNLTWDQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	868
Z12433	VDAKYAKEADVAAVEIAGLPNLTWDQWAAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	869

Z12434	VDKAYAKEADIAAVEIAALPNLTWDQWDAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	870
Z12435	VDKAYAKEADDAALEIADLPNLTWDQWDAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	871
Z12437	VDKAYAKEADDAAYEIAADLPNLTWDQWDAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	872
Z12438	VDKAYAKEADNAAFEIAGLPNLTWDQWDAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	873
Z12440	VDKAYAKEADQAAMEIALPNLTWDQWEAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	874
Z12441	VDKAYAKEADDAAYEIALPNLTWDQWDAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	875
Z12442	VDKAYAKEADDAAFEIAELPNLTWDQWDAFIOKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	876
Z12444	VDKAYAKEADEAAVEIADLPNLTWDQWEAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	877
Z12445	VDKAYAKEADDAAVEIANLPNLTWDQWDAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	878
Z12446	VDKAYAKEADQAAVEIADLPNLTWDQWEAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	879
Z12447	VDKAYAKEADNAAFEIANLPNLTWQWEAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	880
Z12448	VDKAYAKEADAAAVEIADLPNLTWYQWDAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	881
Z12449	VDKAYAKEADDAAVEIANLPNLTWDQWLAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	882
Z12450	VDKAYAKEADDAAYEIAALPNLTWDQWDAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	883
Z12452	VDKAYAKEADKAAVEIAELPNLTWDQWDAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	884
Z12453	VDKAYAKEADIAAVEIADLPNLTWDQWDAFIOKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	885
Z12454	VDKAYAKEADDAAYEIAELPNLTWDQWDAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	886
Z12455	VDKAYAKEADNAAVEIAALPNLTWDQWDAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	887
Z12456	VDKAYAKEADDAAVEIAELPNLTWDQWDAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	888
Z12457	VDKAYAKEADKAAVEIAFLPNLTWDQWDAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	889
Z12458	VDKAYAKEADDAAVEIAELPNLTWDQWDAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	890
Z12459	VDKAYAKEADDAAMEIAYLPNLTWEQWDAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	891
Z12460	VDKAYAKEADDAAFEIALPNLTWDQWEAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	892
Z12461	VDKAYAKEADDAAYEIAMLPNLTWDQWDAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	893
Z12462	VDKAYAKEADDAAFEIAMLPNLTWDQWEAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	894
Z12464	VDKAYAKEADEAAVEIAELPNLTWDQWYAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	895
Z12465	VDKAYAKEADDAAFEIAMLPNLTWDQWDAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	896
Z12466	VDKAYAKEADTAAVEIAFLPNLTWDQWDAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	897
Z12467	VDKAYAKEADLAAVEIAFLPNLTWDQWDAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	898

Z12468	VDAKYAKEADAAAYEIAYLPNLTTWDQWAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	899
Z12469	VDAKYAKEADAAAYEIAGLPNLTTWDQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	900
Z12470	VDAKYAKEADNAAVEIAFLPNLTTWDQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	901
Z12471	VDAKYAKEADAAAYEIAYLPNLTTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	902
Z12472	VDAKYAKEADAAALEIADLPNLTTWDQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	903
Z12473	VDAKYAKEADAAVEIAIDLPNLTTWQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	904
Z12474	VDAKYAKEADAAAMEIAGLPNLTTWDQWAAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	905
Z12475	VDAKYAKEADSAAYEIAQLPNLTTWQWAAFIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	906
Z12476	VDAKYAKEADAAFEIAWLPNLTTWDQWAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	907
Z12477	VDAKYAKEADEAAVEIAMLPNLTTWDQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	908
Z12478	VDAKYAKEADDAALEIASLPNLTTWDQWLAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	909
Z12479	VDAKYAKEADDAAVEIAYLPNLTTWDQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	910
Z12480	VDAKYAKEADDAAVEIADLPNLTTWDQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	911
Z12482	VDAKYAKEADAAAVEIAELPNLTTWDQWAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	912
Z12483	VDAKYAKEADAAAYEIAFLPNLTTWDQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	913
Z12484	VDAKYAKEADDAAAEIAIDLPNLTTWDQWAAFIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	914
Z12485	VDAKYAKEADDAAFEIAVLPNLTTWQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	915
Z12486	VDAKYAKEADDAAMEIADLPNLTTWDQWYAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	916
Z12487	VDAKYAKEADNAAVEIAIDLPNLTTWDQWIAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	917
Z12488	VDAKYAKEADDAAVEIAFLPNLTTWDQWYAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	918
Z12489	VDAKYAKEADLAAYEIAYLPNLTTWDQWYAFIYKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	919
Z12490	VDAKYAKEADKAAFEIAMLPNLTTWDQWDAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	920
Z12491	VDAKYAKEADDAAFEIAFLPNLTTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	921
Z12492	VDAKYAKEADNAAVEIASLPNLTTWDQWAFIYKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	922
Z12493	VDAKYAKEADDAAFEIAMLPNLTTWDQWYAFIYKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	923
Z12494	VDAKYAKEADDAAVEIAELPNLTTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	924
Z12495	VDAKYAKEADDAAYEIAWLPNLTTWDQWYAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	925
Z12496	VDAKYAKEADDAAFEIALLPNLTTWDQWYAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	926
Z12497	VDAKYAKEADDAAFEIAALPNLTTWDQWYAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	927

Z12499	VDAKYAKEADMAAVEIAYLPNLTWDQWVAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	928
Z12500	VDAKYAKEADHAAAMEIASLPNLTWDQWEAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	929
Z12501	VDAKYAKEADHAAAYEIAALPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	930
Z12502	VDAKYAKEADEAAAYEIAADLPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	931
Z12503	VDAKYAKEADDAAYEIAELPNLTWDQWFATITKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	932
Z12504	VDAKYAKEADNAAYEIAMLPNLTWDQWMAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	933
Z12505	VDAKYAKEADQAAVEIAALPNLTWEQWVAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	934
Z12506	VDAKYAKEADIAAVEIAGLPNLTWDQWVAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	935
Z12507	VDAKYAKEADDAAYEIAMLPNLTWDQWVAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	936
Z12508	VDAKYAKEADEAAVEIAANLPNLTWDQWDVAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	937
Z12509	VDAKYAKEADDAAMEIADLPNLTWDQWFATITKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	938
Z12510	VDAKYAKEADQAAFEIAALPNLTWDQWFVAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	939
Z12511	VDAKYAKEADRAATEIADLPNLTWDQWVAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	940
Z12512	VDAKYAKEADEAAVEIAYLPNLTWDQWVAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	941
Z12513	VDAKYAKEADSAAVEIAELPNLTWDQWVAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	942
Z12514	VDAKYAKEADDAAYEIAELPNLTWDQWVAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	943
Z12515	VDAKYAKEADAAAAYEIAAYLPNLTWDQWVAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	944
Z12516	VDAKYAKEADEAAFEIAHLPNLTWDQWVAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	945
Z12517	VDAKYAKEADDAAYEIAFLPNLTWDQWEAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	946
Z12518	VDAKYAKEADDAAFEIAYLPNLTWDQWFATITKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	947
Z12519	VDAKYAKEADDAAYEIAADLPNLTWDQWVAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	948
Z12520	VDAKYAKEADSAAYEIAGLPNLTWDQWEAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	949
Z12521	VDAKYAKEADEAAAYEIASLPNLTWDQWHAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	950
Z12523	VDAKYAKEADDAAFEIAKLPNLTWYQWEAFIYKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	951
Z12524	VDAKYAKEADDAAYEIAALPNLTWDQWVAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	952
Z12525	VDAKYAKEADLAAMEIADLPNLTWDQWVAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	953
Z12526	VDAKYAKEADQAAAYEIAAYLPNLTWDQWVAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	954
Z12527	VDAKYAKEADAAAIEIADLPNLTWDQWYAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	955
Z12528	VDAKYAKEADDAAMEIADLPNLTWDQWDVAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLINDSQAPK	956

Z12529	VDAKYAKEADEAAVEIAYLPNLTWDQWFAFIQKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	957
Z12530	VDAKYAKEADNAAVEIAELPNLTWDQWFAFIEKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	958
Z12531	VDAKYAKEADDAAYEIAMLPNLTWDQWFAFIQKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	959
Z12532	VDAKYAKEADNAAMEIADLPNLTWDQWAAFIKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	960
Z12533	VDAKYAKEADNAAVEIAYLPNLTWEQWFAFITKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	961
Z12534	VDAKYAKEADEAAFEIAWLPNLTWDQWYAFIEKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	962
Z12535	VDAKYAKEADEAAEIAELPNLTWDQWAAFIKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	963
Z12536	VDAKYAKEADDAAFEIAMLPNLTWDQWAAFIKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	964
Z12537	VDAKYAKEADQAAMEIADLPNLTWDQWAAFINKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	965
Z12538	VDAKYAKEADDAAVEIAYLPNLTWDQWAAFINKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	966
Z12539	VDAKYAKEADDAAVEIAWLPNLTWDQWFAFIQKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	967
Z12540	VDAKYAKEADEAAVEIADLPNLTWDQWYAFIEKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	968
Z12541	VDAKYAKEADQAAVEIADLPNLTWDQWFAFIEKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	969
Z12542	VDAKYAKEADQAAFEIAGLPNLTWDQWAAFIKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	970
Z12543	VDAKYAKEADDAAYEIAYLPNLTWEQWAAFIKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	971
Z12544	VDAKYAKEADDAAFEIASLPNLTWLQWEAFIMKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	972
Z12545	VDAKYAKEADAAAVEIAALPNLTWDQWMAFIDKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	973
Z12546	VDAKYAKEADDAAYEIAELPNLTWDQWYAFIAKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	974
Z12547	VDAKYAKEADEAAVEIAELPNLTWDQWAAFIGKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	975
Z12548	VDAKYAKEADDAAFEIAALPNLTWDQWAAFIKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	976
Z12549	VDAKYAKEADDAAVEIADLPNLTWDQWMAFINKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	977
Z12550	VDAKYAKEADFAAMEIADLPNLTWDQWAAFIKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	978
Z12551	VDAKYAKEADDAAYEIAMLPNLTWDQWYAFIEKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	979
Z12552	VDAKYAKEADEAAVEIAQLPNLTWDQWAAFINKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	980
Z12553	VDAKYAKEADDAAVEIAALPNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	981
Z12554	VDAKYAKEADDAAYEIAADLPNLTWDQWMAFINKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	982
Z12555	VDAKYAKEADDAAVEIAFLPNLTWDQWAAFIKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	983
Z12556	VDAKYAKEADDAAMEIADLPNLTWEQWYAFIAKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	984
Z12557	VDAKYAKEADQAAVEIADLPNLTWLQWFAFINKLRDDPSQSSSELLSEAKKLNDSQAPK	985

