

PLATAFORMA DE ALMACÉN DE NUDO DE CISTINA**REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de patente estadounidense con N.º de serie 62/219,063, presentada el 15 de setiembre de 2015, que se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad.

PRESENTACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS EN EL ARCHIVO DE TEXTO
ASCII

El contenido del siguiente archivo de texto ASCII presentado se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad; un formulario legible por computadora (CRF, por sus siglas en inglés) del Listado de Secuencias (nombre del archivo: 146392026840SEQLIST.txt, fecha de registro: 15 de setiembre de 2016, tamaño: 183 KB).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El diseño y la genomanipulación de nuevas proteínas a partir de armazones proteicos alternativos ha sido un campo emergente en la última década con una amplia gama de aplicaciones que van desde la biología estructural y herramientas para generación de imágenes hasta reactivos terapéuticos que se están evaluando actualmente en la clínica (HK Binz *et al.*, *Nat Biotechnol* 23, 1257-1268, 2005; HK Binz and A Pluckthun, *Curr Opin Biotechnol* 16, 459-469, 2005; SS Sidhu and S Koide, *Curr Opin Struct Biol* 17, 481-487, 2007; A Skerra, *Curr Opin Biotechnol* 18, 295-304, 2007; C Gronwall and S Stahl, *J Biotechnol* 140, 254-269, 2009; T Wurch *et al.*, *Trends Biotechnol* 30, 575-582, 2012; S Banta *et al.*, *Annu Rev Biomed Eng* 15, 93-113, 2013).

Las propiedades físicas deseables de posibles moléculas de

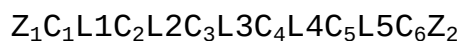
armazón alternativas incluyen gran estabilidad térmica y reversibilidad del plegado y despliegue térmico. Se han aplicado diversos métodos para aumentar la estabilidad térmica aparente de proteínas y enzimas, incluido el diseño racional
5 basado en la comparación con secuencias termoestables con gran similitud, diseño de puentes disulfuro de estabilización, mutaciones para aumentar la propensión de la hélice α , genomanipulación de puentes salinos, alteración de la carga superficial de la proteína, evolución orientada y composición
10 de secuencias consenso (Lehmann and Wyss, Cur Open Biotechnology 12, 371-375, 2001).

Los péptidos del nudo de cistina vienen de una amplia gama de fuentes y exhiben actividades farmacológicas diversas. Tienen aproximadamente 30-50 aminoácidos de longitud y contienen seis
15 residuos cisteína conservados que forman tres enlaces disulfuro. Uno de los disulfuros penetra el macrociclo que forman los otros dos disulfuros y sus esqueletos que se interconectan, proporcionando así una topología de nudo característica con múltiples bucles expuestos en la superficie.
20 Los bucles se definen como las regiones de aminoácido que flanquean los seis residuos cisteína conservados y son de naturaleza muy variable. Además, la disposición única de los enlaces disulfuro hace que los péptidos del nudo de cistina sean muy estables ante de la degradación térmica, proteolítica
25 y química.

Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar moléculas similares a anticuerpos pequeñas, estables, artificiales para una variedad de aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico, tales como para enfermedades y trastornos oculares. La presente
30 invención satisface estas y otras necesidades.

BREVE COMPENDIO DE LA INVENCION

En determinadas modalidades, se proporciona en la presente un péptido de nudo de cistina (CKP, por sus siglas en inglés) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A, por sus siglas en inglés), donde
 5 el CKP comprende la estructura de armazón de cistina:



donde:

Z_1 y Z_2 son cualquier aminoácido;

10 L1 es el Bucle 1 y tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en: $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ (SEQ ID NO: 2), $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ (SEQ ID NO: 3), $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ (SEQ ID NO: 4), $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (SEQ ID NO: 5) y $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ (SEQ ID NO: 6), donde cada uno de $X_1 - X_{10}$ es cualquier aminoácido;

15 L2 es el Bucle 2 y tiene la estructura: $X_1X_2X_3X_4X_5$ (SEQ ID NO: 7), donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido o un aminoácido no natural;

L3 es el Bucle 3 y tiene la estructura: $X_1X_2X_3$, donde cada uno de $X_1 - X_3$ es cualquiera aminoácido o un aminoácido no natural;

20 L4 es el Bucle 4 y tiene la estructura: X_1 , donde X_1 es cualquier aminoácido o un aminoácido no natural;

L5 es el Bucle 5 y tiene la estructura: $X_1X_2X_3X_4X_5$ (SEQ ID NO: 7), donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido o un aminoácido no natural;

25 donde el aminoácido no natural se selecciona del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina y L-4-fluorofenilalanina;
 y

30 donde el CKP se une a VEGF-A con una afinidad de 500 pM o mejor.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican

en) cualquiera de las modalidades anteriores, el (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A tiene una conectividad de enlace disulfuro alterada en referencia a una proteína inhibidora de la tripsina EETI-II de *Ecballium elaterium* natural que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 1; donde la conectividad de enlace disulfuro alterada es C1-C4, C2-C3 y C5-C6.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el aminoácido no natural se selecciona del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptofano, L-3-fluorotirosina, —L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridilalanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-terc-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-hidroxi-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-

serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida.

- 5 En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, Z_1 y/o Z_2 es más que un aminoácido, o un aminoácido no natural. En determinadas modalidades, Z_2 es dos aminoácidos. En determinadas modalidades, Z_2 es tres aminoácidos.
- 10 En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, Z_1 y/o Z_2 es G. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L1, X_3 no es I; X_5 no es M; y/o X_6 no es R. En determinadas modalidades de
- 15 acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L1: X_1 es un aminoácido seleccionado de P, Q, R, T, V, D, N, K, L y X; X_2 es un aminoácido seleccionado de T, D, L, V, I, R, P, N y X; X_3 es un aminoácido seleccionado de T, P, M, L, S, F, R y X; X_4 es un aminoácido
- 20 seleccionado de R, T, Q, D, W, L, E, S, K y X; X_5 es un aminoácido seleccionado de F, P, V, E, K, L, I y X; X_6 es un aminoácido seleccionado de K, N, F, P, L, Y, T, D, M y X; X_7 es un aminoácido seleccionado de Q, W, H y X; y/o X_8 es un aminoácido seleccionado de Y, A, G, D, E, W, S y X, donde X es
- 25 un aminoácido no natural que se selecciona del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina y L-4-fluorofenilalanina. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican
- 30 en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L1: X_9 es un aminoácido seleccionado de L, I, V, D, E y X, donde X es un aminoácido no natural que se selecciona del grupo que consiste

en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina y L-4-fluorofenilalanina. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L1: X₁₀ es un aminoácido seleccionado de Y, T, M, N, F y X, donde X es un aminoácido no natural que se selecciona del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina y L-4-fluorofenilalanina.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, X es un aminoácido no natural que se selecciona del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptofan, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-

hidroxi-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil
 5 glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L5, cada uno
 10 de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido con la excepción de que X_2 no es prolina (P). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L5, cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido con la excepción de que X_4 no es glicina (G). En determinadas
 15 modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L5: X_1 es un aminoácido seleccionado de G, Q, H, R, L y Q; X_2 es un aminoácido seleccionado de P, M, W, Y, F, L y H; X_3 es un aminoácido seleccionado de N, F, H e Y; X_4 es un aminoácido seleccionado
 20 de G, Q, D, N, K, H, E y S; y/o X_5 es un aminoácido seleccionado de F, S y T.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, L1 tiene la estructura $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ (SEQ ID NO: 4), donde: X_1 es un
 25 aminoácido seleccionado de P, Q y R; X_2 es un aminoácido seleccionado de T, L y D; X_3 es un aminoácido seleccionado de T, M y L; X_4 es un aminoácido seleccionado de R, Q y D; X_5 es un aminoácido seleccionado de F, P y V; X_6 es un aminoácido seleccionado de K y F; X_7 es un aminoácido seleccionado de Q y
 30 W; y X_8 es un aminoácido seleccionado de Y, G y D. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, L1 tiene la

estructura $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ (SEQ ID NO: 6), donde: X_1 es un aminoácido seleccionado de Q, R, T y V; X_2 es un aminoácido seleccionado de T y D; X_3 es P; X_4 es un aminoácido seleccionado de T y W; X_5 es un aminoácido seleccionado de F, E, P y K; X_6 es un aminoácido seleccionado de N y P; X_7 es un aminoácido seleccionado de W y H; X_8 es un aminoácido seleccionado de A, D, E y W; X_9 es un aminoácido seleccionado de L e I; y X_{10} es un aminoácido seleccionado de Y, T, M y N.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L5: X_1 es un aminoácido seleccionado de G, H y Q; X_2 es un aminoácido seleccionado de P, M, W e Y; X_3 es un aminoácido seleccionado de N e Y; X_4 es un aminoácido seleccionado de G, Q y S; y X_5 es un aminoácido seleccionado de F y S.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, L1 tiene la estructura $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ (SEQ ID NO: 4), donde: X_1 es un aminoácido seleccionado de D, Q, N y K; X_2 es un aminoácido seleccionado de V, I, R, L y P; X_3 es un aminoácido seleccionado de L, S, M, T y F; X_4 es un aminoácido seleccionado de Q, L y E; X_5 es P; X_6 es un aminoácido seleccionado de F, L e Y; X_7 es W; y X_8 es G.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L5: X_3 es Y; X_5 es S; y X_1 , X_2 y X_4 son cada uno cualquier aminoácido, con la excepción de que X_1 no es G, X_2 no es P, X_4 no es G y/o X_5 no es F. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L5: X_1 es un aminoácido seleccionado de H, L, R y Q; X_2 es un aminoácido seleccionado de W, F e Y; X_3 es Y; X_4 es un aminoácido seleccionado de Q, N, K, H y E; y X_5 es S.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican

en) cualquiera de las modalidades anteriores, L1 tiene la estructura $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ (SEQ ID NO: 6), donde: X_1 es un aminoácido seleccionado de K, Q, L y R; X_2 es un aminoácido seleccionado de N y D; X_3 es un aminoácido seleccionado de P y L; X_4 es un aminoácido seleccionado de L, T, S y K; X_5 es un aminoácido seleccionado de F, V, I y L; X_6 es un aminoácido seleccionado de N y D; X_7 es W; X_8 es un aminoácido seleccionado de A y S; X_9 es un aminoácido seleccionado de L, V, E y D; y X_{10} es un aminoácido seleccionado de Y e F.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L5: X_1 es Q; X_2 es un aminoácido seleccionado de L, F, M y H; X_3 es un aminoácido seleccionado de F, Y e H; X_4 es un aminoácido seleccionado de D, Q, N y K; y X_5 es un aminoácido seleccionado de S y T.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L2, X_1 es K, X_2 es Q, X_3 es D, X_4 es S y X_5 es D.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, L1 tiene la estructura $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ (SEQ ID NO: 4), donde: X_5 es P; X_7 es W; X_8 es G; y donde X_1 , X_2 , X_3 , X_4 y X_6 son cada uno cualquier aminoácido, don la excepción de que X_1 no es P, X_2 no es R, X_3 no es I y/o X_6 no es R. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, L1 tiene la estructura $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ (SEQ ID NO: 4), donde: X_1 es un aminoácido seleccionado de N y D; X_2 es un aminoácido seleccionado de I y V; X_3 es un aminoácido seleccionado de M y L; X_4 es un aminoácido seleccionado de L, Q, D y K; X_5 es P; X_6 es un aminoácido seleccionado de F, Y, T, L y M; X_7 es W; y X_8 es G.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican

en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L5: X_1 es un aminoácido seleccionado de Q, H, L y R; X_2 es un aminoácido seleccionado de Y e W; X_3 es Y; X_4 es un aminoácido seleccionado de Q y N; y X_5 es S. En determinadas modalidades de acuerdo con
 5 (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L5: X_3 es Y; X_5 es S; y X_1 , X_2 y X_4 son cada uno cualquier aminoácido, con la excepción de que: X_1 no es G, X_2 no es P y/o X_4 no es G.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican
 10 en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L2: X_1 es un aminoácido seleccionado de G o E; X_2 es un aminoácido seleccionado de Q, L, P, R, E y M; X_3 es un aminoácido seleccionado de S, D y N; X_4 es un aminoácido seleccionado de F, Y, L, M e I; y/o X_5 es un aminoácido seleccionado de E, D,
 15 Q, L y S.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L3, X_1 es L, X_2 es A y X_3 es G.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican
 20 en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L4, X_1 es V o F.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L5, cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido con la excepción de que X_2
 25 no es prolina (P).

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L5, cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido con la excepción de que X_4 no es glicina (G).

30 En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L5: X_1 es cualquier aminoácido excepto G; X_2 es cualquier aminoácido

excepto P; X_3 es cualquier aminoácido excepto N; X_4 es cualquier aminoácido excepto G; y/o X_5 es cualquier aminoácido excepto F.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, L1 tiene la estructura $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ (SEQ ID NO: 4), donde X_1 es un aminoácido seleccionado de N, D y X; X_2 es un aminoácido seleccionado de I, V y X; X_3 es M o X; X_4 es un aminoácido seleccionado de L, Q y X; X_5 es P o X; X_6 es F, Y o X; X_7 es W o X; y X_8 es G o X, donde X es un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina y L-4-fluorofenilalanina.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, X es un aminoácido no natural que se selecciona del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptofan, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridilalanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-

alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-
 5 hidroxil-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster
 10 glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L3, cada uno de X_1 - X_3 es cualquier aminoácido o aminoácido no natural con
 15 la excepción de que X_1 no es Leucina (L), X_2 no es Alanina (A) y X_3 no es glicina (G), donde el aminoácido no natural se selecciona del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina y L-4-
 20 fluorofenilalanina. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L3: X_1 es un aminoácido seleccionado de M, F, L V y X; X_2 es un aminoácido seleccionado de S, N, Q, I, Y, E, V, T y X; X_3 es un aminoácido seleccionado de D, Q, T, N,
 25 E, R y X, donde X es un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina y L-4-fluorofenilalanina.