Z12558	VDAKYAKEADDAAVEIAELPNLTWQWFADIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	986
Z12559	VDAKYAKEADMAAIEIAALPNLTWQWDAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	987
Z12560	VDAKYAKEADEAAVEIAYLPNLTWQWQWAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	988
Z12561	VDAKYAKEADQAAVEIAELPNLTWQWQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	989
Z12562	VDAKYAKEADDAAEIANLPNLTWQWQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	990
Z12563	VDAKYAKEADQAAFEIAELPNLTWQWQWYAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	991
Z12564	VDAKYAKEADDAAYEIAELPNLTWQWQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	992
Z12565	VDAKYAKEADDAAYEIAELPNLTWQWQWAFIYKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	993
Z12566	VDAKYAKEADDAAYEIAMLPNLTWQWQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	994
Z12567	VDAKYAKEADDAAMEIALLPNLTWQWQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	995
Z12568	VDAKYAKEADEAAVEIADLPNLTWQWQWAFIYKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	996
Z12569	VDAKYAKEADDAAYEIAELPNLTWQWQWAAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	997
Z12570	VDAKYAKEADEAAEIAELPNLTWQWQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	998
Z12571	VDAKYAKEADNAAVEIADLPNLTWQWQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	999
Z12572	VDAKYAKEADDAAYEIAFLPNLTWQWQWAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1000
Z12573	VDAKYAKEADDAAYEIAALPNLTWQWQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1001
Z12574	VDAKYAKEADNAAAEIAALPNLTWQWQWYAFIYKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1002
Z12575	VDAKYAKEADEAAVEIAFLPNLTWQWQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1003
Z12576	VDAKYAKEADNAAVEIADLPNLTWQWQWAFIYKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1004
Z12577	VDAKYAKEADEAAVEIADLPNLTWQWQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1005
Z12578	VDAKYAKEADDAAYEIAMLPNLTWQWQWAAFIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1006
Z12579	VDAKYAKEADDAAYEIAQLPNLTWQWQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1007
Z12580	VDAKYAKEADGAAVEIAGLPNLTWQWQWAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1008
Z12581	VDAKYAKEADNAAYEIALLPNLTWQWQWAFIYKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1009
Z12582	VDAKYAKEADAAAMEIAGLPNLTWQWQWAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1010
Z12583	VDAKYAKEADDAAVEIANLPNLTWQWQWAAFIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1011
Z12584	VDAKYAKEADDAAYEIAELPNLTWQWQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1012
Z12586	VDAKYAKEADDAAFEIAMLPNLTWQWQWAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1013
Z12588	VDAKYAKEADMAAVEIAELPNLTWQWQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1014

Z12589	VDKAYAKEADMAAVEIADLPNLTWDQWYAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1015
Z12590	VDKAYAKEADAAAAMEIADLPNLTWDQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1016
Z12591	VDKAYAKEADDAAYEIAFLPNLTWDQWYAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1017
Z12592	VDKAYAKEADQAAMEIAELPNLTWDQWEAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1018
Z12593	VDKAYAKEADGAAAYEIASLPNLTWDQWAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1019
Z12594	VDKAYAKEADDAAYEIAFLPNLTWDQWDAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1020
Z12595	VDKAYAKEADDAAVEIAWLPNLTWDQWAFIOKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1021
Z12596	VDKAYAKEADEAAVEIAYLPNLTWDQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1022
Z12597	VDKAYAKEADAAAFFEIAALPNLTWDQWYAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1023
Z12598	VDKAYAKEADDAAYEIAELPNLTWDQWYAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1024
Z12599	VDKAYAKEADEAAAYEIAALPNLTWDQWAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1025
Z12600	VDKAYAKEADDAAVEIAALPNLTWDQWIAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1026
Z12601	VDKAYAKEADEAAMEIADLPNLTWEQWAAAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1027
Z12603	VDKAYAKEADAAAAYEIAARLPNLTWLQWEAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1028
Z12604	VDKAYAKEADAAAAYEIAELPNLTWEQWAFIOKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1029
Z12605	VDKAYAKEADDAAMEIAALPNLTWDQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1030
Z12606	VDKAYAKEADDAAFEIAFLPNLTWDQWHAFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1031
Z12607	VDKAYAKEADNAAYEIAALPNLTWIQWHAFAIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1032
Z12608	VDKAYAKEADSAAYEIAVLPNLTWDQWYAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1033
Z12609	VDKAYAKEADDAAYEIAHLPNLTWDQWEAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1034
Z12610	VDKAYAKEADEAAVEIAVLPNLTWDQWAAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1035
Z12611	VDKAYAKEADNAAMEIAELPNLTWDQWFAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1036
Z12612	VDKAYAKEADDAAMEIAELPNLTWEQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1037
Z12613	VDKAYAKEADDAAFEIAQLPNLTWDQWYAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1038
Z12614	VDKAYAKEADDAAVEIAMLPNLTWDQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1039
Z12615	VDKAYAKEADDAAYEIAELPNLTWDQWYAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1040
Z12616	VDKAYAKEADNAALEIAELPNLTWDQWAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1041
Z12617	VDKAYAKEADNAAYEIAELPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1042
Z12618	VDKAYAKEADLAAMEIAELPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1043

Z12619	VDKAYAKEADDAAVEIADLPLNLTWAQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1044
Z12620	VDKAYAKEADDAAMEIAFLPNLTWDQWAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1045
Z12621	VDKAYAKEADEAAVEIAHLPLNTWDQWFAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1046
Z12622	VDKAYAKEADDAAYEIAFLPNLTWDQWAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1047
Z12624	VDKAYAKEADHAAVEIAFLPNLTWDQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1048
Z12625	VDKAYAKEADQAAVEIANLPLNTWDQWAAAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1049
Z12626	VDKAYAKEADQAAVEIAGLPLNTWDQWAAAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1050
Z12627	VDKAYAKEADEAAVEIALPLNLTWDQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1051
Z12628	VDKAYAKEADEAAVEIAYLPLNLTWDQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1052
Z12629	VDKAYAKEADEAAVEIAGLPLNLTWDQWEAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1053
Z12630	VDKAYAKEADDAAMEIAELPLNLTWDQWAAAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1054
Z12631	VDKAYAKEADDAALEIAYLPLNLTWDQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1055
Z12632	VDKAYAKEADAAAVEIADLPLNLTWDQWAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1056
Z12633	VDKAYAKEADSAAVEIADLPLNLTWDQWYAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1057
Z12635	VDKAYAKEADMAAVEIAELPLNLTWDQWYAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1058
Z12636	VDKAYAKEADKAAVEIAELPLNLTWDQWAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1059
Z12637	VDKAYAKEADDAAMEIADLPLNLTWDQWAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1060
Z12638	VDKAYAKEADDAAVEIAGLPLNLTWDQWAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1061
Z12639	VDKAYAKEADDAAYEIAELPLNLTWDQWFAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1062
Z12640	VDKAYAKEADDAAMEIALPLNLTWDQWHAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1063
Z12641	VDKAYAKEADIAAFEIAGLPLNLTWDQWFAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1064
Z12642	VDKAYAKEADQAAVEIADLPLNLTWDQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1065
Z12643	VDKAYAKEADMAAVEIAGLPLNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1066
Z12644	VDKAYAKEADDAAMEIAALPLNLTWDQWAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1067
Z12645	VDKAYAKEADDAAVEIAWLPLNLTWDQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1068
Z12646	VDKAYAKEADNAAVEIAFLPLNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1069
Z12648	VDKAYAKEADDAAFEIAALPLNLTWDQWAAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1070
Z12649	VDKAYAKEADAAAVEIAELPLNLTWDQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1071
Z12650	VDKAYAKEADDAAYEIAFLPLNLTWDQWDAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1072

Z12651	VDAKYAKEADDAAVEIAFLPNLTWEQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1073
Z12652	VDAKYAKEADNAAMEIAALPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1074
Z12653	VDAKYAKEADDAAVEIAFLPNLTWDQWDAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1075
Z12654	VDAKYAKEADAAAYEIALPNLTWDQWFAPIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1076
Z12655	VDAKYAKEADDAAYEIIAGLPNLTWDQWAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1077
Z12656	VDAKYAKEADDAFEIAELPNLTWDQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1078
Z12657	VDAKYAKEADEAAMEIADLPNLTWAQWYAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1079
Z12658	VDAKYAKEADMAAVEIAALPNLTWDQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1080
Z12659	VDAKYAKEADNAAVEIAELPNLTWEQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1081
Z12660	VDAKYAKEADIAAVEIAALPNLTWDQWAAAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1082
Z12661	VDAKYAKEADRAAVEIASLPNLTWDQWYAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1083
Z12662	VDAKYAKEADAAAVEIANLPNLTWDQWEAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1084
Z12663	VDAKYAKEADDAAVEIALPNLTWDQWFAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1085
Z12664	VDAKYAKEADDAAVEIANLPNLTWAQWHAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1086
Z12665	VDAKYAKEADNAAVEIAWLPNLTWDQWFAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1087
Z12669	VDAKYAKEADFAAIEIAELPNLTWDQWHAFAIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1088
Z12670	VDAKYAKEADIAAFEIAMLPNLTWLQWEAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1089
Z12671	VDAKYAKEADGAAMEIALLPNLTWDQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1090
Z12672	VDAKYAKEADAAAMEIAFLPNLTWDQWDAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1091
Z12673	VDAKYAKEADAAAAMEIANLPNLTWDQWAAAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1092
Z12674	VDAKYAKEADDAAYEIIAGLPNLTWLQWDAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1093
Z12675	VDAKYAKEADLAAIEIANLPNLTWDQWHAFAIFKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1094
Z12677	VDAKYAKEADRAAYEIAELPNLTWDQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1095
Z12679	VDAKYAKEADHAAVEIAGLPNLTWDQWHAFAISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1096
Z12680	VDAKYAKEADNAAYEIALPNLTWDQWAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1097
Z12681	VDAKYAKEADAAAVEIAALPNLTWDQWDAFIFKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1098
Z12683	VDAKYAKEADTAAVEIAQLPNLTWDQWAAAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1099
Z12684	VDAKYAKEADRAAVEIAHLPNLTWIQWEAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1100
Z12685	VDAKYAKEADSAAVEIAELPNLTWDQWAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1101

Z12686	VDKAKEADQAAFEIAGLPNLTWDQWFAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1102
Z12688	VDKAKEADEAAVEIAALPNLTWDQWLAFAIKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1103
Z12689	VDKAKEADNAAVEIANLPNLTWQWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1104
Z12690	VDKAKEADIAALEIANLPNLTWDQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1105
Z12691	VDKAKEADIAAVEIAWLPNLTWAQWHAFAITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1106
Z12692	VDKAKEADVAAAIEAELPNLTWDQWAAFAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1107
Z12694	VDKAKEADDAAVEIAELPNLTWQWEEAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1108
Z12696	VDKAKEADQAAMEIAKLPNLTWDQWYAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1109
Z12697	VDKAKEADQAAEYELADLPNLTWDQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1110
Z12700	VDKAKEADKAAEYEAQLPNLTWEQWAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1111
Z12701	VDKAKEADDAAVEIAWLPNLTWDQWYAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1112
Z12703	VDKAKEADRAAVEIANLPNLTWQWEEAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1113
Z12707	VDKAKEADEAAAMEIANLPNLTWEQWAFIOKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1114
Z12708	VDKAKEADTAAYEIANLPNLTWDQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1115
Z12709	VDKAKEADDAAEIEIADLPNLTWIQWLAFAIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1116
Z12711	VDKAKEADDAAEIEIALLPNLTWFQWDAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1117
Z12712	VDKAKEADRAAMEIASLPNLTWDQWAFIOKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1118
Z12715	VDKAKEADKAAVEIAQLPNLTWDQWAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1119
Z12717	VDKAKEADMAALEIAELPNLTWDQWYAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1120
Z12718	VDKAKEADGAAVEIAMLPNLTWDQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1121
Z12719	VDKAKEADDAAYEIAELPNLTWDQWYAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1122
Z12720	VDKAKEADNAAYEIAQLPNLTWDQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1123
Z12721	VDKAKEADAAAIVEIAELPNLTWDQWLAFAISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1124
Z12722	VDKAKEADSAAYEIAGLPNLTWDQWDAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1125
Z12723	VDKAKEADGAAVEIALLPNLTWDQWAAAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1126
Z12724	VDKAKEADSAAEIEIAYLPNLTWDQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1127
Z12725	VDKAKEADLAAIEIAYLPNLTWDQWAAAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1128
Z12726	VDKAKEADDAAFEIAYLPNLTWEQWAFIKKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1129
Z12727	VDKAKEADEAAVEIAVLPNLTWEQWAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1130

Z12728	VDAKYAKEADDAAMEIAMLNPLNTWDQWYAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1131
Z12730	VDAKYAKEADEAAMEIAALNPLNTWDQWYAFIGKIRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1132
Z12732	VDAKYAKEADFAAFEIAELNPLNLTWEQWFAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1133
Z12733	VDAKYAKEADNAAMEIANLPLNLTWAQWAAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1134
Z12734	VDAKYAKEADDAAVEIANLPLNLTWIQWEAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1135
Z12735	VDAKYAKEADDAALEIAQLNPLNLTWQWEAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1136
Z12737	VDAKYAKEADDAAFEIAHLNPLNLTWLQWAAFIKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1137
Z12738	VDAKYAKEADEAAMEIAILLNPLNLTWQWVAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1138
Z12740	VDAKYAKEADLAAMEIAELNPLNLTWQWFAFIYKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1139
Z12741	VDAKYAKEADHAAVEIAILLNPLNLTWAQWMAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1140
Z12742	VDAKYAKEADKAAVEIANLPLNLTWIQWVAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1141
Z12743	VDAKYAKEADKAAFEIAILLNPLNLTWQWYAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1142
Z12744	VDAKYAKEADEAAVEIAELNPLNLTWQWVAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1143
Z12746	VDAKYAKEADRAAVEIAHLNPLNLTWQWFAFIEKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1144
Z12747	VDAKYAKEADGAAMEIAELNPLNLTWQWDVAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1145
Z12749	VDAKYAKEADMAAIEIADLPLNLTWYQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1146
Z12750	VDAKYAKEADKAAVEIAMLPLNLTWQWYAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1147
Z12751	VDAKYAKEADRAAVEIAYLPLNLTWQWVAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1148
Z12752	VDAKYAKEADDAAMEIAWLPLNLTWYQWVAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1149
Z12754	VDAKYAKEADMAAEYIAGLPLNLTWQWVAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1150
Z12755	VDAKYAKEADHAALEIAELNPLNLTWQWAAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1151
Z12756	VDAKYAKEADTAAVEIAMLPLNLTWQWEAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1152
Z12758	VDAKYAKEADEAAEYIAFLNPLNLTWQWAAFIYKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1153
Z12759	VDAKYAKEADSAAYEIAALNPLNLTWQWVAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1154
Z12760	VDAKYAKEADNAAMEIAHLNPLNLTWQWYAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1155
Z12761	VDAKYAKEADKAAFEIAALNPLNLTWVQWMAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1156
Z12762	VDAKYAKEADDAAVEIAHLNPLNLTWQWEAFIFKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1157
Z12763	VDAKYAKEADFAALEIASLPLNLTWAQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1158
Z12765	VDAKYAKEADHAAAMEIAELNPLNLTWLQWHAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKINDSQAPK	1159

Z12766	VDKYAKEADHAAVEIANLPNLTWDQWHAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1160
Z12767	VDKYAKEADKAAFEIAFLPNLTWDQWDAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1161
Z12768	VDKYAKEADLAAFEIALLPNLTWEQWFAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1162
Z12770	VDKYAKEADSAAMEIAVLPNLTWDQWFAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1163
Z12771	VDKYAKEADAAAAEIAADLPNLTWIQWDAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1164
Z12772	VDKYAKEADFAAYEIAADLPNLTWYQWHAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1165
Z12773	VDKYAKEADQAAEYEAADLPNLTWDQWDAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1166
Z12775	VDKYAKEADFAAMEIAADLPNLTWDQWWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1167
Z12776	VDKYAKEADMAAFEIAFLPNLTWDQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1168
Z12777	VDKYAKEADKAAVEIAADLPNLTWDQWQAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1169
Z12778	VDKYAKEADDAAEIAEIAADLPNLTWDQWEAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1170
Z12780	VDKYAKEADVAAVEIAELPNLTWDQWWAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1171
Z12781	VDKYAKEADQAAEIAAALPNLTWDQWDAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1172
Z12782	VDKYAKEADAAAVEIAYLPNLTWDQWFAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1173
Z12783	VDKYAKEADNAAMEIAELPNLTWIQWYAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1174
Z12784	VDKYAKEADQAAEYEAASLPNLTWDQWLAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1175
Z12785	VDKYAKEADGAAMEIAELPNLTWDQWEAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1176
Z12788	VDKYAKEADIAAVEIAGLPNLTWDQWFAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1177
Z12790	VDKYAKEADTAAAEIASLPNLTWDQWEAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1178
Z12791	VDKYAKEADAAAFAEIAALPNLTWFQWFAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1179
Z12792	VDKYAKEADHAAAMEIAMLPNLTWDQWFAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1180
Z12793	VDKYAKEADRAAFEIAELPNLTWDQWEAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1181
Z12794	VDKYAKEADSAAMEIAADLPNLTWDQWLAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1182
Z12795	VDKYAKEADTAAVEIAALPNLTWDQWQAFILKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1183
Z12797	VDKYAKEADNAAEYEAIALPNLTWDQWFAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1184
Z12798	VDKYAKEADAAAFAEIAELPNLTWIQWHAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1185
Z12799	VDKYAKEADSAALEIAGLPNLTWVQWWAFIGKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1186
Z12800	VDKYAKEADWAAVEIANLPNLTWDQWDAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1187
Z12801	VDKYAKEADKAALEIAQLPNLTWDQWWAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1188

Z12802	VDAKYAKEADMAAVEIAIALLPNLTWQWFAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1189
Z12803	VDAKYAKEADVAAVEIAIALLPNLTWQWEAFINKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1190
Z12804	VDAKYAKEADNAAFELAFIPLNLTWQWFAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1191
Z12805	VDAKYAKEADAAAAMEIAVLNLTWQWFAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1192
Z12807	VDAKYAKEADIAAFEIAALPNLTWEQWFAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1193
Z12808	VDAKYAKEADRAAVEIAIALLPNLTWQWHAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1194
Z12809	VDAKYAKEADAAAAYEIAYLNLTWQDAFIIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1195
Z12810	VDAKYAKEADNAAEIAELPNLTWQWAAFIIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1196
Z12813	VDAKYAKEADGAAMEIAGLPNLTWQWFAFIMKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1197
Z12814	VDAKYAKEADWAAMEIAIALLPNLTWQWEAFIILKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1198
Z12815	VDAKYAKEADNAAMEIAALPNLTWEQWDAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1199
Z06260	VDAKYAKEHDYAWFEIWAIPNLTWQWQATAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1200
Z06267	VDAKYAKEMNRAQIEIWLNLTWQWQWAFIOKLIIDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1201
Z06270	VDAKYAKEADDAWWEIWAIPNLTWQWQKAFIVKLLDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1202
Z06271	VDAKYAKEAGDAQLEIWFNLTWQWQWAFIRKLIIDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1203
Z06274	VDAKYAKEGDQAAMEIAELPNLTWQWFAFIIKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1204
Z06278	VDAKYAKEADDAAVEIAALPNLTWQWRAFIKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1205
Z06282	VDAKYAKEADQAAMEIATLPNLTWQWFAFIKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1206
Z06290	VDAKYAKEADNAALEIADLPNLTWQWNAFIOKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1207
Z06291	VDAKYAKEADDAAFEIAALPNLTARQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1208
Z06447	VDAKYAKETTYAWFEIWSLPNLTWQWQIAFIOKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1209
Z06448	VDAKYAKEADYAWFEIWSLPNLTWQWQSAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1210
Z06449	VDAKYAKEYDEAWFEIWLNLTWQWQWAFIHKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1211
Z06451	VDAKYAKEADEAWFEIWLNLTWQWQWAFITKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1212
Z06453	VDAKYAKEADFAWFEIWAIPNLTWQWQWAFIRKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1213
Z06455	VDAKYAKEMDNAQWEIWLNLTWQWQWAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1214
Z06461	VDAKYAKEMDDAWWEIWDLPNLTWQWQWAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1215
Z06462	VDAKYAKEWGEAQLEIWLNLTWQWQWAFIWKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK	1216
Z10199	AEAKYAKEADQAAMEIATLPNLTWQWQWAFIAKLRDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPKVD	1217