30 En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L4, X_1 es cualquier aminoácido excepto V o un aminoácido no natural

seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-
 , L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-
 naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina y L-4-
 fluorofenilalanina. En determinadas modalidades de acuerdo con
 5 (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades
 anteriores, en L4, X₁ es I, L o X, donde X es un aminoácido no
 natural seleccionado del grupo que consiste en L-
 propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-
 naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-
 10 fluorotirosina y L-4-fluorofenilalanina.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican
 en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L5: X₃ es Y o
 X; X₅ es S o X; y X₁, X₂ y X₄ son cada uno cualquier aminoácido
 o X, con la excepción de que X₁ no es G, X₂ no es P y/o X₄ no
 15 es G, donde X es un aminoácido no natural seleccionado del
 grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-
 sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-
 naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina y L-4-
 fluorofenilalanina. En determinadas modalidades de acuerdo con
 20 (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades
 anteriores, en L5, cada uno de X₁ - X₅ es cualquier aminoácido
 con la excepción de que X₂ no es prolina (P). En determinadas
 modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera
 de las modalidades anteriores, en L5, cada uno de X₁ - X₅ es
 25 cualquier aminoácido con la excepción de que X₄ no es glicina
 (G). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se
 aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L5:
 X₁ es un aminoácido seleccionado de Q, H y X; X₂ es un aminoácido
 seleccionado de Y, W y X; X₃ es Y o X; X₄ es un aminoácido
 30 seleccionado de Q, N o X; X₅ es S o X, donde X es un aminoácido
 no natural seleccionado del grupo que consiste en L-
 propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-

naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina y L-4-fluorofenilalanina.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, X es un aminoácido no natural que se selecciona del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptofan, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-L-alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-hidroxi-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican

en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L2: X_1 es G o X; X_2 es R, P o X; X_3 es D o X; X_4 es F, I o X; y X_5 es E, D o X, donde X es un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina y L-4-fluorofenilalanina.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCGRDFECLQQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 103). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCGRDFECVERCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 104). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 105). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCGRDFECMNQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 106). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la

secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCGRDFECMQTCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 107). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCGRDFECVYQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 108). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCGRDFECFINCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 109). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCGRDFECVSQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 110). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCGRDFECVTECICQYYQSCG (SEQ ID NO: 111). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCGRDFECFYECICQYYQSCG (SEQ ID NO: 112). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de

crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 113). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el

5 péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCGRDFECVYRCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 114). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en)

10 cualquiera de las modalidades anteriores, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la secuencia de aminoácidos CDVMQPYWGCGPDIDCFVRCLCHWYNNSCG (SEQ ID NO: 139). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el

15 péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la secuencia de aminoácidos GCDVMQPYWGCGPDIDCLSNICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 140). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la

20 secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 142). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la secuencia de aminoácidos

25 GCNIXLPFWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 144), donde X es norleucina (Nle). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades

30

anteriores, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la secuencia de aminoácidos GCNIXLPFWGCGRDFECVSQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 145), donde X es norleucina (Nle). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) comprende la secuencia de aminoácidos GCNIXLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 146), donde X es norleucina (Nle).

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une al factor de crecimiento entotelial A (VEGF-A) comprende la secuencia de aminoácidos GCDVXQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 224), donde X es norleucina.

En determinadas modalidades se proporciona un péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que comprende los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en:

GCNIMLPFWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG	(SEQ ID NO: 113),
GCNIMLPFWGCGRDFECVYRCICQYYQSCG	(SEQ ID NO: 114),
GCDVMQPYWGCGPDIDCFVRCLCHWYNNSCG	(SEQ ID NO: 139),
GCDVMQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNNSCG	(SEQ ID NO: 140),
GCNIMLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG	(SEQ ID NO: 142),
GCNIXLPFWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG	(SEQ ID NO: 144),

donde X es norleucina (Nle), GCNIXLPFWGCGRDFECVSQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 145), donde X es norleucina (Nle), GCNIXLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 146), donde X es norleucina (Nle) y GCDVXQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 224), donde X es norleucina. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las

modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPFWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 113). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores,

5 el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPFWGCGRDFECVYRCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 114). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en

10 GCDVMQPYWGCGPDIDCFVRCLCHWYNNSCG (SEQ ID NO: 139). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCDVMQPYWGCGPDIDCLSNICICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 140). En

15 determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 142). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en)

20 cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIXLPFWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 144), donde X es norleucina (Nle). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades

25 anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIXLPFWGCGRDFECVSQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 145), donde X es norleucina (Nle). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de

30 aminoácidos establecida en GCNIXLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 146), donde X es norleucina (Nle). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera

de las modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCDVXQPYWGCGPDIDCLSNICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 224), donde X es norleucina. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP se une a VEGF-A.

En determinadas modalidades se proporciona un péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que comprende los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en:

GCDVX₁QPYWGCGPDI-D/E-CLS-N/K/X₂-CICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 534),

10 GCDVX₁QPYWGCGPDI-N/K/X₂-CLS-D/E-CICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 535),

GCNIX₁LPYWGCGRDF-D/E-CME-N/K/X₂-CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 538),

GCNIX₁LPYWGCGRDF-N/K/X₂-CME-D/E-CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 539),

GCNIX₁LPFWGCGRDF-D/E-CVS-N/K/X₂-CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 540), y

GCNIX₁LPFWGCGRDF-N/K/X₂-CVS-D/E-CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 541),

15 donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCDVX₁QPYWGCGPDI-D/E-CLS-N/K/X₂-CICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 534), donde X₁ es norleucina y X₂ es

20 ornitina. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCDVXQPYWGCGPDIDCLSKICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 536), donde X es norleucina. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como

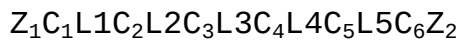
25 se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCDVX₁QPYWGCGPDIDCLSX₂CICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 537), donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las

30 modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCDVX₁QPYWGCGPDI-N/K/X₂-CLS-D/E-CICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 535), donde X₁ es norleucina y X₂ es

ornitina. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIX₁LPYWGCGRDF-D/E-CME-N/K/X₂-CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 538),
5 donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIXLPYWGCGRDFECMEKCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 543), donde X es norleucina. En determinadas
10 modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIX₁LPYWGCGRDFECMEX₂CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 544), donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en)
15 cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIX₁LPYWGCGRDF-N/K/X₂-CME-D/E-CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 539), donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las
20 modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIX₁LPFWGCGRDF-D/E-CVS-N/K/X₂-CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 540), donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el
25 CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIXLPFWGCGRDFECVSKCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 545), donde X es norleucina. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en
30 GCNIX₁LPFWGCGRDFECVSX₂CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 546), donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las

modalidades anteriores, el CKP comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIX₁LPFWGCGRDF-N/K/X₂-CVS-D/E-CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 541), donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP se une a VEGF-A.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, se proporciona un péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A, donde el CKP comprende la estructura de armazón de cistina:



donde:

Z₁ y Z₂ son cualquier aminoácido;

L1 es el Bucle 1 y tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en: X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈, X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉, y X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀, donde cada uno de X₁ - X₁₀ es cualquier aminoácido;

L2 es el Bucle 2 y tiene la estructura: X₁X₂X₃X₄X₅, donde cada uno de X₁ - X₅ es cualquier aminoácido;

L3 es el Bucle 3 y tiene la estructura: X₁X₂X₃ donde cada uno de X₁ - X₃ es cualquier aminoácido;

L4 es el Bucle 4 y tiene la estructura: X₁, donde X₁ es cualquier aminoácido;

L5 es el Bucle 5 y tiene la estructura: X₁X₂X₃X₄X₅, donde cada uno de X₁ - X₅ es cualquier aminoácido;

donde el CKP tiene una conectividad de enlace disulfuro alterada en referencia a una proteína inhibidora de la tripsina EETI-II de *Ecballium elaterium* natural que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 1; donde la conectividad de enlace disulfuro alterada es C1-C4, C2-C3 y C5-C6; y donde el CKP tiene un porcentaje de contenido de hélice alfa de al

menos 20%.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, Z_1 y Z_2 son cualquier aminoácido, más que un aminoácido o un aminoácido no natural. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, cada uno de $X_1 - X_{10}$ en L1 es cualquier aminoácido o un aminoácido no natural. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, cada uno de $X_1 - X_5$ en L2 es cualquier aminoácido o un aminoácido de no natural. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, cada uno de $X_1 - X_3$ en L3 es cualquier aminoácido o un aminoácido de no natural. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, X_1 en L4 es cualquier aminoácido o un aminoácido de no natural. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, cada uno de $X_1 - X_5$ en L5 es cualquier aminoácido o un aminoácido de no natural. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el aminoácido no natural se selecciona del grupo que consiste en: L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptofan, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-

metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-
 bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-
 L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-
 alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina,
 5 benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-
 alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-
 ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-
 L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-
 Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-
 10 hidroxil-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-
 fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-
 tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-
 serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil
 glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster
 15 glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina
 morfolina amida.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican
 en) cualquiera de las modalidades anteriores, el (CKP) de
 origen no natural que se une a VEGF-A se une a VEGF-A con una
 20 afinidad de 500 pM o menos. En determinadas modalidades de
 acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las
 modalidades anteriores, la afinidad de unión se determina por
 medio de resonancia de plasmones superficiales.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican
 25 en) cualquiera de las modalidades anteriores, Z_1 y/o Z_2 son más
 de un aminoácido, o un aminoácido no natural. En determinadas
 modalidades, Z_2 es dos aminoácidos. En determinadas
 modalidades, Z_2 es tres aminoácidos. En determinadas
 modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera
 30 de las modalidades anteriores, en L5, cada uno de $X_1 - X_5$ es
 cualquier aminoácido con la excepción de que X_2 no es prolina
 (P). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se

aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L5, cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido con la excepción de que X_4 no es glicina (G).

5 en) cualquiera de las modalidades anteriores, el grupo carboxilo del extremo C del (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está modificado (por ejemplo, tiene los extremos protegidos). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores,
10 el grupo amina del extremo N del (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está modificado (por ejemplo, tiene los extremos protegidos). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el grupo carboxilo del extremo C del (CKP) de
15 origen no natural que se une a VEGF-A tiene los extremos protegidos y el grupo amina del extremo N del (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está modificado (por ejemplo, tiene los extremos protegidos).

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el grupo carboxilo del extremo C del (CKP) de origen no natural que se
20 une a VEGF-A está amidado. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el grupo amina del extremo N del (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está acetilado. En
25 determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el grupo carboxilo del extremo C del (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está amidado y el grupo amina del extremo N del (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está acetilado.
30

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el (CKP) de

origen no natural que se une a VEGF-A inhibe la actividad de VEGF-A. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, CKP inhibe la actividad de VEGF-A con una CI_{50} entre aproximadamente 0.5 nM y aproximadamente 1.0 nM. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, la proteína de armazón EETI-II de origen no natural se une a VEGF-A humano, VEGF-A de ratón y VEGF-A de rata.

- En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP de origen no natural compite con el anticuerpo G6.31 por la unión a VEGF-A. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, se proporciona un CKP de origen no natural que compite con el (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A de cualquiera de las modalidades anteriores para unión a VEGF-A.

- En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP de origen no natural que se une a un epítipo en VEGF-A comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: V14, V15, F17, D19, Y21, Q22, Y25, I46, K48, N62, D63, L66, M81, I83, K84, P85, H86, G88, Q89, I91, C104, R105 y P106.

- En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, los residuos se seleccionan del grupo que consiste en: K48, N62 y D63. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, los residuos se seleccionan del grupo que consiste en: Y21, Y25 y P106. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, los residuos se

seleccionan del grupo que consiste en: H86 y Q89. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, los residuos se seleccionan del grupo que consiste en: M81, D19 y Q22. En

5 determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, los residuos se seleccionan del grupo que consiste en: F17, M81 y I91. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, los residuos se

10 seleccionan del grupo que consiste en: V14, F17, D19, Q22, M81 y I91. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, los residuos se seleccionan del grupo que consiste en: Y25.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP de origen

15 no natural que se une a VEGF-A se conjuga con un agente terapéutico. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el CKP de origen no natural que se une a VEGF-A se conjuga con

20 una etiqueta. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, la etiqueta se selecciona del grupo que consiste en un radioisótopo, un tinte fluorescente y una enzima.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, se proporciona

25 un ácido nucleico aislado que codifica para el (CKP) de origen no natural que se une VEGF-A de cualquiera de las modalidades anteriores. También se proporciona un vector de expresión que codifica para la molécula de ácido nucleico de cualquiera de

30 las modalidades anteriores. También se proporciona una célula que comprende el vector de expresión de cualquiera de las modalidades anteriores. También se proporciona un método para

producir el (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A de cualquiera de las modalidades anteriores, que comprende cultivar la célula de cualquiera de las modalidades anteriores y recuperar el (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A del cultivo celular.

También se proporciona un método para producir el (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A de cualquiera de las modalidades anteriores, que comprende sintetizar el (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A.

En la presente se proporciona una composición que comprende el (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A de cualquiera de las modalidades anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, la composición comprende uno o más compuestos adicionales. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el compuesto adicional se une a una segunda molécula biológica que se selecciona del grupo que consiste en interleucina-6 (IL-6); receptor de interleucina 6 (IL-6R); PDGF; angiopoyetina; angiopoyetina 2; Tie2; S1P; integrinas $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ y $\alpha 5\beta 1$; betacelulina; apelina/APJ; eritropoyetina; factor de complemento D; $TNF\alpha$; HtrA1; un receptor VEGF; receptor ST-2; y proteínas genéticamente vinculadas a un riesgo de degeneración macular (AMD, por sus siglas en inglés) relacionado con la edad tales como los componentes de la vía del complemento C2, factor B, factor H, CFHR3, C3b, C5, C5a, C3a, HtrA1, ARMS2, TIMP3, HLA, interleucina-8 (IL-8), CX3CR1, TLR3, TLR4, CETP, LIPC, COL10A1 y TNFRSF10A. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el compuesto adicional es un CKP de origen no natural. En determinadas modalidades de acuerdo con

(o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el compuesto adicional es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este.

En la presente se proporciona un método para tratar una
5 enfermedad ocular caracterizada por angiogénesis y/o permeabilidad o filtración vascular en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz del (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A de cualquiera de las modalidades anteriores al sujeto. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como
10 se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el método además comprende administrar uno o más compuestos adicionales. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores el CKP de origen no natural que se une a VEGF-A se administra
15 simultáneamente con el/los compuesto/s adicional/es. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores el CKP de origen no natural que se une a VEGF-A se administra antes o después de el/los compuesto/s adicional/es. En determinadas modalidades
20 de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el compuesto adicional se une a una segunda molécula biológica que se selecciona del grupo que consiste en interleucina-6 (IL-6); receptor de interleucina 6 (IL-6R); PDGF; angiopoyetina; angiopoyetina 2; Tie2; S1P; integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_5\beta_1$; betacelulina; apelina/APJ;
25 eritropoyetina; factor de complemento D; $\text{TNF}\alpha$; HtrA1; un receptor de VEGF; receptor de ST-2 ; y proteínas genéticamente vinculadas a un riesgo de degeneración macular (AMD, por sus siglas en inglés) relacionado con la edad tales como los
30 componentes de la vía del complemento C2, factor B, factor H, CFHR3, C3b, C5, C5a, C3a, HtrA1, ARMS2, TIMP3, HLA, interleucina-8 (IL-8), CX3CR1, TLR3, TLR4, CETP, LIPC, COL10A1

y TNFRSF10A. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el compuesto adicional es un CKP de origen no natural. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el compuesto adicional es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplica en) cualquiera de las modalidades anteriores, la enfermedad ocular es una enfermedad neovascular intraocular que se selecciona del grupo que consiste en retinopatías proliferativas, neovascularización coroidea (CNV, por sus siglas en inglés), degeneración macular relacionada con la edad (AMD, por sus siglas en inglés), retinopatía diabética y otras relacionadas con isquemia, edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis ocular, oclusión de la vena de la retina (RVO, por sus siglas en inglés), incluida oclusión de la vena central de la retina (CRVO, por sus siglas en inglés) y oclusión de rama venosa de la retina (BRVO, por sus siglas en inglés), neovascularización corneana, neovascularización retinal y retinopatía del prematuro (ROP, por sus siglas en inglés).

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A o la composición se administra al sujeto a través de un dispositivo implantable. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el dispositivo implantable se selecciona del grupo que consiste en: un inserto ocular, un depósito de liberación lenta, un parche/reservorio ocular, un implante ocular no biodegradable o un implante ocular biodegradable.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican

en) cualquiera de las modalidades anteriores, se proporciona una composición que comprende el (CKP) de origen no natural que se une VEGF-A de cualquiera de las modalidades anteriores para uso para tratar una enfermedad ocular caracterizada por angiogénesis y/o permeabilidad o filtración vascular en un sujeto. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplica en) cualquiera de las modalidades anteriores, la enfermedad ocular es una enfermedad neovascular intraocular que se selecciona del grupo que consiste en retinopatías proliferativas, neovascularización coroidea (CNV, por sus siglas en inglés), degeneración macular relacionada con la edad (AMD, por sus siglas en inglés), retinopatía diabética y otras relacionadas con isquemia, edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis ocular, oclusión de la vena de la retina (RVO, por sus siglas en inglés), incluida oclusión de la vena central de la retina (CRVO, por sus siglas en inglés) y oclusión de rama venosa de la retina (BRVO, por sus siglas en inglés), neovascularización corneana, neovascularización retinal y retinopatía del prematuro (ROP, por sus siglas en inglés). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, la composición se administra al sujeto a través de un dispositivo implantable. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el dispositivo implantable se selecciona del grupo que consiste en: un inserto ocular, un depósito de liberación lenta, un parche/reservorio ocular, un implante ocular no biodegradable o un implante ocular biodegradable.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, se proporciona una composición que comprende el (CKP) de origen no natural

que se une VEGF-A de cualquiera de las modalidades anteriores para uso para tratar una enfermedad ocular caracterizada por angiogénesis y/o permeabilidad o filtración vascular en un sujeto. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplica en) cualquiera de las modalidades anteriores, la enfermedad ocular es una enfermedad neovascular intraocular que se selecciona del grupo que consiste en retinopatías proliferativas, neovascularización coroidea (CNV, por sus siglas en inglés), degeneración macular relacionada con la edad (AMD, por sus siglas en inglés), retinopatía diabética y otras relacionadas con isquemia, edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis ocular, oclusión de la vena de la retina (RVO, por sus siglas en inglés), incluida oclusión de la vena central de la retina (CRVO, por sus siglas en inglés) y oclusión de rama venosa de la retina (BRVO, por sus siglas en inglés), neovascularización corneana, neovascularización retinal y retinopatía del prematuro (ROP, por sus siglas en inglés). En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el medicamento se administra al sujeto a través de un dispositivo implantable. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el dispositivo implantable se selecciona del grupo que consiste en: un inserto ocular, un depósito de liberación lenta, un parche/reservorio ocular, un implante ocular no biodegradable o un implante ocular biodegradable.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A se formula para una administración de acción prolongada.

En la presente se proporciona una formulación que comprende el

(CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A de cualquiera de las modalidades anteriores y PLGA. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, el PLGA es una varilla de PLGA.

- 5 También se proporciona en la presente un péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 6 (LRP6) humana, donde el CKP comprende la estructura de armazón de cistina:

10 $Z_1C_1L1C_2L2C_3L3C_4L4C_5L5C_6Z_2$;

donde:

Z_1 y Z_2 son cualquier aminoácido;

$L1$ es el Bucle 1 y tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en: $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$, $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$,

- 15 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ y $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$, donde cada uno de $X_1 - X_{10}$ es cualquier aminoácido;

$L2$ es el Bucle 2 y tiene la estructura: $X_1X_2X_3X_4X_5$, donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido;

- 20 $L3$ es el Bucle 3 y tiene la estructura: $X_1X_2X_3$ donde cada uno de $X_1 - X_3$ es cualquier aminoácido;

$L4$ es el Bucle 4 y tiene la estructura: X_1 , donde X_1 es cualquier aminoácido; y

$L5$ es el Bucle 5 y tiene la estructura: $X_1X_2X_3X_4X_5$, donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido.

- 25 En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, Z_1 y/o Z_2 es más de un aminoácido o un aminoácido no natural. En determinadas modalidades, Z_2 es dos aminoácidos. En determinadas modalidades, Z_2 es tres aminoácidos.

- 30 En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, Z_1 y/o Z_2 es G. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican

en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L1: X_1 es un aminoácido seleccionado de R, V, M, A, G, N, S y E; X_2 es un aminoácido seleccionado de T, N, S, G, R y A; X_3 es un aminoácido seleccionado de N, R, H, V, K, S, G, I e Y; X_4 es un aminoácido seleccionado de R, V, N, I, K, S y T; X_5 es un aminoácido seleccionado de V, R, K, I, T, S, L y N; y X_6 es un aminoácido seleccionado de K, G, A, I, R, N, S y V. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L1: X_7 es un aminoácido seleccionado de G, R, K, E, P y T. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L1: X_8 es un aminoácido seleccionado de G, R, K, Q, A y S. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L1: X_9 es un aminoácido seleccionado de R o G. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L1: X_{10} es un aminoácido seleccionado de E, W y G.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L5: X_1 es un aminoácido seleccionado de G, S, N, Y, A y R; X_2 es un aminoácido seleccionado de P, G, S, V, E, R, F y D; X_3 es un aminoácido seleccionado de N, G, S, E, P, K, H y R; X_4 es un aminoácido seleccionado de G, R, H, S, Q, V y D; y X_5 es un aminoácido seleccionado de F, D, N, R, G, Y, S y T.

En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L2, X_1 es K, X_2 es Q, X_3 es D, X_4 es S y X_5 es D. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L3, X_1 es L, X_2 es A y X_3 es G. En determinadas modalidades de acuerdo con (o como se aplican en) cualquiera de las modalidades anteriores, en L4, X_1 es V.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 representa la estructura de la proteína de nudo de cistina EETI-II.

5 La Figura 2A muestra los resultados de los experimentos que se llevaron a cabo para determinar si EGF_CKP9.54.90 interrumpe la interacción entre VEGF-A(8-109) y KDR; VEGF-A(8-109) y Flt-1; VEGF-A 165 y KDR; VEGF-B y Flt-1; VEGF-C y Flt-4; VEGF-D y Flt-4; IGFRy PIGF-2 y FLT-1.

10 La Figura 2B muestra los resultados de los experimentos que se llevaron a cabo para determinar si EGF_CKP9.54.90 interrumpe la interacción entre VEGF-A(8-109) y KDR; VEGF-A(8-109) y Flt-1; VEGF-A 165 y KDR; EGF y EGFR; PDGF y PDGFR; NGF y NGFR; e IGF e IGFR.

15 La Figura 3 muestra los resultados de los experimentos que se llevaron a cabo para determinar si VEGF_CKP9.54.90, VEGF_CKP9.54 y VEGF_CKP9.63.12 inhiben la actividad de la tripsina proteasa.

La Figura 4 muestra los resultados de los experimentos que se
20 llevaron a cabo para determinar si VEGF_CKP9.54.90 y VEGF_CKP9.63.12 son resistentes a la digestión por tripsina.

La Figura 5 representa la estructura de VEGF_CKP9.54.90, la estructura de EETI-II natural y proporciona esquemas que comparan el patrón de conectividad del enlace disulfuro de la
25 variante de CKP de unión a VEGF con el de EETI-II natural.

La Figura 6 representa la estructura de cocrystal de VEGF_CKP9.54.90 en complejo con VEGF-A.

La Figura 7 representa modelos de relleno de espacio que muestran las interfaces de unión de VEGF_CKP9.54.90, anticuerpo
30 G6.31, y dominio 2 de Flt-2 en VEGF-A.

La Figura 8 representa modelos de diagrama de banda que muestran las interfaces de unión de VEGF_CKP9.54.90, anticuerpo

G6.31, y dominio 2 de Flt-2 en VEGF-A.

La Figura 9 muestra los residuos de contacto en VEGF-A en la superficie de interacción entre VEGF-A y VEGF_CKP9.54.90.

La Figura 10 muestra las interfaces de unión de Fab de
5 bevacizumab, dominio Z y péptido de bloqueo de receptor v108 en VEGF-A.

La Figura 11 proporciona los resultados de un experimento que se llevó a cabo para determinar los efectos de las mutaciones de sustitución de aminoácido en VEGF-A sobre la unión de
10 VEGF_CKP9.54.90 a VEGF-A y sobre la unión de VEGF_CKP9.63.12 a VEGF-A. Los resultados del experimento se muestran con respecto a dos ejes y diferentes.

La Figura 12 proporciona los resultados de experimentos que se llevaron a cabo para determinar los efectos de VEGF_CKP9.54.90
15 sobre CNV en ojos de rata.

La Figura 13 proporciona los resultados de experimentos que se llevaron a cabo para determinar los valores de CI_{50} de la unión de VEGF a las variantes de CKP.

La Figura 14 representa las estructuras de VEGF_CKP9.54 y
20 VEGF_CKP9.63. También se muestra en la Figura 14 la porción de la estructura de cocrystal de VEGF_CKP9.63 en complejo con VEGF-A que muestra que el residuo en la posición 8 dentro del bucle 1 de VEGF_CKP9.63 podría formar un enlace hidrógeno con la cadena lateral de Gln22 de VEGF-A.

25 La Figura 15 muestra los resultados de experimentos ELISA de competición de fagos que se realizaron para evaluar la afinidad de unión de los clones 9.54-28, 9.54, 9.54.1-2, 9.54.1-36, 9.54.1-42, 9.54.1-63, 9.54.1-90 y 9.54.1 para hVEGF(8-109).

La Figura 16A muestra los resultados de experimentos ELISA de
30 competición de fagos que se realizaron para evaluar la afinidad de unión de los clones 9.63.44-1 to 9.63.44-7.

La Figura 16B muestra los resultados de experimentos ELISA de

competición de fagos que se realizaron para evaluar la afinidad de unión de los clones 9.63.44-8 a 9.63.44-14.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se proporcionan péptidos de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se unen específicamente al VEGF-A humano. Dichos CKP de origen no natural demuestran una o más de las siguientes características: inhibición de la actividad de VEGF-A con un CI_{50} entre menos de aproximadamente 0.5 nM y menos de aproximadamente 1.0 nM; unión a VEGF-A humano, VEGF de ratón y VEGF de rata; resistencia a la digestión por tripsina; una conectividad de enlace disulfuro de C1-C4, C2-C3 y C5-C6; un contenido de hélice alfa de al menos aproximadamente al menos aproximadamente 15% a al menos aproximadamente 50%; unión a un epítipo en VEGF-A que es diferente del epítipo al que se une el anticuerpo G6.31, unión a un epítipo en VEGF-A que es diferente del epítipo al que se une bevacizumab, y/o unión a un epítipo en VEGF-A que es diferente del epítipo al que se une Flt-1.

También se proporcionan moléculas quiméricas y conjugados que comprenden péptidos de nudo de cistina de origen no natural que se unen a VEGF-A, ácidos nucleicos que codifican para los CKP de origen no natural que se unen a VEGF-A y composiciones (tales como composiciones farmacéuticas). También se proporcionan métodos para utilizar los CKP de origen no natural que se unen a VEGF-A para tratar enfermedades y/o trastornos oculares (tales como enfermedades y/o trastornos proliferativos vasculares oculares) que resultan de angiogénesis anormal (tal como excesiva) y/o permeabilidad vascular anormal. Se proporcionan además usos de los CKP de origen no natural que se unen a VEGF-A en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o trastornos oculares.

En un aspecto relacionado, también se proporcionan CKP de origen no natural que se unen a la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 6 (LRP6).