Z12876	AEAKYAKEADDAAVEIADLPNLTWDQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1218
Z14253	AEAKYAKEADDAAVEIASLPNLTWDQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1219
Z14254	AEAKYAKEADDAAVEIAALPNLTWDQWYAFISKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1220
Z14255	AEAKYAKEADQAAVEIADLPNLTWAQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1221
Z15166	AEAKYAKEADDAAVEIASLPNLTWAQWYAFIQKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1222
Z04726	VDAKYAKELGWATWEIFNLPNLTGVQVKAFIDKLRDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK	1223
PP013	LAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAIILAALP	1224
PEP07843	GSSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAIILAALP	1225
hil-17A	MIVKAGITIPRNPFCPNSDKNFRTVMVNLNIHNRNTNPKRSSDYNNRSTSPWNLHRNEDPERYP SVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHV A	1226
mll-17A	AAIIPQSSACPNTAKDFLQNVKVLKVFNSLGAKVSSRRPSDYLNRRSTSPWTLHRNEDPDRYPSVIV EAQCRHORCVNAEGKLDHMHNSVLIQQEILVLKREPESCPFTFRVEKMLVGVGCTCVASIVRQAA	1227
hil-17F	MRKIPKVGHTFFQKPESCPVPVGGSMKLDIGIINENQVMSMRNIESRSTSPWNYTWTWDPNRYPSEV VQAQCRNLGCINAQKEDI SMNSVPIQQEITLVVRRKHQGCVSFQLEKVLTVVGCTCVTPIVHHVQ	1228
cil-17A	MTPGKTSVLVLLLLLLEAIVKAGIAIPRNSGCPNSDKNFRTVMVNLNIHNRNTNPKRSSDYNN RSTSPWNLHRNEDPERYPSVIVWEAKCRHLGCVKADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCPNSFRLE KILVSVGCTCVTPIVHHVA	1229
rml-17A	GIAIPRNPFCPNSDKNFRTVMVNLNIHNRNTNPKRSSDYNNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIVWE AKRHLGCVNADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA	1230

Figura 2

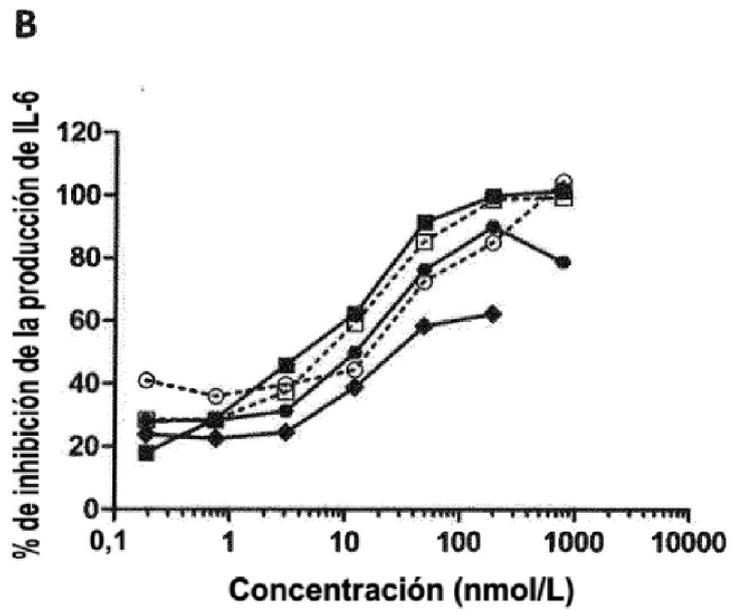
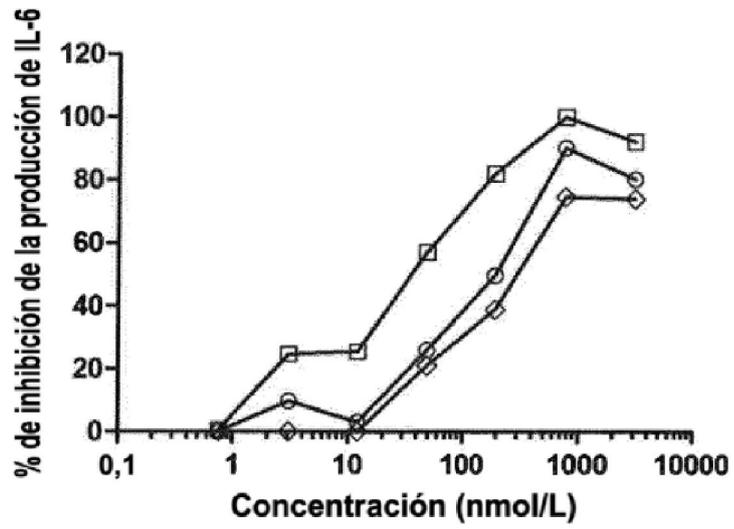