La puesta en práctica de la presente divulgación emplea, a menos que se indique lo contrario, métodos estándares y técnicas convencionales en los campos de la biología celular, toxicología, biología molecular, bioquímica, cultivo celular, inmunología, oncología, ADN recombinante y campos relacionados, que están dentro del conocimiento de la técnica. Dichas técnicas se describen en la literatura y están disponibles a través de la misma para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Alberts, B. *et al.*, «Molecular Biology of the Cell», 5^{ta} edición, Garland Science, Nueva York, NY, 2008; Voet, D. *et al.* «Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level», 3^{ra} edición, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2008; Sambrook, J. *et al.*, «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», 3^{ra} edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; Ausubel, F. *et al.*, «Current Protocols in Molecular Biology», John Wiley & Sons, Nueva York, 1987 y actualizaciones periódicas; Freshney, R.I., «Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique», 4^{ta} edición, John Wiley & Sons, Somerset, NJ, 2000; y la serie «Methods in Enzymology», Academic Press, San Diego, CA.

25 **Definiciones**

Tal como se usa en la presente «de origen no natural» significa, por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que no se encuentra en la naturaleza, o, por ejemplo, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que no se encuentra en la naturaleza. Un «péptido de nudo de cistina de origen no natural» o «CKP de origen no natural» (o un ácido nucleico que codifica para el mismo)

proporcionado en la presente no tiene la secuencia de aminoácidos de una proteína EETI-II natural, es decir, GCPRIILMRCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO: 1), donde el Bucle 1 (L1) es la secuencia de aminoácidos PRILMR (SEQ ID NO: 92), el Bucle 2 (L2) es la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93), el Bucle 3 (L3) es la secuencia de aminoácidos LAG, el Bucle 4 (L4) es el aminoácido V y el Bucle 5 (L5) es la secuencia de aminoácidos GPNGF (SEQ ID NO:15). Un CKP de origen no natural proporcionado en la presente puede producirse mediante métodos de manipulación genética o mediante métodos de síntesis química. Por lo tanto, un CKP de origen no natural descrito en la presente puede ser recombinante, es decir, producido por una célula o ácido nucleico o vector que ha sido modificado mediante la introducción de un ácido nucleico heterólogo o la alteración de un ácido nucleico natural en una forma no natural de dicha célula, o que la célula deriva de una célula modificada de esta forma. Alternativamente, un CKP de origen no natural descrito en la presente puede producirse a través de síntesis de péptidos química.

Tal como se usa en la presente, la expresión «péptido de nudo de cistina» o «CKP» hace referencia a un péptido con una longitud entre 26-50 aminoácidos, que contiene seis residuos conservados de cisteína que forman tres enlaces disulfuro. Uno de los disulfuros penetra el macrociclo que está formado por los otros dos disulfuros y sus estructuras principales interconectadas, mediante lo cual se proporciona una topología anudada característica con múltiples bucles expuestos en la superficie. Los bucles están definidos como las regiones de aminoácidos que flanquean los seis residuos de cisteína conservados y tienen una naturaleza altamente variable.

Tal como se usa en la presente, una «alteración de aminoácido» hace referencia a la adición, supresión o sustitución de al

menos un aminoácido en, por ejemplo, una secuencia peptídica (tal como en la secuencia peptídica de EETI-II natural para generar un CKP de origen no natural o en un CKP de origen no natural para generar otro CKP de origen no natural).

- 5 Un CKP de origen no natural o composición «aislado» es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del CKP de origen no natural, y
- 10 pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En modalidades preferidas, el CKP de origen no natural o composición se purificará (1) a más de un 95% en peso del CKP de origen no natural, tal como se determina por el método Lowry, y más preferiblemente a más de 99% en peso, (2)
- 15 hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos del extremo B o la secuencia de aminoácidos interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria o (3) a homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras, utilizando azul de Coomassie o, preferentemente, tintura plata.
- 20 El CKP de origen no natural aislado incluye el CKP in situ dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del CKP no estará presente. Un CKP de origen no natural aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.
- 25 «Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos» u «homología» con respecto a una secuencia de polipéptidos identificada en la presente se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de
- 30 polipéptidos con la que se está comparando, después de alinear las secuencias considerando cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación a

efectos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de software informático disponible al público, tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros adecuados para medir la alineación, incluido cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se están comparando. A los efectos de la presente, sin embargo, los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente se presentó con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington D.C., 20559, donde se encuentra registrado con el n.º de Registro de Derechos de Autor de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

Tal como se usa en la presente el término «epítopo» hace referencia a un determinante proteico capaz de que se una al mismo específicamente un CKP de origen no natural proporcionado en la presente. Un epítopo puede comprender entre aproximadamente 3-10 aminoácidos en una conformación especial, que es exclusiva del epítopo. Estos aminoácidos pueden ser lineales dentro de la proteína (es decir, consecutivos en la secuencia de aminoácidos) o pueden posicionarse en diferentes partes de la proteína (es decir, no consecutivos en la

secuencia de aminoácidos). Los métodos para determinar la conformación especial de los aminoácidos dentro de la proteína, o en la interfaz de dos proteínas, se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia
5 magnética nuclear en 2 dimensiones.

Los términos «patrón de enlace disulfuro (DBP, por sus siglas en inglés)», «conectividad de enlace disulfuro» y «patrón de ligadura disulfuro» hacen referencia al patrón de enlace de las cisteínas con respecto al de la proteína EETI-II natural.
10 La proteína EETI-II natural comprende seis residuos cisteína conservados (numerados del 1 al 6) que forman tres enlaces disulfuro con conectividades C1-C4, C2-C5 y C3-C6. El patrón de enlaces disulfuro es topológicamente constante, lo que significa que los enlaces disulfuro solo pueden cambiarse al
15 desenlazar uno o más disulfuros tal como utilizando condiciones de reducción-oxidación.

Un «sujeto», «paciente» o un «individuo» a los efectos del tratamiento hacen referencia a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluidos humanos, animales domésticos y de
20 granja y animales de zoológico, deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Una «cantidad eficaz» de un CKP de origen no natural (o una composición que comprende dicho CKP de origen no natural) tal
25 como se describe en la presente, es una cantidad suficiente para llevar a cabo un fin específicamente establecido. Una «cantidad eficaz» puede determinarse empíricamente y mediante métodos conocidos en relación al propósito establecido.

El término «cantidad terapéuticamente eficaz» hace referencia
30 a una cantidad de un CKP de origen no natural o composición tal como se describen en la presente, eficaz para «tratar» una enfermedad o trastorno en mamífero (tal como un paciente

humano). En el caso de una enfermedad ocular o trastorno ocular (tal como una enfermedad proliferativa vascular ocular o trastorno ocular caracterizado por angiogénesis excesiva), la cantidad terapéuticamente eficaz de un CKP de origen no natural que se une VEGF-A descrito en la presente (o una composición que comprende dicho CKP de unión a VEGF-A de origen no natural) hace referencia a la cantidad para reducir, detener o prevenir al menos un síntoma de la enfermedad ocular, tal como un síntoma o trastorno de una enfermedad ocular descrito con mayor detalle en otra parte en la presente. Por ejemplo, una cantidad eficaz se consideraría como la cantidad suficiente para reducir o prevenir un síntoma de la enfermedad ocular o trastorno ocular (tal como una enfermedad proliferativa vascular ocular o trastorno ocular caracterizado por angiogénesis excesiva), por ejemplo una resolución y/o mantenimiento completo o parcial de la enfermedad ocular tal como se mide mediante tomografía de coherencia óptica (OCT, por sus siglas en inglés) o un aumento y/o mantenimiento en la mejor agudeza visual corregida (tal como más de 5 letras tal como se evalúa mediante la gráfica optométrica EDTRS), o una reducción en el tamaño de la neovascularización o permeabilidad neovascular tal como se evalúa mediante angiografía de fluorescencia de fondo. Una cantidad eficaz tal como se usa en la presente también incluiría una cantidad suficiente para evitar o retrasar el desarrollo de, por ejemplo, edema macular, permeabilidad mejorada (tal como permeabilidad vascular de la retina), tamaño de la lesión de CNV y pérdida de la visión. Una cantidad eficaz tal como se usa en la presente además incluiría una cantidad suficiente para prevenir o retrasar el desarrollo de un síntoma de la enfermedad ocular, alterar el curso de una enfermedad sintomática (por ejemplo, a modo no taxativo, enlentecer la evolución de una síntoma de la enfermedad ocular), o revertir

un síntoma de la enfermedad.

Tal como se utiliza en la presente, «tratamiento» o «tratar» es un abordaje para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluidos resultados clínicos. A los efectos de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, a modo no taxativo, uno o más de los siguientes: aliviar uno o más síntomas que resultan de la enfermedad ocular, disminuir la extensión de la enfermedad ocular, estabilizar la enfermedad ocular (por ejemplo, prevenir o retrasar el empeoramiento de la enfermedad), prevenir o retrasar la expansión de la enfermedad (tal como hacia los tejidos oculares circundantes), prevenir o retrasar la recidiva de la enfermedad ocular, retrasar o enlentecer la evolución de la enfermedad ocular, mejorar el estado de la enfermedad, proporcionar una remisión o resolución (parcial o total) de la enfermedad ocular, reducir la dosis de un o más medicamentos distintos necesarios para tratar la enfermedad ocular, retrasar la evolución de la enfermedad ocular, aumentar o mejorar la calidad de vida y/o prevenir o retrasar la pérdida de la visión. También dentro de «tratamiento» se incluye una reducción de la consecuencia patológica de una enfermedad ocular (tal como, por ejemplo, la pérdida de la visión). Los métodos proporcionados en la presente contemplan cualquier uno o más de estos aspectos de tratamiento.

Un «trastorno» es una afección que se beneficiaría del tratamiento con un CKP de origen no natural que se une a VEGF-A descrito en la presente. Los ejemplos no limitantes de trastornos relacionados con VEGF a tratar en la presente incluyen enfermedades y trastornos oculares (tales como enfermedades proliferativas vasculares oculares o trastornos oculares caracterizados por angiogénesis excesiva), tal como se describe en otra parte en la presente.

Tal como se usa en la presente, «farmacéuticamente aceptable» o «farmacéuticamente compatible» significa un material que no es biológicamente, o de otra manera, indeseable, por ejemplo, el material puede incorporarse a una composición farmacéutica administrada a un paciente sin causar ningún efecto biológico indeseable significativo o interactuar de forma perjudicial con cualquiera de los componentes adicionales de la composición en la cual está contenido. Los portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables han cumplido preferiblemente las normas requeridas de evaluación toxicológica y de fabricación y/o están incluidos en la Guía de Ingredientes Inactivos de la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos. El término «detectar» pretende incluir la determinación de la presencia o ausencia de una sustancia o la cuantificación de la cantidad de una sustancia (tal como un ligando objetivo). Por lo tanto, el término hace referencia al uso de los materiales, composiciones y métodos proporcionados en la presente para determinaciones cualitativas y cuantitativas. En general, la técnica específica utilizada para la detección no es esencial para la puesta en práctica de la invención. Por ejemplo, «detectar» de acuerdo con la invención puede incluir: observar la presencia o ausencia de un ligando objetivo (incluidos, a modo no taxativo, un polipéptido de proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 6 (LRP6) humano o un polipéptido del factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) humano); un cambio en los niveles de un ligando objetivo; y/o un cambio en la función/actividad biológica de un ligando objetivo. En determinadas modalidades, «detectar» puede incluir detectar niveles de un ligando objetivo (por ejemplo, niveles de polipéptido de un LRP6 humano o un VEGF-A humano). La detección puede incluir cuantificar un cambio (aumento o disminución) de

cualquier valor entre 10% y 90%, o cualquier valor entre 30% y 60%, o superior a 100%, cuando se compara con un testigo. La detección puede incluir cuantificar un cambio de cualquier valor entre 2 veces a 10 veces, inclusive, o más, por ejemplo, de 100 veces.

La palabra «etiqueta» cuando se usa en la presente se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el CKP de origen no natural. La etiqueta puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, etiquetas de radioisótopos o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

En relación con la unión de un CKP de origen no natural con un ligando objetivo, la expresión «unión específica» o «se une específicamente a» o es «específico para» un ligando objetivo específico significa una unión que se mide de forma diferente que una interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula comparada con la unión de una molécula testigo, que generalmente es un molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse mediante competencia con una molécula testigo que es similar a la objetivo, por ejemplo, un exceso de objetivo no etiquetado. En este caso, la unión específica se indica si la unión del objetivo etiquetado a una sonda se inhibe de forma competitiva mediante un exceso del objetivo sin etiquetar. En determinadas modalidades, la extensión de la unión del CKP de origen no natural a un ligando «no objetivo» será menor que aproximadamente 10% de la unión del CKP de origen no natural a su ligando objetivo (tal como LRP6 o VEGF-A) tal como se determina, por ejemplo, mediante análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en

inglés) o radioinmunoprecipitación (RIA, por sus siglas en inglés). En determinadas modalidades, un CKP de origen no natural de la presente divulgación se une específicamente a un ligando objetivo (tal como una proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 6 (LRP6) humano o el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) humano) con una constante de disociación (K_d) menor o igual que 100 nM, opcionalmente menor que 10 nM, opcionalmente menor que 1 nM, opcionalmente menor que 0.5 nM, opcionalmente menor que 0.1 nM, opcionalmente menor que 0.01 nM, u opcionalmente menor que 0.005 nM; medida a una temperatura de aproximadamente 4 °C, 25 °C, 37 °C o 45 °C.

La referencia a «aproximadamente» un valor o parámetro en la presente hace referencia al rango de error habitual para el valor respectivo conocido para un experto en este campo técnico. La referencia a «aproximadamente» un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) aspectos que están dirigidos a ese valor o parámetro en sí. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a «aproximadamente X» incluye la descripción de «X».

Se entenderá que los aspectos y modalidades de la invención descrita en la presente incluyen «consiste», «consistiendo en» y «consiste esencialmente en» aspectos y modalidades.

Todas las referencias mencionadas en la presente, que incluyen solicitudes y publicaciones de patentes, se incorporan por referencia en su totalidad.

Péptidos de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se unen al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) humano

En determinadas modalidades, se proporciona en la presente un péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se

une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A), donde el CKP comprende la estructura de armazón de cistina (es decir, la estructura de armazón I):

5 $Z_1C_1L1C_2L2C_3L3C_4L4C_5L5C_6Z_2$ (I)

donde:

Z_1 y Z_2 son cualquier aminoácido;

L1 es el Bucle 1 y tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en: $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$, $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$, y
 10 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$, donde cada uno de $X_1 - X_{10}$ es cualquier aminoácido;

L2 es el Bucle 2 y tiene la estructura: $X_1X_2X_3X_4X_5$, donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido o un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en L-
 15 propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina,
 20 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-
 25 metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-
 30 alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-

- Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-hidroxi-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metilglicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida.
- 10 L3 es el Bucle 3 y tiene la estructura: $X_1X_2X_3$, donde cada uno de $X_1 - X_3$ es cualquier aminoácido o un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluorobencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-hidroxi-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-
- 15
- 20
- 25
- 30

fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida.

L4 es el Bucle 4 y tiene la estructura: X_1 , donde X_1 es cualquier aminoácido o un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-hidroxi-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster

glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida.

L5 es el Bucle 5 y tiene la estructura: $X_1X_2X_3X_4X_5$, donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido o un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-L-alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-hidroxi-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida; y

donde el CKP se une a VEGF-A con una afinidad de 500 pM o menor.

En determinadas modalidades, el extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está modificado (por ejemplo, tiene los extremos protegidos). En determinadas modalidades, el extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está modificado (por ejemplo, tiene los extremos protegidos). En determinadas modalidades, tanto el extremo C como el extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A están modificados (por ejemplo, tienen los extremos protegidos). En determinadas modalidades, el grupo carboxilo del extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está amidado. En determinadas modalidades, el grupo amina del extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está acetilado. En determinadas modalidades, el grupo carboxilo del extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está amidado y el grupo amina del extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está acetilado. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A tiene una conectividad de enlace disulfuro alterada en referencia a una proteína inhibidora de la tripsina EETI-II de *Ecballium elaterium* natural que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 1; donde la conectividad de enlace disulfuro alterada es C1-C4, C2-C3 y C5-C6.

En determinadas modalidades, Z_1 y/o Z_2 del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A es G. En determinadas modalidades, Z_1 y/o Z_2 comprenden más de un aminoácido. En determinadas modalidades, Z_1 y/o Z_2 comprenden 4

aminoácidos. En determinadas modalidades, Z_1 y/o Z_2 comprenden 5 aminoácidos.

En determinadas modalidades, Z_1 y/o Z_2 son un aminoácido no natural. En determinadas modalidades, el aminoácido no natural es N-acetiglicina o glicina amida. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L1 donde X_3 no es I; donde X_5 no es M; y/o donde X_6 no es R. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L1 donde X_1 es un aminoácido seleccionado de P, Q, R, T, V, D, N, K, L y X; donde X_2 es un aminoácido seleccionado de T, D, L, V, I, R, P, N y X; donde X_3 es un aminoácido seleccionado de T, P, M, L, S, F, R y X; donde X_4 es un aminoácido seleccionado de R, T, Q, D, W, L, E, S, K y X; donde X_5 es un aminoácido seleccionado de F, P, V, E, K, L, I y X; donde X_6 es un aminoácido seleccionado de K, N, F, P, L, Y, T, D, M y X; donde X_7 es un aminoácido seleccionado de Q, W, H y X; y/o donde X_8 es un aminoácido seleccionado de Y, A, G, D, E, W, S y X, donde X es un aminoácido no natural que se selecciona del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-

L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-
 alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina,
 benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-
 alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-
 5 ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-
 L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-
 Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-
 hidroxil-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-
 fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-
 10 tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-
 serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil
 glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster
 glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina
 morfolina amida. En determinadas modalidades, el péptido de
 15 nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-
 A comprende un L1 donde X₉ es un aminoácido seleccionado de
 L, I, V, D, E y X, donde X es un aminoácido no natural que se
 selecciona del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-,
 L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-
 20 naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-
 fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-
 bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-
 (trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-
 fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-
 25 fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-
 alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-
 alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil
 indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-
 fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-
 30 quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-
 quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-alanina, 4-etil-2-
 piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-

alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-

5 ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-hidroxi-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil glicina, glicina

10 amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L1 donde X_{10} es un aminoácido seleccionado de Y, T, M, N, F y X, donde

15 X es un aminoácido no natural que se selecciona del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-

20 OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil

25 indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-

30 alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-

- L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-hidroxi-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metilglicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida.
- En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L5, donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido o un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridilalanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-

hidroxi-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil
 5 glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida.

con la excepción de que X_2 no es prolina (P). En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no
 10 natural que se une a VEGF-A comprende un L5, donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido o un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-,
 L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-
 15 fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluorobencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina,
 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-
 20 alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina,
 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-
 25 quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también
 conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-L-leucina, t-butil-L-
 30 glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-hidroxi-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-

fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol, 5 éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida, con la excepción de que X_4 no es glicina (G). En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L5 donde X_1 es un aminoácido seleccionado de G, Q, H, R, L y Q; donde X_2 es un aminoácido seleccionado de P, M, W, Y, F, L y H; donde X_3 es un aminoácido seleccionado de N, F, H e Y; donde X_4 es un aminoácido seleccionado de G, Q, D, N, K, H, E y S; y/o donde X_5 es un aminoácido seleccionado de F, S y T. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L2 donde X_1 es K, X_2 es Q, X_3 es D, X_4 es S y X_5 es D. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L3 donde X_1 es L, X_2 es A y X_3 es G. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L4 donde X_1 es V o F

En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L1 que comprende la estructura $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$, donde: X_1 es un aminoácido seleccionado de P, Q y R; X_2 es un aminoácido seleccionado de T, L y D; X_3 es un aminoácido seleccionado de T, M y L; X_4 es un aminoácido seleccionado de R, Q y D; X_5 es un aminoácido seleccionado de F, P y V; X_6 es un aminoácido seleccionado de K y F; X_7 es un aminoácido seleccionado de Q y 25 W; y X_8 es un aminoácido seleccionado de Y, G y D. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L1 que

comprende la estructura $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$, donde X_1 es un aminoácido seleccionado de Q, R, T y V; X_2 es un aminoácido seleccionado de T y D; X_3 es P; X_4 es un aminoácido seleccionado de T y W; X_5 es un aminoácido seleccionado de F, E, P y K; X_6 es un aminoácido seleccionado de N y P; X_7 es un aminoácido seleccionado de W y H; X_8 es un aminoácido seleccionado de A, D, E y W; X_9 es un aminoácido seleccionado de L e I; y X_{10} es un aminoácido seleccionado de Y, T, M y N. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L5 donde X_1 es un aminoácido seleccionado de G, H y Q; donde X_2 es un aminoácido seleccionado de P, M, W e Y; donde X_3 es un aminoácido seleccionado de N e Y; donde X_4 es un aminoácido seleccionado de G, Q, y S; y X_5 es un aminoácido seleccionado de F y S. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L2 donde X_1 es K, X_2 es Q, X_3 es D, X_4 es S y X_5 es D. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L3 donde X_1 es L, X_2 es A y X_3 es G. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L4 donde X_1 es V o F.

En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L1 que tiene la estructura $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$, donde: X_1 es un aminoácido seleccionado de D, Q, N y K; X_2 es un aminoácido seleccionado de V, I, R, L y P; X_3 es un aminoácido seleccionado de L, S, M, T y F; X_4 es un aminoácido seleccionado de Q, L y E; X_5 es P; X_6 es un aminoácido seleccionado de F, L e Y; X_7 es W; y X_8 es G. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L5 donde X_3 es Y; X_5 es S; y donde X_1 , X_2 y X_4 son

cada uno cualquier aminoácido, con la excepción de que X_1 no es G, X_2 no es P, X_4 no es G y/o X_5 no es F. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L5 donde X_1 es un aminoácido seleccionado de H, L, R y Q; X_2 es un aminoácido seleccionado de W, F e Y; X_3 es Y; X_4 es un aminoácido seleccionado de Q, N, K, H y E; y X_5 es S. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L2 donde X_1 es K, X_2 es Q, X_3 es D, X_4 es S y X_5 es D. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L3 donde X_1 es L, X_2 es A y X_3 es G. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L4 donde X_1 es V o F.

En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L1 que comprende la estructura $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$, donde X_1 es un aminoácido seleccionado de K, Q, L y R; X_2 es un aminoácido seleccionado de N y D; X_3 es un aminoácido seleccionado de P y L; X_4 es un aminoácido seleccionado de L, T, S y K; X_5 es un aminoácido seleccionado de F, V, I y L; X_6 es un aminoácido seleccionado de N y D; X_7 es W; X_8 es un aminoácido seleccionado de A y S; X_9 es un aminoácido seleccionado de L, V, E y D; y X_{10} es un aminoácido seleccionado de Y e F. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L5 donde X_1 es Q; X_2 es un aminoácido seleccionado de L, F, M y H; X_3 es un aminoácido seleccionado de F, Y e H; X_4 es un aminoácido seleccionado de D, Q, N y K; y X_5 es un aminoácido seleccionado de S y T. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende

un L2 donde X_1 es K, X_2 es Q, X_3 es D, X_4 es S y X_5 es D. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L3 donde X_1 es L, X_2 es A y X_3 es G. En determinadas modalidades, el

5 péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L4 donde X_1 es V o F.

En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L1 que comprende la estructura $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$, donde: X_5 es P; X_7

10 es W; X_8 es G; y donde X_1 , X_2 , X_3 , X_4 y X_6 son cada uno cualquier aminoácido, con la excepción de que X_1 no es P, X_2 no es R, X_3 no es I y/o X_6 no es R. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L1 que comprende la estructura

15 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$, donde X_1 es un aminoácido seleccionado de N y D; X_2 es un aminoácido seleccionado de I y V; X_3 es un aminoácido seleccionado de M y L; X_4 es un aminoácido seleccionado de L, Q, D y K; X_5 es P; X_6 es un aminoácido seleccionado de F, Y, T, L y M; X_7 es W; y X_8 es G. En determinadas modalidades, el

20 péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L5 donde X_1 es un aminoácido seleccionado de Q, H, L y R; X_2 es un aminoácido seleccionado de Y e W; X_3 es Y; X_4 es un aminoácido seleccionado de Q y N; y X_5 es S. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de

25 cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L5 donde X_3 es Y; X_5 es S; y donde X_1 , X_2 y X_4 son cada uno cualquier aminoácido, con la excepción de que X_1 no es G, X_2 no es P y/o X_4 no es G. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a

30 VEGF-A comprende un L2 donde X_1 es un aminoácido seleccionado de G o E; X_2 es un aminoácido seleccionado de Q, L, P, R, E y M; X_3 es un aminoácido seleccionado de S, D y N; X_4 es un

aminoácido seleccionado de F, Y, L, M e I; y/o X_5 es un aminoácido seleccionado de E, D, Q, L y S. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L3 donde X_1 es L, X_2 es A y X_3 es G. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L4 donde X_1 es V o F.

En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L5, donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido o un aminoácido con la excepción de que X_2 no es prolina (P). En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L5, donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido o un aminoácido con la excepción de que X_4 no es glicina (G). En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L5, donde X_1 es cualquier aminoácido excepto G; X_2 es cualquier aminoácido excepto P; X_3 es cualquier aminoácido excepto N; X_4 es cualquier aminoácido excepto G; y/o X_5 es cualquier aminoácido excepto F.

En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L1 que comprende la estructura $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$, donde X_1 es un aminoácido seleccionado de N, D y X; X_2 es un aminoácido seleccionado de I, V y X; X_3 es M o X; X_4 es un aminoácido seleccionado de L, Q y X; X_5 es P o X; X_6 es F, Y o X; X_7 es W o X; y X_8 es G o X, donde X es un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-

bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-hidroxi-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L3, donde cada uno de $X_1 - X_3$ es cualquier aminoácido o un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-

cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH
 para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil
 indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-
 isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-
 5 metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-
 bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-
 L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-
 alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina,
 benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-
 10 alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-
 ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-
 L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-
 Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-
 hidroxil-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-
 15 fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-
 tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-
 serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil
 glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster
 glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina
 20 morfolina amida, con la excepción de que X_1 no es Leucina (L),
 X_2 no es Alanina (A) y X_3 no es glicina (G), donde el aminoácido
 no natural se selecciona del grupo que consiste en L-
 propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-
 naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-
 25 fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-
 prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-
 fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina,
 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-
 cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH
 30 para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil
 indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-
 isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-

metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-
 bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-
 L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-
 alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina,
 5 benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-
 alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-
 ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-
 L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-
 Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-
 10 hidroxil-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-
 fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-
 tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-
 serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil
 glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster
 15 glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina
 morfolina amida.. En determinadas modalidades, el péptido de
 nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une VEGF-A
 comprende un L3 donde X_1 es un aminoácido seleccionado de M,
 F, L, V y X; X_2 es un aminoácido seleccionado de S, N, Q, I,
 20 Y, E, V, T y X; y X_3 es un aminoácido seleccionado de D, Q,
 T, N, E, R y X, donde X es un aminoácido no natural
 seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-
 , L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-
 naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-
 25 fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-
 bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-
 (trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-
 fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-
 fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-
 30 alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-
 alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil
 indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-

fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-
 5 alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-hidroxi-L-
 10 fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol,
 15 éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L4, donde cada uno de X_1 es cualquier aminoácido excepto V o un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en L-
 20 propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina,
 25 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-
 30 metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-

alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-

5 L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-hidroxi-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-

10 serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-

15 A comprende un L4, donde es X_1 es I, L o X, donde X es un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-

20 prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil

25 indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-

30 alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-

ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-hidroxi-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metilglicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida. En determinadas modalidades, el péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L5, donde X_3 es Y o un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluorobencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-hidroxi-L-

fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil glicina, glicina
 5 amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida; X₅ es S o un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-
 10 clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-
 15 fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-
 20 quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-
 25 L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-hidroxi-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-
 30 serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina

morfolina amida; y donde X_1 , X_2 y X_4 son cada uno cualquier aminoácido o un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-
 5 clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-
 10 fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-
 15 quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-
 20 L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-hidroxi-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil
 25 glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida, con la excepción de que X_1 no es G, X_2 no es P y/o X_4 no es G. En determinadas modalidades, el péptido de nudo
 30 de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L5, donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido o un aminoácido con la excepción de que X_2 no es

prolina (P). En determinadas modalidades, el péptido de nudo
 de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A
 comprende un L5, donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier
 aminoácido o un aminoácido con la excepción de que X_4 no es
 5 glicina (G). En determinadas modalidades, el péptido de nudo
 de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A
 comprende un L5, donde X_1 es un aminoácido seleccionado de Q,
 H y X; X_2 es un aminoácido seleccionado de Y, W y X; X_3 es Y o
 X; X_4 es un aminoácido seleccionado de Q, N o X; X_5 es S o X,
 10 donde X es un aminoácido no natural seleccionado del grupo que
 consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-
 norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-
 clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina,
 gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-
 15 OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-
 bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-
 L-fenilalanina, 4-cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-
 fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH
 meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil
 20 indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-
 indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina,
 L-4,4'-bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-
 quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-
 2-piridil-alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-
 25 alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-
 butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-
 ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-
 L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-
 Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-
 30 hidroxil-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-
 fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-
 tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-

serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida. En determinadas modalidades, el péptido de