Figura 3

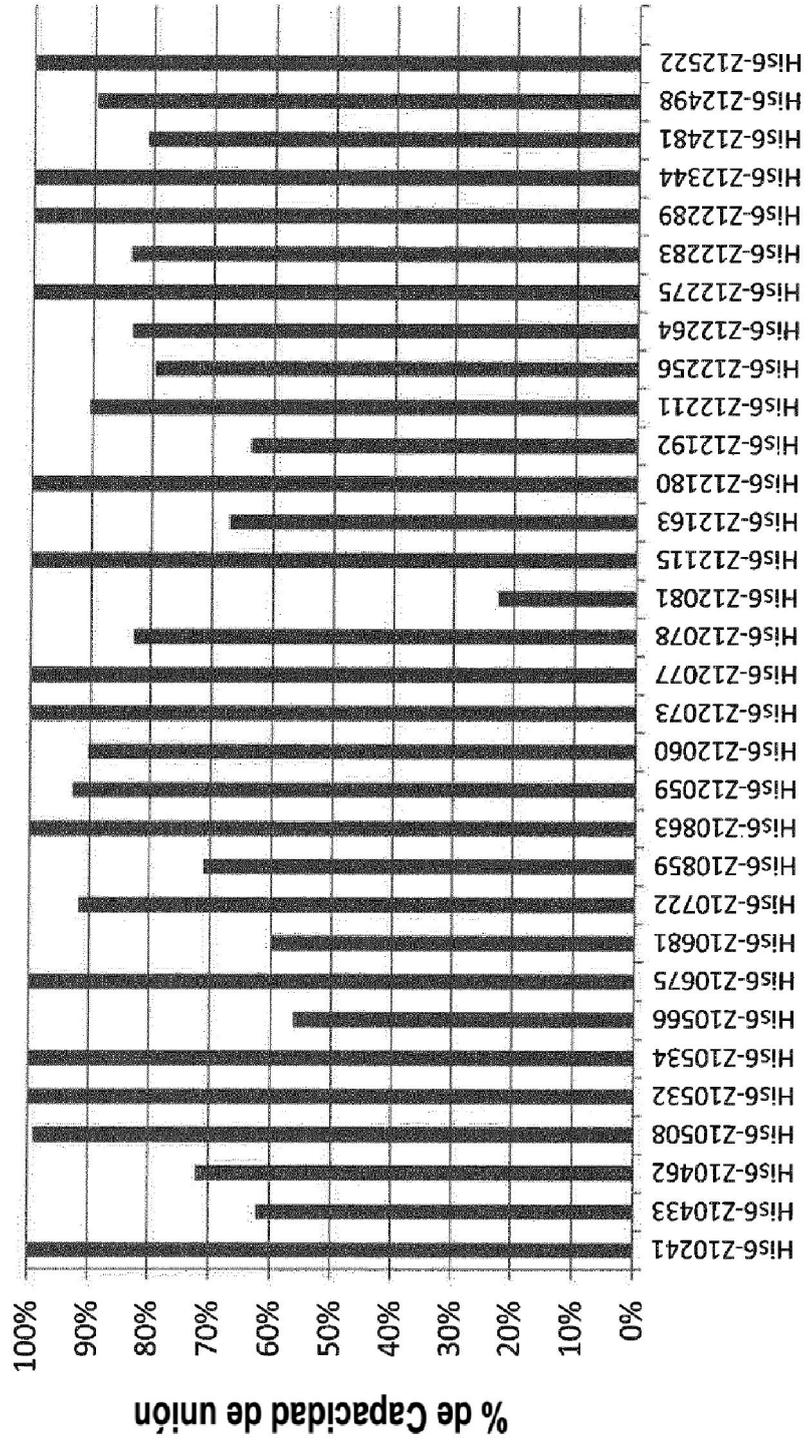


Figura 4 A

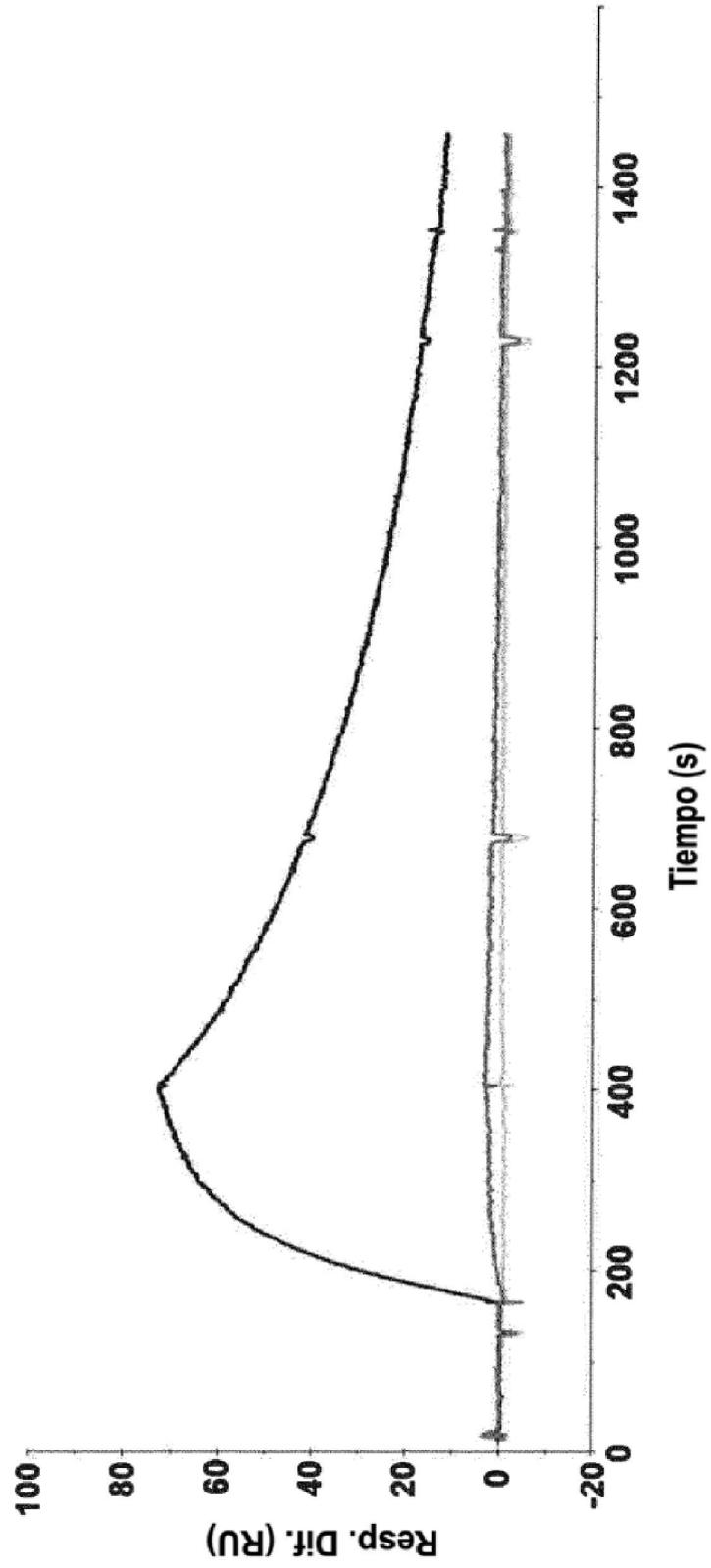


Figura 4B

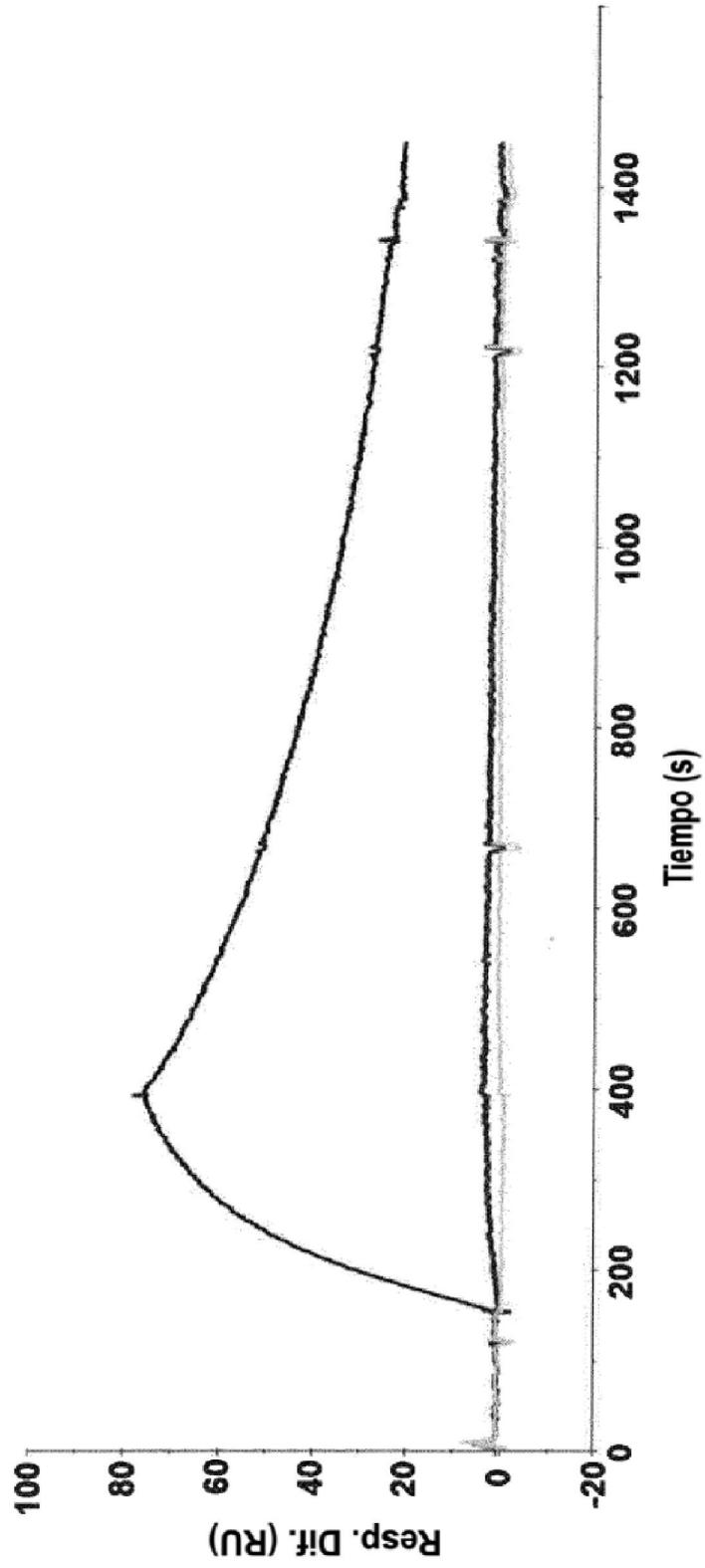


Figura 4C

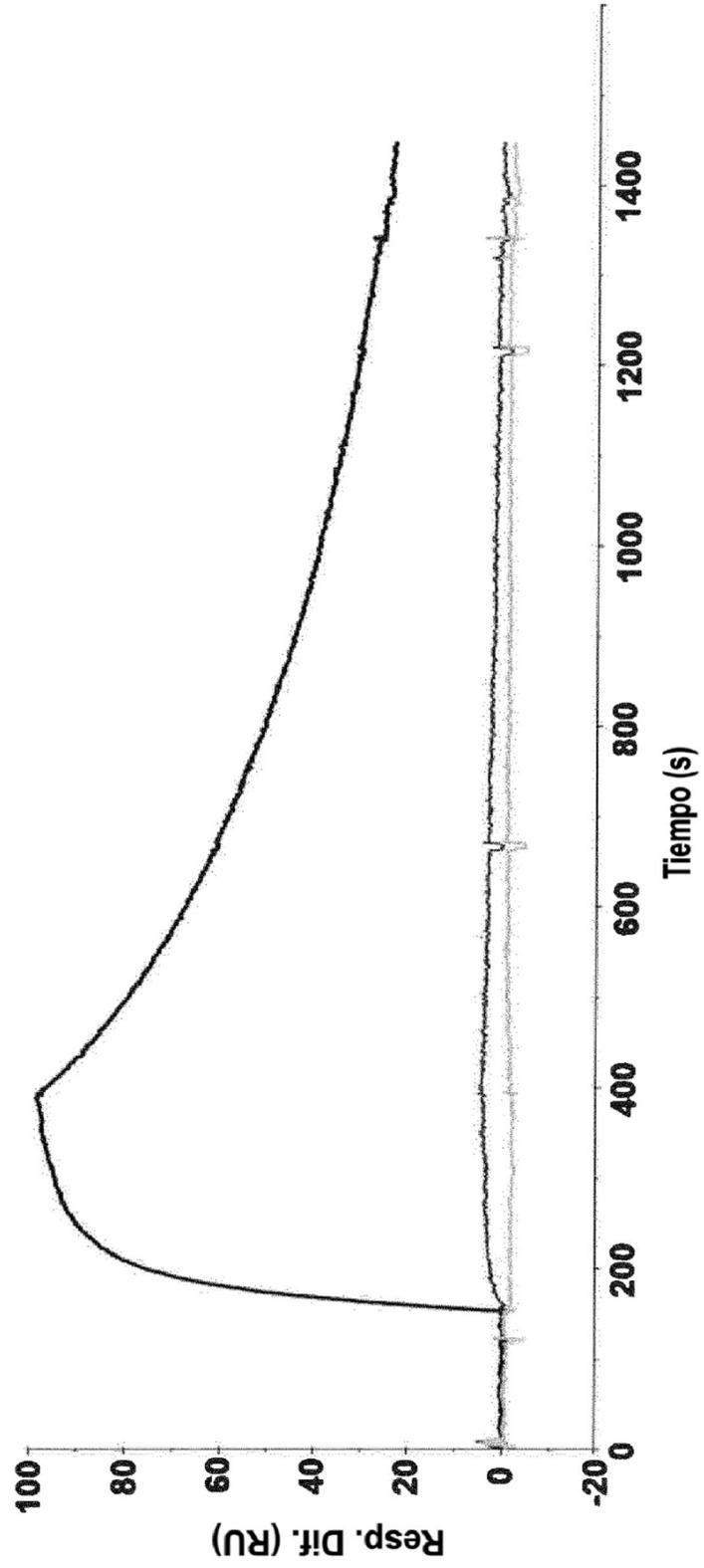