5 nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L2 donde X_1 es G o X; X_2 es R, P o X; X_3 es D o X; X_4 es F, I o X; y X_5 es E, D o X, donde X es un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina-PEG₆-, L-sulfotirosina, L-norleucina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, L-2-clorotriptófano, L-3-fluorotirosina, L-4-fluorofenilalanina, gamma-bencil-L-prolina, gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina, 4-OH-L-prolina, 4-fluoro-L-prolina, 4-[4-(trifluorometil)-bencil]-L-prolina, 3,4-difluoro-L-fenilalanina, 3,4-dicloro-L-fenilalanina, 4-

10 cloro-L-fenilalanina, 3-F,4-Cl-L-fenilalanina, 2-piridona(NH para)-L-alanina, piridona(NH meta)-L-alanina, 3-(1-N-metil indol)-L-alanina, 3-(1-N-etil indol)-L-alanina, 3-(1-N-isopropil indol)-L-alanina, 3-(5-aza-indol)-L-alanina, 4-metil-L-fenilalanina, 2-naftil-L-alanina, L-4,4'-

20 bifenilalanina, 3-(3-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinolinil)-L-alanina, 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina, 4-metil-2-piridil-L-alanina, 4-etil-2-piridil-L-alanina, benzotiazol-L-alanina, benzotiofeno-L-alanina, 3-isoquinolinil-L-alanina, t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentil glicina), 3-

25 ciclobutil-L-alanina, ciclopentil-L-alanina, 5,5,5-Trifluoro-L-leucina, t-butil-L-glicina (también conocida como L-tert-Leucina), L-ciclopentilglicina, L-ciclobutilglicina, 3,4-hidroxi-L-fenilalanina, 3,4-fluoro-L-fenilalanina, 3-fluoro,4-OH-L-fenilalanina, 2-cloro-L-tirosina, 2-metil-L-

30 tirosina, 2-etil-L-tirosina, 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina, D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metil glicina, glicina amida, éster glicínico de glicerol, éster

glicínico de glicol, éster glicínico de oxetano-3-ilo y glicina morfolina amida.

En determinadas modalidades, el extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está
 5 modificado (por ejemplo, tiene los extremos protegidos). En determinadas modalidades, el extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está modificado (por ejemplo, tiene los extremos protegidos). En determinadas modalidades, tanto el extremo C como el extremo N
 10 del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A están modificados (por ejemplo, tienen los extremos protegidos). En determinadas modalidades, el grupo carboxilo del extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está amidado. En
 15 determinadas modalidades, el grupo amina del extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está acetilado. En determinadas modalidades, el grupo carboxilo del extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está amidado y
 20 el grupo amina del extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está acetilado. También se proporciona en la presente un péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF, donde el CKP comprende la estructura de armazón de cistina proporcionada
 25 a continuación (es decir la estructura de armazón I):

$Z_1C_1L1C_2L2C_3L3C_4L4C_5L5C_6Z_2$ (I)

donde:

Z_1 y Z_2 son cualquier aminoácido;

30 $L1$ es el Bucle 1 y tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en: $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$, $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$, y $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$, donde cada uno de $X_1 - X_{10}$ es cualquier

aminoácido;

L2 es el Bucle 2 y tiene la estructura: $X_1X_2X_3X_4X_5$, donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido;

L3 es el Bucle 3 y tiene la estructura: $X_1X_2X_3$ donde cada uno
5 de $X_1 - X_3$ es cualquier aminoácido;

L4 es el Bucle 4 y tiene la estructura: X_1 , donde X_1 es cualquier aminoácido;

L5 es el Bucle 5 y tiene la estructura: $X_1X_2X_3X_4X_5$, donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido; donde,

10 el CKP tiene una conectividad de enlace disulfuro alterada en referencia a una proteína inhibidora de la tripsina EETI-II de *Ecballium elaterium* natural que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 1; donde la conectividad de enlace disulfuro alterada es C1-C4, C2-C3 y C5-C6; y donde el
15 CKP tiene un porcentaje de contenido de hélice alfa de al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45% o al menos aproximadamente 50%, incluido
20 cualquier rango entre estos valores.

En determinadas modalidades, el CKP de origen no natural se une a VEGF-A con una afinidad de 500 pM o menor.

En determinadas modalidades, la afinidad de unión del CKP de origen no natural por VEGF-A se determina, por ejemplo, a
25 través de resonancia de plasmones superficiales u otros ensayos detallado en los Ejemplos más adelante.

En determinadas modalidades, Z_1 y/o Z_2 del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A es G.

En determinadas modalidades, Z_1 y/o Z_2 comprenden más de un
30 aminoácido. En determinadas modalidades, Z_1 y/o Z_2 comprenden 4 aminoácidos. En determinadas modalidades, Z_1 y/o Z_2 comprenden 5 aminoácidos. En determinadas modalidades, Z_1 y/o Z_2 son un

aminoácido no natural. En determinadas modalidades, el aminoácido no natural es N-acetiglicina o glicina amida.

En determinadas modalidades, el extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está modificado (por ejemplo, tiene los extremos protegidos). En

5 determinadas modalidades, el extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está modificado (por ejemplo, tiene los extremos protegidos). En determinadas modalidades, tanto el extremo C como el extremo N

10 del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A están modificados (por ejemplo, tiene los extremos protegidos). En determinadas modalidades, el grupo carboxilo del extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está amidado. En

15 determinadas modalidades, el grupo amina del extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está acetilado. En determinadas modalidades, el grupo carboxilo del extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está amidado y

20 el grupo amina del extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está acetilado. En determinadas modalidades, el CKP de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L5, donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido con la excepción de que X_2 no es prolina (P).

25 En determinadas modalidades, el CKP de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L5, donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido con la excepción de que X_4 no es glicina (G). En determinadas modalidades, el CKP de origen no natural que se une a VEGF-A inhibe la actividad de VEGF-A con una CI_{50}

30 de aproximadamente 0.5 nM y aproximadamente 1.0 nM. En determinadas modalidades, el grado de inhibición se determina a través de ensayo de CI_{50} celular, tal como se describe con

mayor detalle en los Ejemplos más adelante.

En determinadas modalidades, el CKP de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos HMMYDY (SEQ ID NO: 231) o K/P/Q/R-K/T/L/D-W/T/M/L-Q/R/D-W/F/P/V-W/K/F-Y/Q/W-M/Y/G/D (SEQ ID NO: 115) o E/G/P/Q/R/T/V-T/E/A/D-D/T/I/P-W/V/Q/T/W-Y/F/N/E/P/K-P/E/W/N/P-H/Q/K/W/H-Q/F/E/A/D/W-I/L/H-D/W/P/Y/T/M/N (SEQ ID NO: 232), en referencia a la estructura de almacén I indicada anteriormente. En determinadas modalidades, el CKP de origen

10 no natural que se une a VEGF-A comprende además un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93). En determinadas modalidades, el CKP de origen no natural que se une a VEGF-A comprende además un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG. En determinadas modalidades, el

15 CKP de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L4 que comprende V o F. En determinadas modalidades, el CKP de origen no natural que se une a VEGF-A comprende L5 que comprende la secuencia de aminoácidos G/E/Y/Q/H-P/M/W/Y-N/Y/W-G/D/T/Q/R/S-F/A/E/S (SEQ ID NO: 20) o SWWPSL (SEQ ID NO: 237).

20 En determinadas modalidades, el CKP de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 8-14 y 225-230, en referencia a la estructura de almacén I indicada anteriormente. En determinadas modalidades,

25 el CKP de origen no natural que se une a VEGF-A comprende además un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93). En determinadas modalidades, el CKP de origen no natural que se une a VEGF-A comprende además un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG. En determinadas

30 modalidades, el CKP de origen no natural que se une a VEGF-A comprende un L4 que comprende V o F. En determinadas modalidades, el CKP de origen no natural que se une a VEGF-A

comprende un L5 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID N0s 15-18 y 233-238). Las secuencia de aminoácidos de SEQ ID N0s 8-18, 225-230 y 233-238 se proporcionan en la **Tabla 1** a continuación.

5

10 Tabla 1

15	ETDWYPHQID (SEQ ID NO: 225)
	GETVFEQFLW (SEQ ID NO: 226)
	HMMYDY (SEQ ID NO: 227)
	KKWQWWYM (SEQ ID NO: 228)
	PAIQNWKEHP (SEQ ID NO: 229)
	PTTRFKQY (SEQ ID NO: 8)
20	QDPTFNWALY (SEQ ID NO: 9)
	QLMHPPFWG (SEQ ID NO: 230)
	QLMQPFWG (SEQ ID NO: 10)
	RDLDVKWD (SEQ ID NO: 11)
	RTPWEPHDIT (SEQ ID NO: 12)
	TTPWPPHEIM (SEQ ID NO: 13)
25	VTPWKPHWIN (SEQ ID NO: 14)
	GPNGF (SEQ ID NO: 233)
	GPNGF (SEQ ID NO: 234)
	EMYDA (SEQ ID NO: 235)
	YPWTE (SEQ ID NO: 236)
	SWWPSL (SEQ ID NO: 237)
30	GPNGF (SEQ ID NO: 15)
	QMYQS (SEQ ID NO: 16)
	HWYRS (SEQ ID NO: 238)
	HWYQS (SEQ ID NO: 17)
	QYYSS (SEQ ID NO: 18)
	GPNGF (SEQ ID NO: 19)

5

- 10 En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 21-17 y 239-244. Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 21-17 y 239-244 se proporcionan en la **Tabla 2** a continuación.

15

Tabla 2

20	GCETDWYPHQIDCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO: 239)
	GCGETVFEQFLWCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO: 240)
	GCHMMYDYCKQDSDCLAGCVCEMYDACG (SEQ ID NO: 241)
	GCKKWQWWYMCKQDSDCLAGCVCPWTECG (SEQ ID NO: 242)
	GCPAIQNWKEHPCKQDSDCLAGCVCSWWPSLCG (SEQ ID NO: 243)
25	GCPTTRFKQYCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO: 21)
	GCQDPTFNWALYCKQDSDCLAGCVQMYQSCG (SEQ ID NO: 22)
	GCQLMHPFWGCKQDSDCLAGCVCHWYRSCG (SEQ ID NO: 244)
	GCQLMQPFWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO: 23)
	GCRDLDVKWDCKQDSDCLAGCFCQYYSSCG (SEQ ID NO: 24)
30	GCRTPWEPHDITCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO: 25)
	GCTTPWPPHEIMCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO: 26)
	GCVTPWKPHWINCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO: 27)

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos Q/H/E/N/D-L/V/R/P/I-M/F/L-Q/E/R/L-P-F/L/S-W-G (SEQ ID NO: 358), en referencia a la estructura de armazón I

5 indicada anteriormente. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L3 que comprende la secuencia

10 de aminoácidos LAG. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L4 que comprende el aminoácido V. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos HWYQS (SEQ ID NO:

15 17).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs 33, 36 y 245-253, en referencia a la estructura de

20 armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L3 que comprende la secuencia de

25 aminoácidos LAG. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L4 que comprende el aminoácido V. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos HWYQS (SEQ ID NO:

30 17). Las secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs 33, 36 y 245-253 se proporcionan en la Tabla 3 a continuación:

5

Tabla 3

10

15

20

HLFEPLWG (SEQ ID NO: 245)
QVMRPFWG (SEQ ID NO: 246)
QVMQPAWG (SEQ ID NO: 247)
HRLQPLWG (SEQ ID NO: 248)
ELLQPSWG (SEQ ID NO: 249)
NPMLPFWG (SEQ ID NO: 33)
NVLLPLWG (SEQ ID NO: 250)
DIMQPLWG (SEQ ID NO: 36)
DLMQPLWG (SEQ ID NO: 251)
NPMLPLWG (SEQ ID NO: 252)
QVLQPSWG (SEQ ID NO: 253)

25

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 265-275. Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 265-275 se proporcionan en la **Tabla 4** a continuación.

Tabla 4

GCHLFEPLWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO: 265)
GCQVMRPFWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO: 266)
GCQVMQPAWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO: 267)
GCHRLQPLWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO: 268)
GCELLQPSWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO: 269)
GCNPMLPFWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO: 270)
GCNVLLPLWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO: 271)
GCDIMQPLWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO: 272)
GCDLMQPLWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO: 273)

5

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
10 no natural comprende además un L1 que comprende la secuencia
de aminoácidos QLMQPFWG (SEQ ID NO: 10), en referencia a la
estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP
de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L2
que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO:
15 93). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de
origen no natural comprende además un L3 que comprende la
secuencia de aminoácidos LAG. En determinadas modalidades, el
CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un
L4 que comprende el aminoácido V. En determinadas modalidades,
20 el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además
un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos R/H-W-Y-N/Q/H-S
(SEQ ID NO: 359).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
no natural comprende además un L1 que comprende la secuencia
25 de aminoácidos QLMQPFWG (SEQ ID NO: 10), en referencia a la
estructura de armazón I indicada anteriormente. En determinadas
modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural
comprende además un L2 que comprende la secuencia de
aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93). En determinadas modalidades,
30 el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además
un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG. En
determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen

no natural comprende además un L4 que comprende el aminoácido V. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L5 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en
 5 HWYQS (SEQ ID NO: 17), RWHYS (SEQ ID NO: 43) y RWHNS (SEQ ID NO: 133).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NOs: 276-278.
 10 Las SEQ ID NOs 23, 276 y 278 se proporcionan en la **Tabla 5** a continuación.