Figura 5

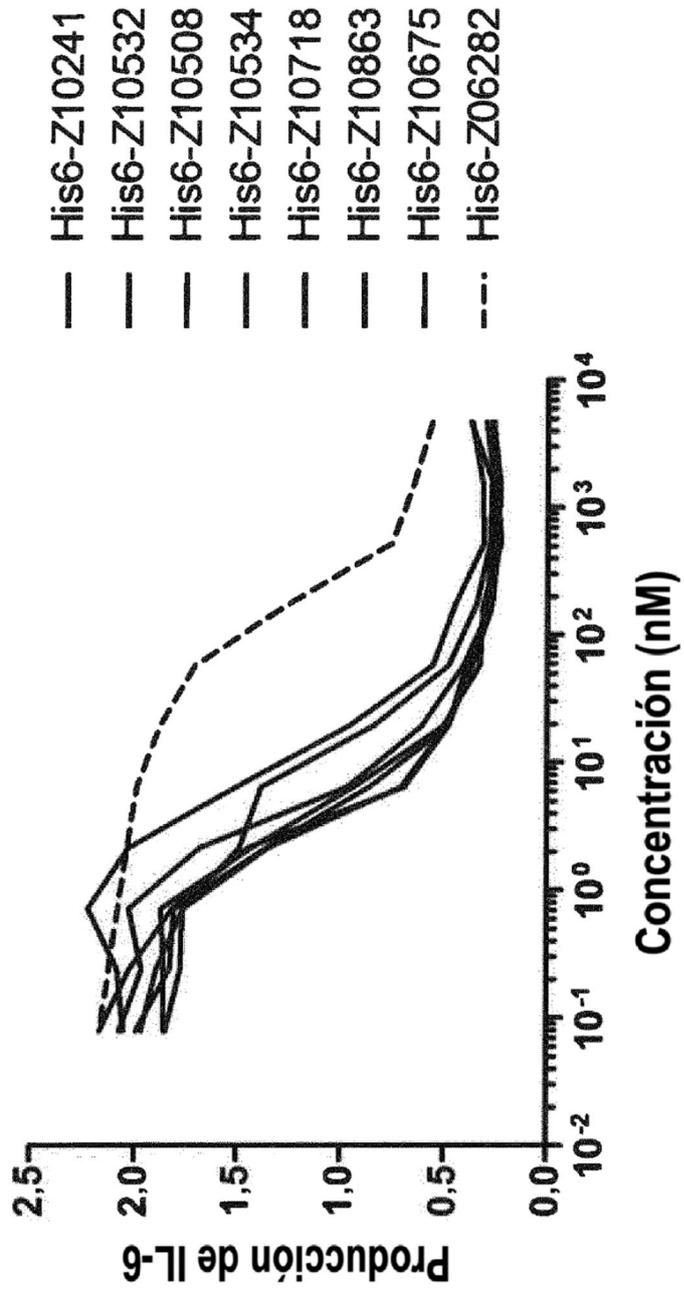


Figura 6 A-C

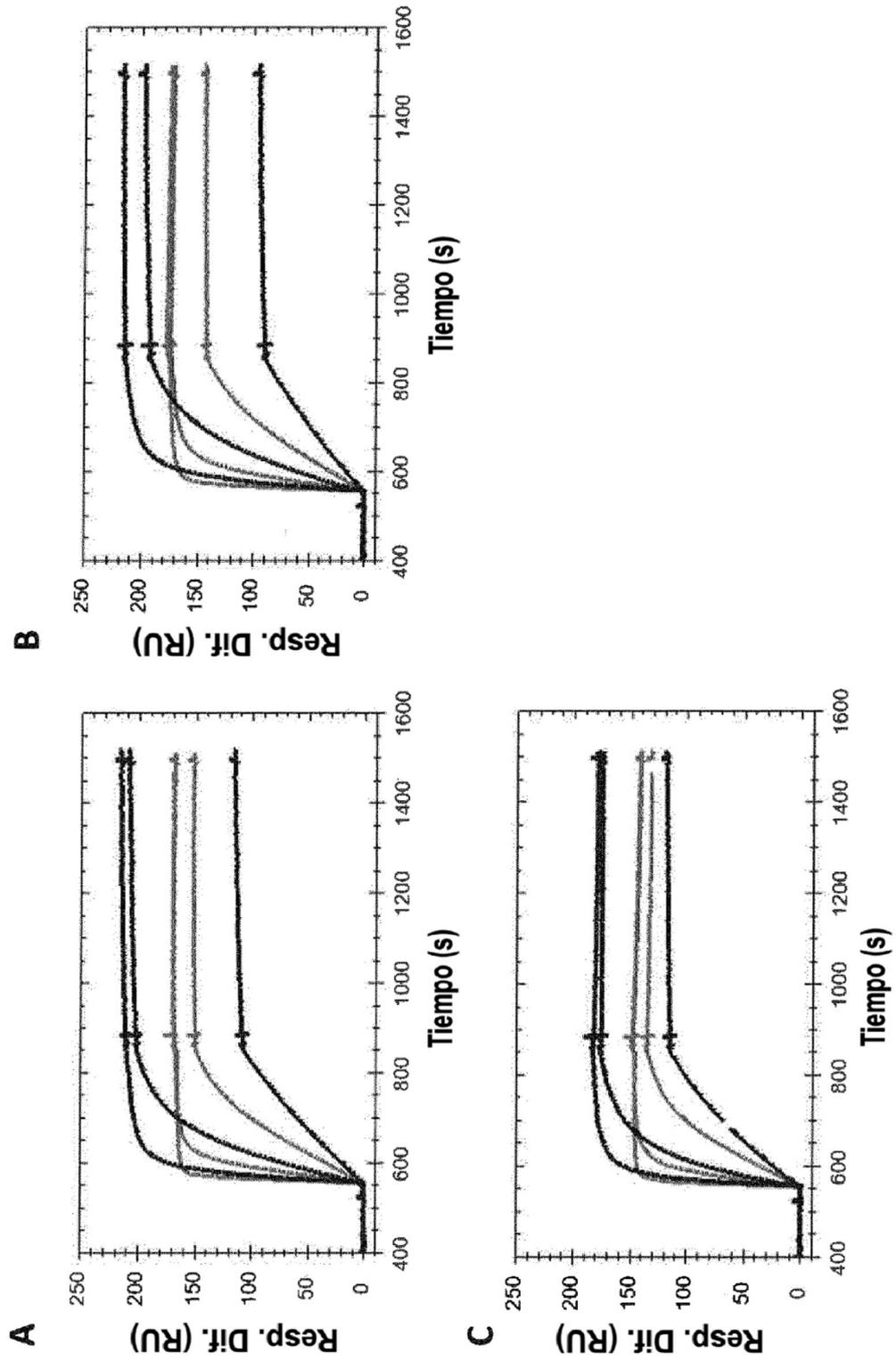


Figura 7A-B

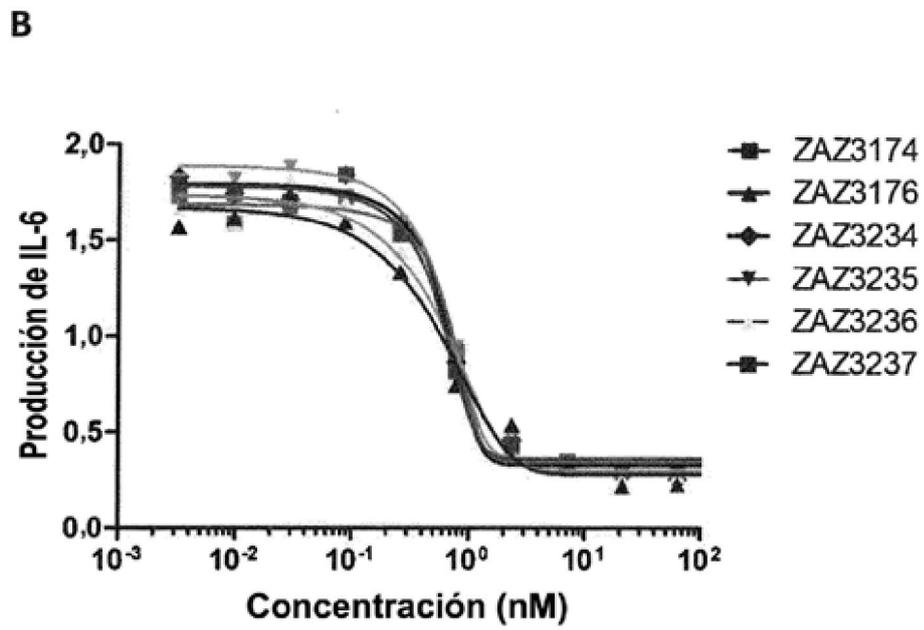
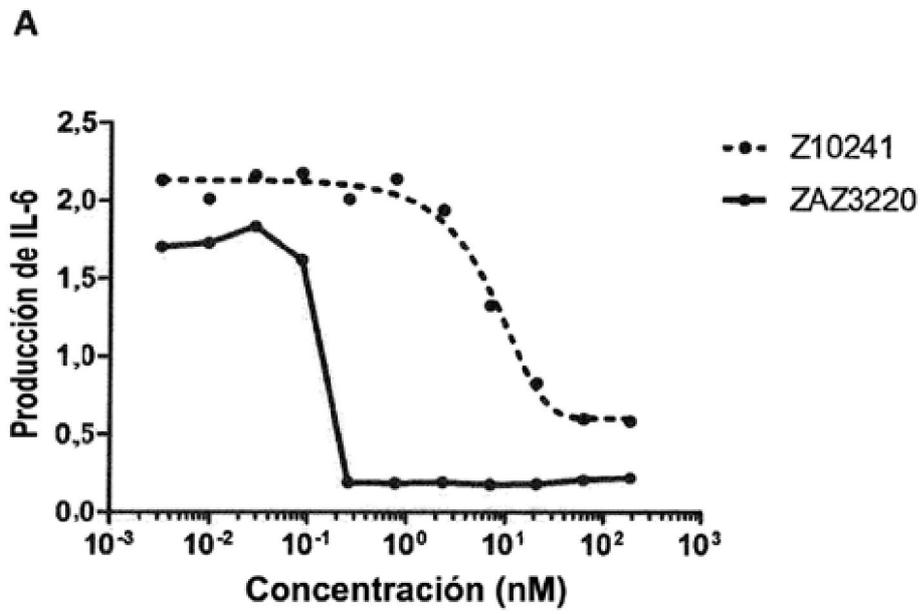