Tabla 5

15	GCQLMQPFWGCKQDSDCLAGCVCRWHNSCG (SEQ ID NO: 276)
	GCQLMQPFWGCKQDSDCLAGCVCHWHYQSCG (SEQ ID NO: 23)
	GCQLMQPFWGCKQDSDCLAGCVCRWHYHSCG (SEQ ID NO: 278)

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
 20 no natural comprende además un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos Q/D/K/N/A/R/H-L/V/I/R/P/V/-M/L/S/T/F-Q/E/L/H-P-F/L/M/Y/S-W-G (SEQ ID NO: 40), en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L2 que
 25 comprende la secuencia de aminoácidos KQSD (SEQ ID NO: 93). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L4 que
 30 comprende el aminoácido V. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos H/L/R/Q/-W/F/Y-Y-

Q/N/K/H/D/E-S (SEQ ID NO: 360).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NOs: 28-39 y 254-261, en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L4 que comprende el aminoácido V. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L5 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NOs: 17, 41-46, 133 262, 264, y 567. Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 17, 28-39, 41-46, 133, 254, 264 y 567 se proporcionan en la **Tabla 6** a continuación:

20

25

30

5 Tabla 6

	DVLQPFWG (SEQ ID NO: 28)	HWYQS (SEQ ID NO: 17)
	QISQPFWG (SEQ ID NO: 29)	HFYNS (SEQ ID NO: 41)
	DRMQPLWG (SEQ ID NO: 30)	LWYKS (SEQ ID NO: 42)
10	QLLEPMWG (SEQ ID NO: 254)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)
	KLLQPMWG (SEQ ID NO: 255)	QWYKS (SEQ ID NO: 262)
	DRMQPYWG (SEQ ID NO: 256)	RWYHS (SEQ ID NO: 43)
	NLMLPFWG (SEQ ID NO: 31)	RWYQS (SEQ ID NO: 44)
	QRTQPFWG (SEQ ID NO: 32)	LWYDS (SEQ ID NO: 263)
15	KIMQPLWG (SEQ ID NO: 257)	QYYQS (SEQ ID NO: 45)
	NLMHPFWG (SEQ ID NO: 258)	RWYNS (SEQ ID NO: 133)
	NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33)	QWYQS (SEQ ID NO: 264)
	DPMQPFWG (SEQ ID NO: 34)	NPMLPLWG (SEQ ID NO: 38)
	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	KLFEPLWG (SEQ ID NO: 39)
20	DIMQPLWG (SEQ ID NO: 36)	RWYES (SEQ ID NO: 567)
	ALLQPLWG (SEQ ID NO: 259)	
	QLLQPLWG (SEQ ID NO: 37)	
	RLLEPSWG (SEQ ID NO: 260)	
25	HLLLPLWG (SEQ ID NO: 261)	

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NOs: 47-59 y 279-286. Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 47-59 y 279-286 se proporcionan en la **Tabla 7** a continuación.

5 Tabla 7

10	GCDVLQPFWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO: 47)
	GCQISQPFWGCKQDSDCLAGCVCHFYNQSCG (SEQ ID NO: 48)
	GCDRMQPLWGCKQDSDCLAGCVCLWYKSCG (SEQ ID NO: 49)
	GCQLLEPMWGCKQDSDCLAGCVCHWYNQSCG (SEQ ID NO: 279)
	GCKLLQPMWGCKQDSDCLAGCVCRWYQSCG (SEQ ID NO: 280)
	GCDRMQPYWGCKQDSDCLAGCVCQWYKSCG (SEQ ID NO: 281)
	GCNLMPLFWGCKQDSDCLAGCVCRWYHSCG (SEQ ID NO: 50)
15	GCQRTQPFWGCKQDSDCLAGCVCRWYQSCG (SEQ ID NO: 51)
	GCKIMQPLWGCKQDSDCLAGCVCLWYDSCG (SEQ ID NO: 282)
	GCNLMHPFWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO: 283)
	GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 52)
	GCNPMLPFWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO: 53)
20	GCDPMQPFWGCKQDSDCLAGCVCRWYQSCG (SEQ ID NO: 54)
	GCDVMQPYWGCKQDSDCLAGCVCHWYNQSCG (SEQ ID NO: 55)
	GCDIMQPLWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO: 56)
	GCALLQPLWGCKQDSDCLAGCVCRWYNQSCG (SEQ ID NO: 284)
	GCQLLQPLWGCKQDSDCLAGCVCRWYQSCG (SEQ ID NO: 57)
25	GCRLLEPSWGCKQDSDCLAGCVCQWYQSCG (SEQ ID NO: 285)
	GCHLLLPLWGCKQDSDCLAGCVCRWYHSCG (SEQ ID NO: 286)
	GCNPMLPLWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO: 58)
	GCKLFEPLWGCKQDSDCLAGCVCRWYESCG (SEQ ID NO: 59)

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
no natural comprende además un L1 que comprende la secuencia
de aminoácidos Q/D/K/W/E/L/R-D/N-P/R/L/T-T/S/L/K-F/V/L/I-N/D-
W-A/S/G-L/V/E/T/Q/D-F/Y (SEQ ID NO: 70), en referencia a la

estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L4 que comprende el aminoácido V.. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos Q/R-M/L/F/H-Y/F/H-D/Q/N/K-S/T (SEQ ID NO: 80). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NOs: 60-69 y 287-291. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L4 que comprende el aminoácido V.. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L5 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 16, 71-79 y 292. Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 16, 60-69, 71-79 y 287-292 se proporcionan en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8

5	DDPSFDWSVY (SEQ ID NO: 287)
	KNPLFNWALY (SEQ ID NO: 60)
	QDPTVNWAVY (SEQ ID NO: 61)
	QDPTFNWAEY (SEQ ID NO: 62)
10	WDPTFNWALY (SEQ ID NO: 288)
	QDPTLNWATY (SEQ ID NO: 289)
	EDPTVDWAQY (SEQ ID NO: 290)
	QDPSLNWADY (SEQ ID NO: 63)
	LDRTLNWALY (SEQ ID NO: 64)
15	LDPSFNWSLY (SEQ ID NO: 65)
	RDLTINWALF (SEQ ID NO: 66)
	KDTTFNWGLF (SEQ ID NO: 291)
	LDPTVNWALF (SEQ ID NO: 67)
	QDPKLNWAVY (SEQ ID NO: 68)
20	LDPSFDWALY (SEQ ID NO: 69)
	RMYS (SEQ ID NO: 292)
	QLFDS (SEQ ID NO: 71)
	QFYQS (SEQ ID NO: 72)
	QLYQS (SEQ ID NO: 73)
25	QMYDS (SEQ ID NO: 76)
	QMYQS (SEQ ID NO: 16)
	QMHQS (SEQ ID NO: 74)
	QMYNS (SEQ ID NO: 75)
	QLYQS (SEQ ID NO: 73)
30	QHYKT (SEQ ID NO: 77)
	QLFNS (SEQ ID NO: 78)
	QLYNS (SEQ ID NO: 79)
	QMFNS (SEQ ID NO: 274)

- 5 En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID N0s: 81-91 y 293-297. Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N0s: 81-91 y 293-297 se proporcionan en la **Tabla 9** a continuación.

10

Tabla 9

15

20

25

GCDDPSFDWSVYCKQSDCLAGCVC RMYDSCG	(SEQ ID N0: 293)
GCKNPLFNWALYCKQSDCLAGCVCQLFDSCG	(SEQ ID N0: 81)
GCQDPTVNWAVYCKQSDCLAGCVCQFYQSCG	(SEQ ID N0: 82)
GCQDPTFNWAEYCKQSDCLAGCVCQLYQSCG	(SEQ ID N0: 83)
GCWDPTFNWALYCKQSDCLAGCVCQMYDSCG	(SEQ ID N0: 294)
GCQDPTFNWAEYCKQSDCLAGCVCQMYQSCG	(SEQ ID N0: 84)
GCQDPSLNWADYCKQSDCLAGCVCQMHQSCG	(SEQ ID N0: 85)
GCQDPTLNWATYCKQSDCLAGCVCQMYQSCG	(SEQ ID N0: 295)
GCEDPTVDWAQYCKQSDCLAGCVCQMYQSCG	(SEQ ID N0: 296)
GCLDRTLNWALYCKQSDCLAGCVCQMYNSCG	(SEQ ID N0: 86)
GCLDPSFNWSLYCKQSDCLAGCVCQMYDSCG	(SEQ ID N0: 87)
GCRDLTINWALFCKQSDCLAGCVCQMFNSCG	(SEQ ID N0: 88)
GCKDPTFNWGLFCKQSDCLAGCVCQLYQSCG	(SEQ ID N0: 297)
GCLDPTVNWALFCKQSDCLAGCVCQHYKTCG	(SEQ ID N0: 89)
GCQDPKLNWAVYCKQSDCLAGCVCQLFNNSCG	(SEQ ID N0: 90)
GCLDPSFDWALYCKQSDCLAGCVCQLYNNSCG	(SEQ ID N0: 91)

30

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de

aminoácidos NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33), en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos K/G/Q/S/N-
5 Q/L/P/A/V/T/R/W/K/G/Y-D/S/E/N-S/F/Y/L/F/Q/M-D/E/N/A/L/F/H/Q (SEQ ID NO: 98). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural
10 comprende además un L4 que comprende el aminoácido V.. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos QYYQS (SEQ ID NO: 45). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
15 no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33), en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L2 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona
20 del grupo que consiste en la SEQ ID NOs: 94-97 y 298-309. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L4 que
25 comprende el aminoácido V.. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos QYYQS (SEQ ID NO: 45). Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 94-97 y 298-309 se proporcionan en **Tabla 10** a continuación.

Tabla 10

5	GQSFE (SEQ ID NO: 94)	GWDQF (SEQ ID NO: 304)
	GLDYD (SEQ ID NO: 95)	GKDFH (SEQ ID NO: 305)
	GPELN (SEQ ID NO: 298)	GPDLQ (SEQ ID NO: 96)
	QADYA (SEQ ID NO: 299)	SGDFA (SEQ ID NO: 306)
	GVDYL (SEQ ID NO: 300)	GKELN (SEQ ID NO: 307)
10	GTNFL (SEQ ID NO: 301)	GWSMD (SEQ ID NO: 308)
	SRDFD (SEQ ID NO: 302)	GYDLQ (SEQ ID NO: 309)
	NRDFL (SEQ ID NO: 303)	GRDFE (SEQ ID NO: 97)

15 En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NOs: 99-102 y 310-321. Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 99-102 y 310-321 se proporcionan en **Tabla 11** a continuación.

20

25

30

Tabla 11

5	GCNIMLPFWGCGQSFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 99)
	GCNIMLPFWGCGLDYDCLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 100)
	GCNIMLPFWGCGPELNCLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 310)
	GCNIMLPFWGCGQADYACLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 311)
10	GCNIMLPFWGCGVDYLCLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 312)
	GCNIMLPFWGCGTNFLCLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 313)
	GCNIMLPFWGCSRDFDCLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 314)
	GCNIMLPFWGCNRDFLCLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 315)
	GCNIMLPFWGCGWDQFCLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 316)
15	GCNIMLPFWGCGKDFHCLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 317)
	GCNIMLPFWGCGPDLQCLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 101)
	GCNIMLPFWGCGSGDFACLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 318)
	GCNIMLPFWGCGKELNCLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 319)
20	GCNIMLPFWGCGWSMDCLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 320)
	GCNIMLPFWGCGYDLQCLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 321)
	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 102)

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
 25 no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de
 aminoácidos N-I-M/L-L/S/T/Q/N/E/D-P-F/Y/S-WG (SEQ ID NO: 454),
 en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas
 modalidades, el CKP de unión a VEGF-A comprende un L1 que
 comprende la secuencia de aminoácidos NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33),
 30 en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas
 modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural
 comprende además un L2 que comprende la secuencia de

aminoácidos GRDFE (SEQ ID NO: 97). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos L/V/M/F-A/Q/E/S/N/Y/I/T-G/Q/R/D/T/N/E. En determinadas modalidades, el

5 CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L4 que comprende el aminoácido V o I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos QYYQS (SEQ ID NO: 45).

10 En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33), NILLPFWG (SEQ ID NO: 396), NILLPYWG (SEQ ID NO: 397), NIMSPFWG (SEQ ID NO: 398), NIMTPFWG (SEQ ID NO: 399), NIMQPFWG (SEQ ID NO: 400),

15 NIMNPFWG (SEQ ID NO: 401), NIMEPFWG (SEQ ID NO: 402), NIMDPFWG (SEQ ID NO: 403), NIMLPSWG (SEQ ID NO: 414) y NIMLPYWG (SEQ ID NO: 141), en referencia al a estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de

20 aminoácidos NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33), en referencia a la estructura de armazón V o I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GRDFE (SEQ ID NO: 97). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de

25 origen no natural comprende además un L3 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en: LQQ, VER, MSD, MNQ, MQT, VYQ, FIN, VSQ, VTE, FYE, MEQ y VYR. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L4 que

30 comprende el aminoácido I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos QYYQS (SEQ ID NO:

45).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 103-114.

- 5 Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 103-114 se proporcionan en la **Tabla 12** a continuación.