Figura 8A

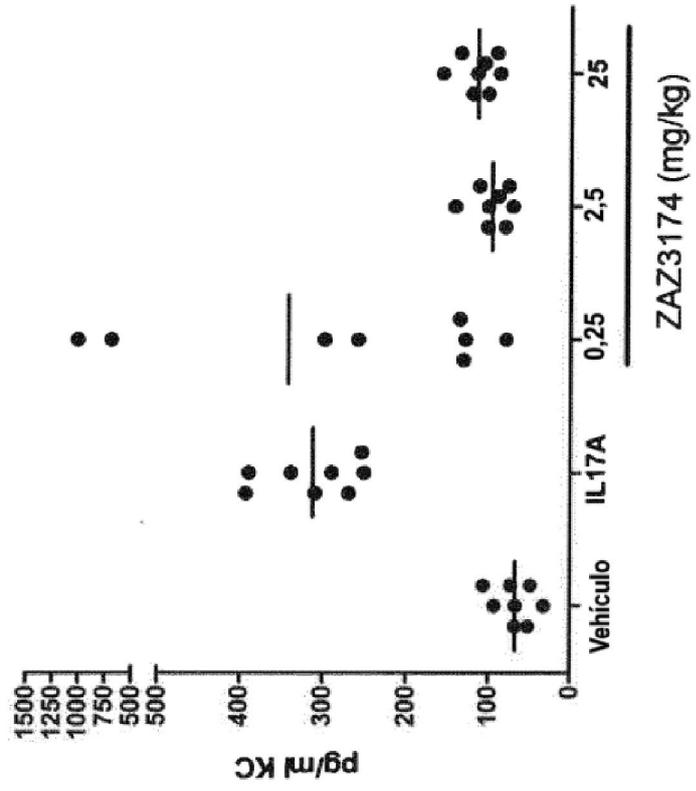


Figura 8B

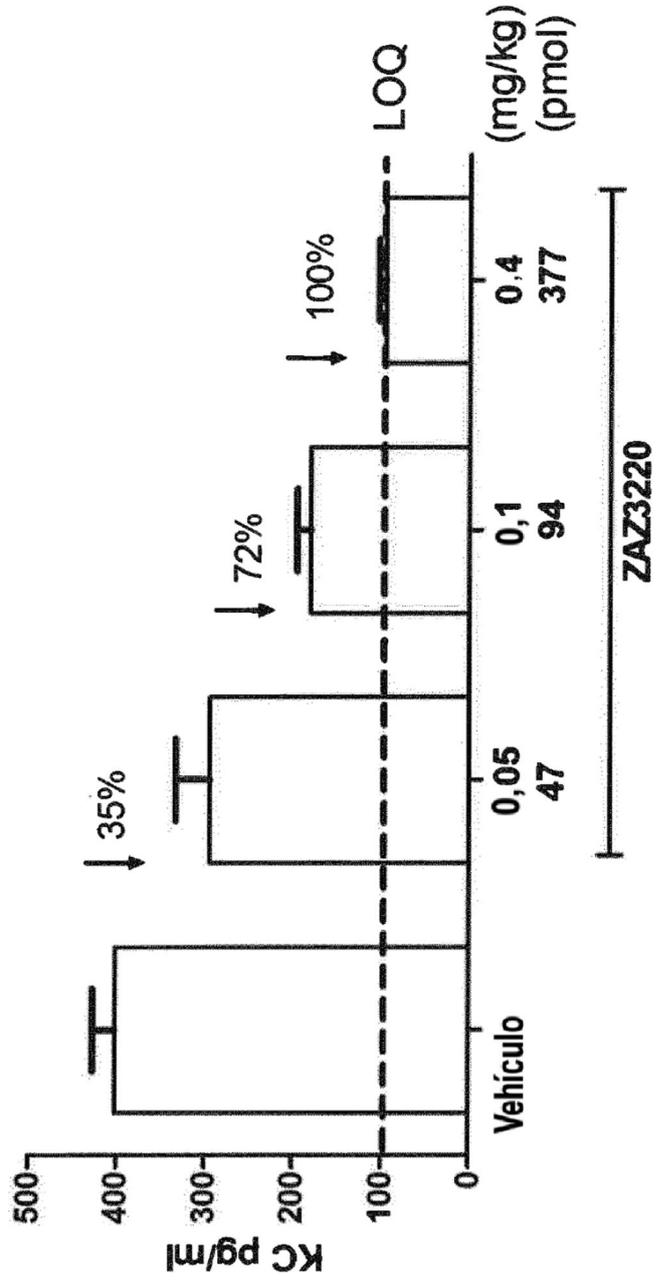
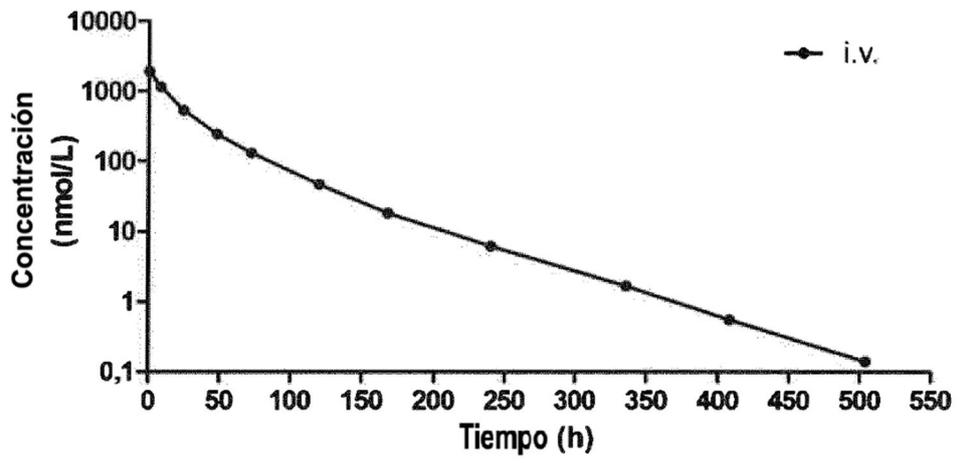


Figura 9A-B

**A**



**B**

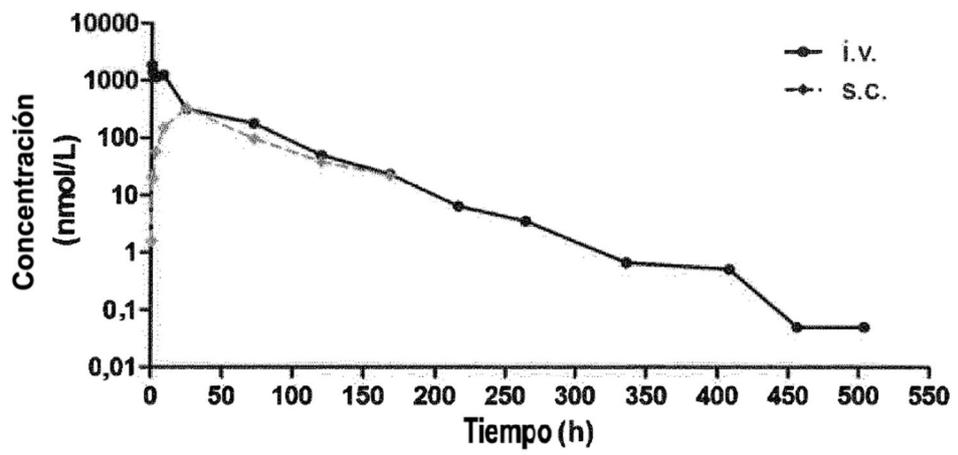


Figura 10

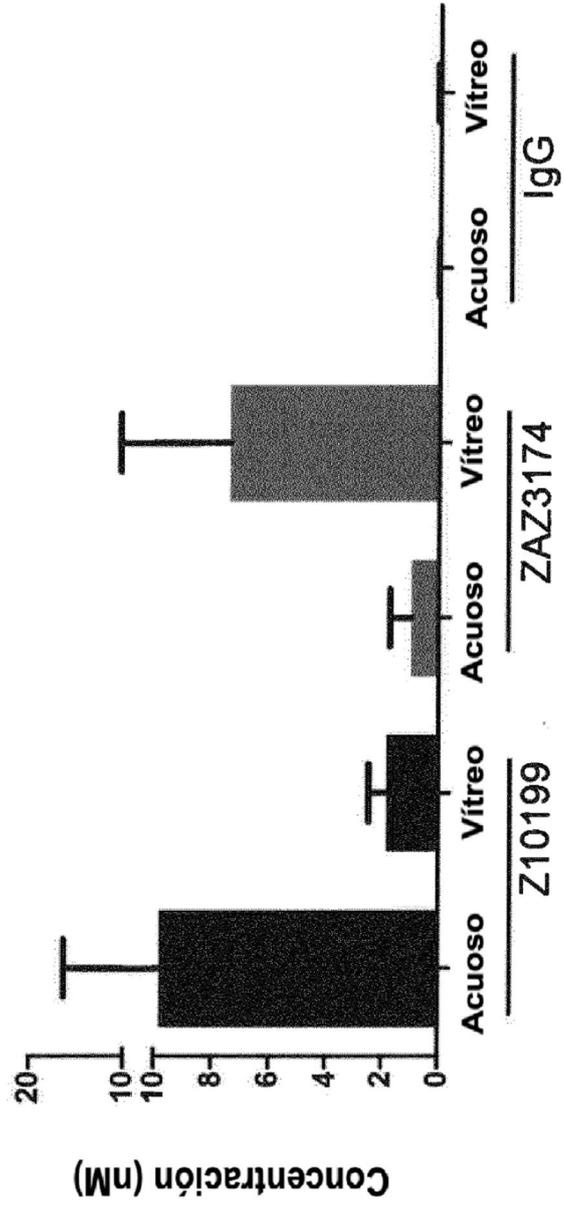


Figura 11A-B

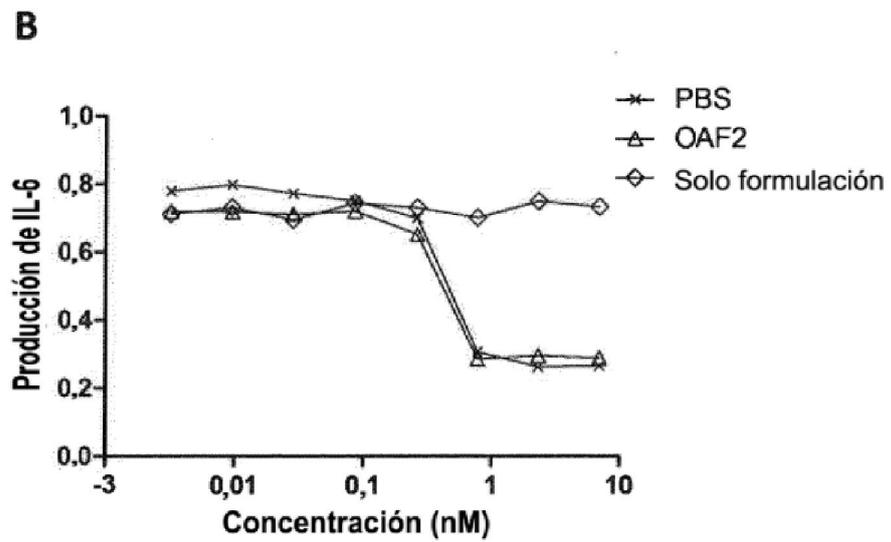
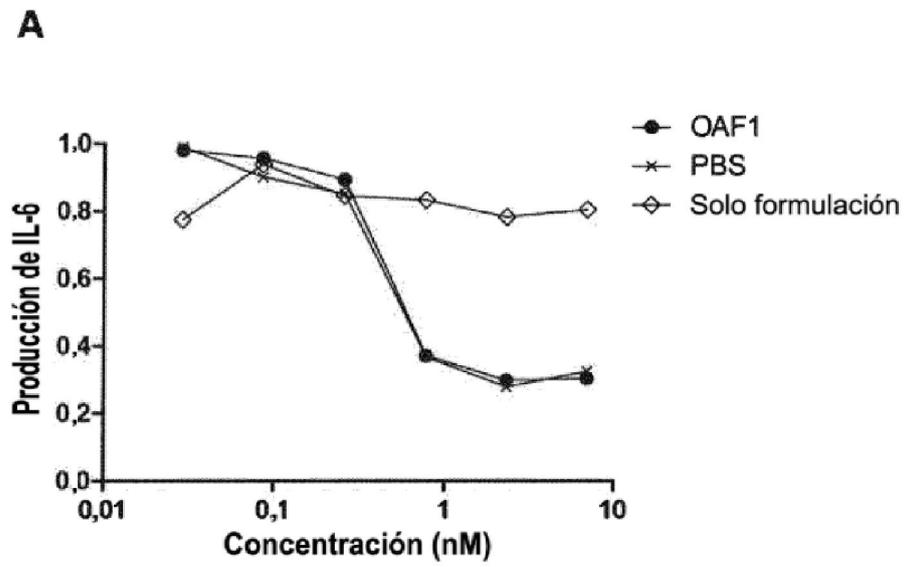


Figura 12

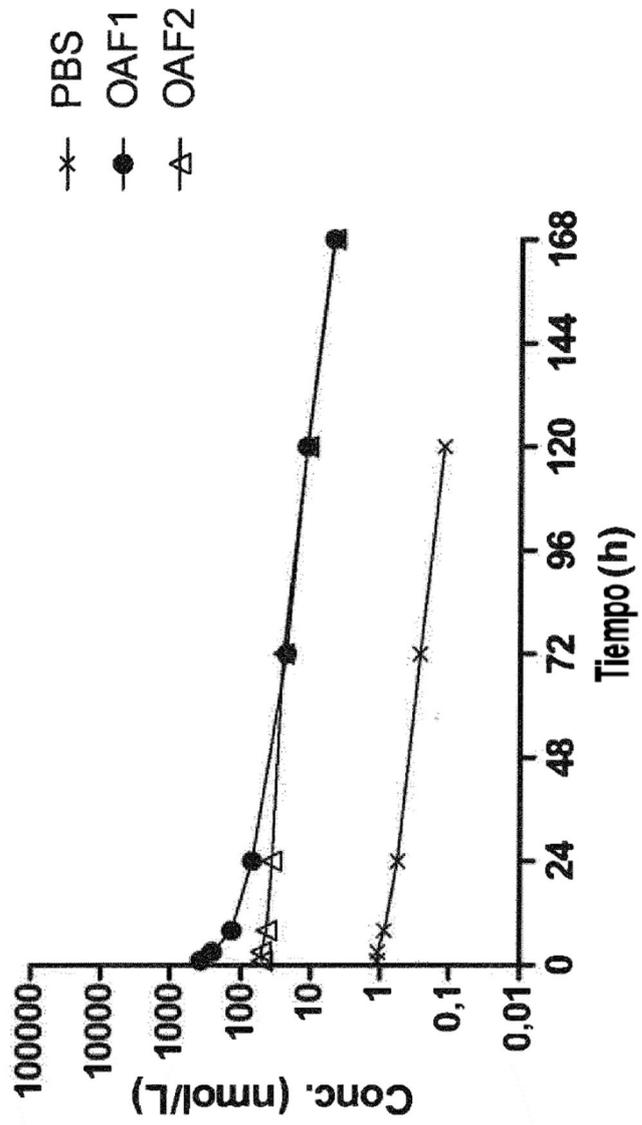
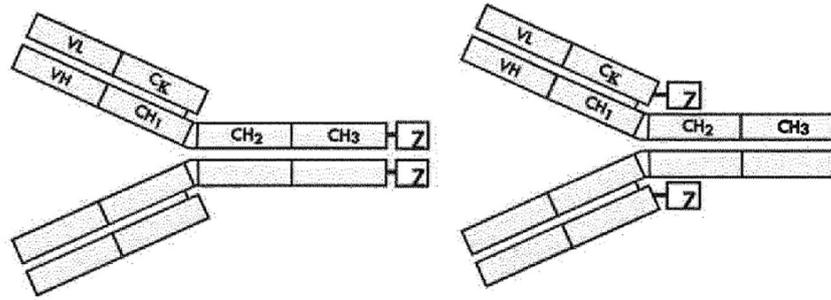


Figura 13A-B

**A**



**B**

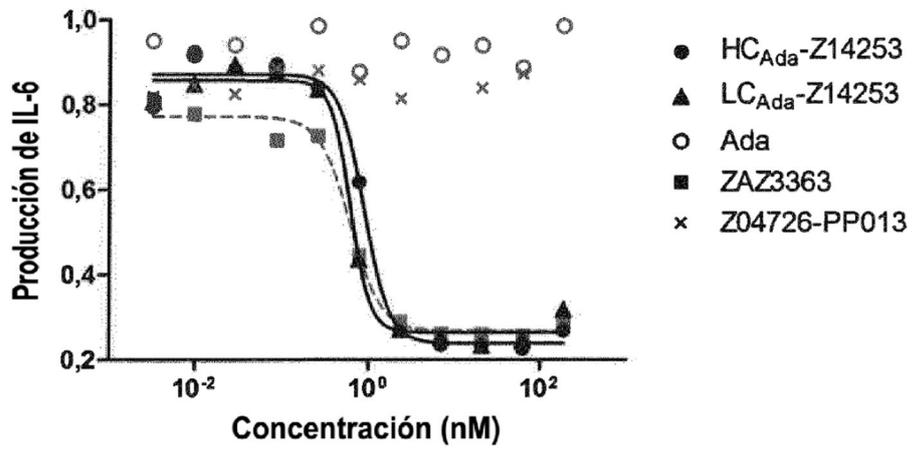


Figura 13C-D

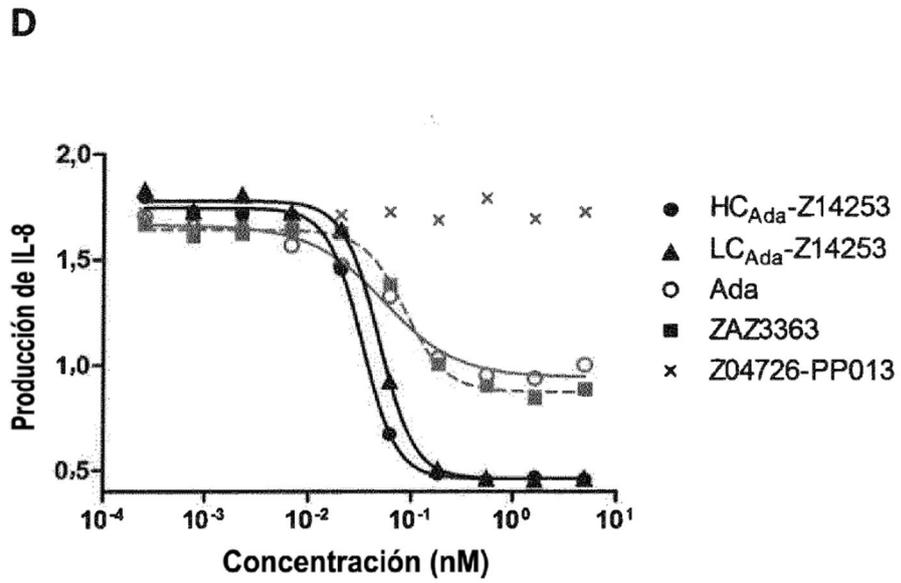
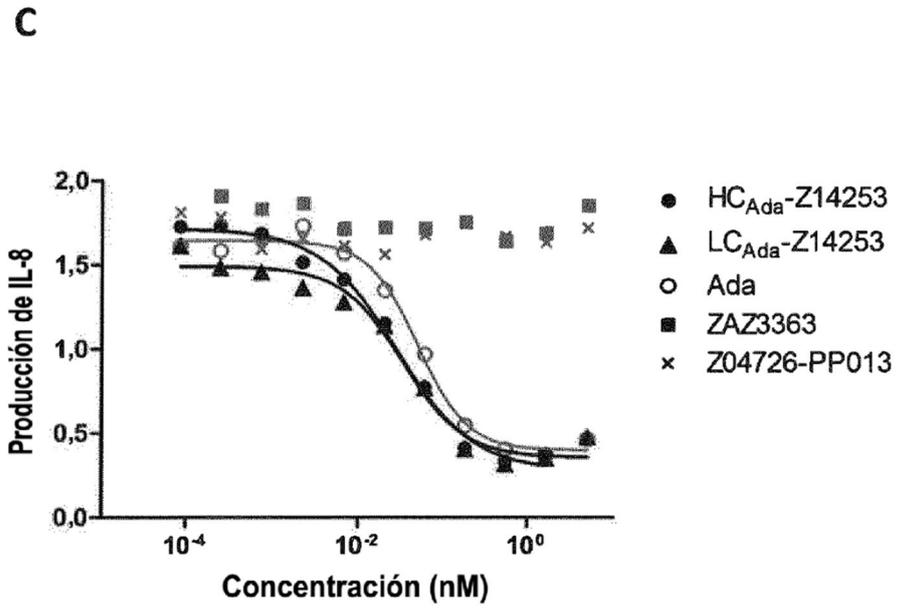


Figura 14A-B

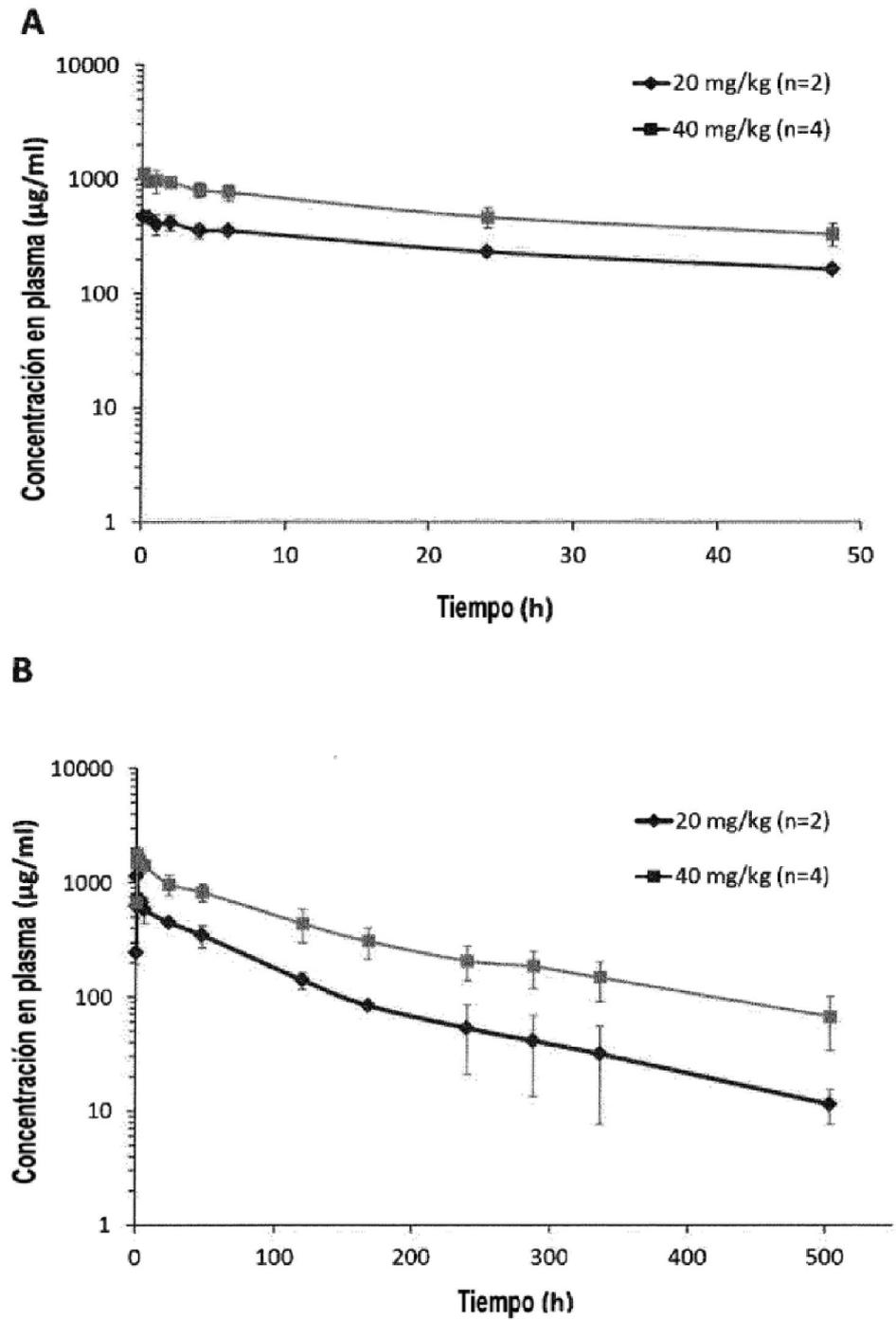


Figura 15