Tabla 12

10	GCNIMLPFWGCGRDFECLQQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 103)
	GCNIMLPFWGCGRDFECVERCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 104)
	GCNIMLPFWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 105)
	GCNIMLPFWGCGRDFECMNQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 106)
15	GCNIMLPFWGCGRDFECMQTCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 107)
	GCNIMLPFWGCGRDFECVYQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 108)
	GCNIMLPFWGCGRDFECFINCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 109)
	GCNIMLPFWGCGRDFECVSQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 110)
20	GCNIMLPFWGCGRDFECVTECICQYYQSCG (SEQ ID NO: 111)
	GCNIMLPFWGCGRDFECFYECICQYYQSCG (SEQ ID NO: 112)
	GCNIMLPFWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 113)
	GCNIMLPFWGCGRDFECVYRCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 114)
25	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICHWYNCSG (SEQ ID NO: 386)
	GCNILLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 405)
	GCNILLPYWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 406)
	GCNIMSPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 407)
30	GCNIMTPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 408)
	GCNIMQPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 409)
	GCNIMNPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 410)
	GCNIMEPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 411)
	GCNIMDPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 412)
	GCNIMLPSWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 415)
	GCNIMLPFWGCGRDFECLSGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 421)

5

GCNIMLPFWGCGRDFECLTGCVQCYYQSCG (SEQ ID NO: 422)
GCNIMLPFWGCGRDFECLEGVCVCYYQSCG (SEQ ID NO: 423)
GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCLCYYQSCG (SEQ ID NO: 424)
GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCICYYQSCG (SEQ ID NO: 425)
GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCYYQSCS (SEQ ID NO: 431)
GCNILLPYWGCGRDFECMEQCICYYQSCG (SEQ ID NO: 435)

10

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35), en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos K/G/D/A/E-Q/E/R/V/P/D/M/G/N/L/A/F-D/N/Y/S-S/F/L/I/M/Y/V/N/E-D/L/Q/S/E/T/L/A/N (SEQ ID NO: 121). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L4 que comprende el aminoácido V.. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos HWYNS (SEQ ID NO: 46).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35), en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L2 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona

30

del grupo que consiste en la SEQ ID NOs: 117-120, 211 y 322-339. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG. En determinadas modalidades, el

5 CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L4 que comprende el aminoácido V.. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos HWYNS (SEQ ID NO: 46). Las secuencias de

10 aminoácidos de las SEQ ID NOs: 117-120, 211 y 322-339 se proporcionan en **Tabla 13** a continuación.

Tabla 13

15	GENFL (SEQ ID NO: 117)	DGDFD (SEQ ID NO: 331)
	GRDLQ (SEQ ID NO: 322)	AGDFE (SEQ ID NO: 332)
	GVDLS (SEQ ID NO: 323)	EMDFD (SEQ ID NO: 120)
	GPDID (SEQ ID NO: 118)	GNSFE (SEQ ID NO: 333)
	GDDLE (SEQ ID NO: 324)	GQDLT (SEQ ID NO: 334)
20	GVDMT (SEQ ID NO: 325)	GENLA (SEQ ID NO: 335)
	GMDIE (SEQ ID NO: 326)	GQDYN (SEQ ID NO: 336)
	DGDYQ (SEQ ID NO: 327)	GADLS (SEQ ID NO: 337)
	GNDVS (SEQ ID NO: 328)	GFDMD (SEQ ID NO: 338)
25	GRDMD (SEQ ID NO: 119)	GESLS (SEQ ID NO: 211)
	AGDEL (SEQ ID NO: 329)	DLNYE (SEQ ID NO: 339)
	GLDEE (SEQ ID NO: 330)	

30 En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NOs: 122-126 y

340-357. Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: SEQ ID NOs: 122-126 y 340-357 se proporcionan en **Tabla 14** a continuación.

5 Tabla 14

10	GCDVMQPYWGCGENFLCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 122)
	GCDVMQPYWGCGRDLQCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 340)
	GCDVMQPYWGCGVDLSCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 341)
	GCDVMQPYWGCGPDIDCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 123)
	GCDVMQPYWGCGDDLECLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 342)
15	GCDVMQPYWGCGVDMTCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 343)
	GCDVMQPYWGCGMDIECLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 344)
	GCDVMQPYWGCDGDYQCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 345)
	GCDVMQPYWGCGNDVSCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 346)
	GCDVMQPYWGCGRDMDCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 124)
20	GCDVMQPYWGCAGDELCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 347)
	GCDVMQPYWGCGLDEECLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 348)
	GCDVMQPYWGCDGDFDCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 349)
	GCDVMQPYWGCAGDFECLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 350)
	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 125)
25	GCDVMQPYWGCGNSFECLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 351)
	GCDVMQPYWGCGQDLTCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 352)
	GCDVMQPYWGCGENLACLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 353)
	GCDVMQPYWGCGQDYNCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 354)
	GCDVMQPYWGCGADLSCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 355)
30	GCDVMQPYWGCGFMDCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 356)
	GCDVMQPYWGCGESLSCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 126)
	GCDVMQPYWGCDLNYECLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 357)

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos D-V-M/L-Q/K/D-P-Y/M/T/L-W-G (SEQ ID NO: 130), en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos

KQDSD (SEQ ID NO: 93). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L4 que comprende el aminoácido V.. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos H/L/Q/R-W-Y-N-S (SEQ ID NO: 134).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs: 127-129 en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos

KQDSD (SEQ ID NO: 93). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L4 que comprende el aminoácido V.. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L5 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 131-133. Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 127-129 y 131-133 se proporcionan en **Tabla 15** a

continuación:

Tabla 15

5	DVMKPMWG (SEQ ID NO: 127)	QWYNS (SEQ ID NO: 131)
	DVLDPTWG (SEQ ID NO: 128)	LWYNS (SEQ ID NO: 132)
	DVLQPLWG (SEQ ID NO: 129)	RWYNS (SEQ ID NO: 133)

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
 10 no natural comprende una secuencia de aminoácidos que se
 selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NOs: 135-137.
 Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 135-127 se
 proporcionan en la **Tabla 16** a continuación:

15 Tabla 16

GCDVMKPMWGCKQDSDCLAGCVCQWYNSCG (SEQ ID NO: 135)
GCDVLDPTWGCKQDSDCLAGCVCLWYNSCG (SEQ ID NO: 136)
GCDVLQPLWGCKQDSDCLAGCVCRWYNSCG (SEQ ID NO: 137)

20

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
 no natural comprende además un L1 que comprende la secuencia
 de aminoácidos DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35), en referencia a la
 estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP
 25 de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L2
 que comprende la secuencia de aminoácidos
 GPDID (SEQ ID NO: 118). En determinadas modalidades, el CKP de
 unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L3 que
 comprende la secuencia de aminoácidos HWYNS L/F-A/V/S-G/R/N.
 30 En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
 no natural comprende además un L4 que comprende un aminoácido
 que se selecciona de V, I e L. En determinadas modalidades,

el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos HWYNS (SEQ ID NO: 46).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
5 no natural comprende además un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35), en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos

10 GPDID (SEQ ID NO: 118). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L3 que comprende una secuencia de aminoácidos FVR y LSN. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L4 que comprende un aminoácido
15 que se selecciona de V, I e L. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos HWYNS (SEQ ID NO: 46).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
20 no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCDVMQPYWGCGPDIDCFVRCICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 139). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCDVMQPYWGCGPDIDCFVRCLCHWYNNSCG (SEQ ID NO: 140).

25 En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1, L2, L3, L4 y/o L5 de cualquiera de los CKP de unión a VEGF-A de origen no natural divulgados en la presente. Por lo tanto, en determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1 que
30 comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NOs: 8-14, 28-39, 60-69, 127-129, 141, 225-230, 245-261, 287-291, 396-403 y 414 en

referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L2 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NOs: 93-97, 117-120, 211, 298-309 y 322-339. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L3 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en LAG, LQQ, VER, MSD, MNQ, MQT, VYQ, FIN, FSQ, VTE, FYE, MEQ y VYR, FVR y LSN. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L4 que comprende el aminoácido V, F, I o L. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende además un L5 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NOs: 15-18, 41-46, 71-79, 131-133, 233-238, 262-264 y 292. En determinadas modalidades, el extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está modificado (por ejemplo, tiene los extremos protegidos). En determinadas modalidades, el extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está modificado (por ejemplo, tiene los extremos protegidos). En determinadas modalidades, tanto el extremo C como el extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A están modificados (por ejemplo, tienen los extremos protegidos). En determinadas modalidades, el grupo carboxilo del extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está amidado. En determinadas modalidades, el grupo amina del extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está acetilado. En determinadas modalidades, el grupo carboxilo del extremo C del péptido de nudo de cistina

(CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está amidado y el grupo amina del extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está acetilado. En determinadas modalidades, se elimina al menos un aminoácido de un CKP de unión a VEGF-A proporcionado en la presente. En determinadas modalidades, se elimina al menos un aminoácido del extremo N. En determinadas modalidades, se elimina al menos un aminoácido del extremo C. En determinadas modalidades, se elimina al menos un aminoácido del extremo N y del extremo C. En determinadas modalidades, se elimina al menos un aminoácido interno. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A comprende la secuencia de aminoácidos CNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYYQSC (SEQ ID NO: 217). En determinadas modalidades, el extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está modificado (por ejemplo, tiene los extremos protegidos). En determinadas modalidades, el extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está modificado (por ejemplo, tiene los extremos protegidos). En determinadas modalidades, tanto el extremo C como el extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A están modificados (por ejemplo, tienen los extremos protegidos). En determinadas modalidades, el grupo carboxilo del extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está amidado. En determinadas modalidades, el grupo amina del extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está acetilado. En determinadas modalidades, el grupo carboxilo del extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está amidado y el grupo amina del extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está acetilado.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende al menos una adición de aminoácido. En determinadas modalidades, se agrega al menos un aminoácido al extremo N. En determinadas modalidades, se agrega al menos un aminoácido al extremo C. En determinadas modalidades, se agrega al menos un aminoácido al extremo N y al extremo C.

En determinadas modalidades, se agregan dos aminoácidos al extremo N de CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente. En determinadas modalidades, se agregan dos aminoácidos al extremo N de CKP de unión a VEGF-A de origen no natural establecido en GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 102). En determinadas modalidades, los dos aminoácidos que se agregan al extremo N de SEQ ID NO: 102 son F/I/G/T/V/L-H/A/S/R. En determinadas modalidades, los dos aminoácidos que se agregan al extremo N de SEQ ID NO: 102 se seleccionan del grupo que consiste en: FH, IA, GS, TR, VH y LS. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende una secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGFH (SEQ ID NO: 379). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende una secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGIA (SEQ ID NO: 380). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende una secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGGS (SEQ ID NO: 381). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende una secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGTR (SEQ ID NO: 382). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende una secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGVH (SEQ ID NO: 383). En

determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende una secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGLS (SEQ ID NO: 384).

En determinadas modalidades, se agregan dos aminoácidos al extremo N del CKP de unión a VEGF-A de origen no natural
5 establecido en GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 386). En determinadas modalidades, los dos aminoácidos agregados al extremo N de SEQ ID NO: 102 are R/W/P/D/Q/E/S-T/K/E/F/Q/L/S. En determinadas modalidades, los dos
10 aminoácidos agregados al extremo N de SEQ ID NO: 102 se seleccionan del grupo que consiste en: RT, WK, PL, DE, QF, EQ, PT, RL y SL. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICICHWYNNSCGRT
15 (SEQ ID NO: 387). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICICHWYNNSCGWK (SEQ ID NO: 388). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de
20 aminoácidos establecida en GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICICHWYNNSCGPL (SEQ ID NO: 389). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICICHWYNNSCGDE (SEQ ID NO: 390). En determinadas modalidades, el CKP de unión
25 a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICICHWYNNSCGQF (SEQ ID NO: 391). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICICHWYNNSCGEQ
30 (SEQ ID NO: 392). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICICHWYNNSCGPT

(SEQ ID NO: 393). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICHWYNISGRL (SEQ ID NO: 394). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICHWYNISGSL (SEQ ID NO: 395).

En determinadas modalidades, se agregan tres aminoácidos al extremo N de un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente. En determinadas modalidades, se agregan dos aminoácidos al extremo N del CKP de unión a VEGF-A de origen no natural set forth in GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 102). En determinadas modalidades, los tres aminoácidos agregados al extremo N de SEQ ID NO: 102 are P/N/T/D/E/Y/W-L/Y/F/H/D/P-I/Q/V/K/S/Y/H. En determinadas modalidades, los tres aminoácidos agregados al extremo N de SEQ ID NO: 102 se seleccionan del grupo que consiste en: PLI, NYQ, PLQ, TFQ, DLV, EHK, YLS, WDY, WPH y PHQ. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGPLI (SEQ ID NO: 369). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGNYQ (SEQ ID NO: 370). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGPLQ (SEQ ID NO: 371). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGTFQ (SEQ ID NO: 372). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen

no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGDLV (SEQ ID NO: 373). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida

5 en GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGEHK (SEQ ID NO: 374). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGYLS (SEQ ID NO: 375). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen

10 no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGWDY (SEQ ID NO: 376). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF -Ade origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGWPH (SEQ ID NO: 377). En

15 determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos establecida en GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGPHQ (SEQ ID NO: 378).

En determinadas modalidades el extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está

20 modificado (por ejemplo, tiene los extremos protegidos). En determinadas modalidades extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está modificado (por ejemplo, tiene los extremos protegidos). En determinadas modalidades tanto el extremo C como el extremo N

25 del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A están modificados (por ejemplo, tienen los extremos protegidos). En determinadas modalidades, el grupo carboxilo del extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está amidado. En

30 determinadas modalidades, el grupo amina del extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está acetilado. En determinadas modalidades, el

grupo carboxilo del extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está amidado y el grupo amina del extremo N del péptido de nudo de citstina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está acetilado.

- 5 En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural es una variante del CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente. En determinadas modalidades, dicha variante comprende al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al
10 menos 8, al menos 9 o al menos 10 sustituciones de aminoácido en una o más de las secuencias indicadas en las SEQ ID NOs: 8-14, 28-39, 60-69, 127-129, 141, 225-230, 245-261, 287-291, 396-403 y 414; SEQ ID NOs: 93-97, 117-120, 211, 298-309 y 322-339; las secuencia de aminoácidos LAG, LQQ, VER, MSD, MNQ, MQT, VYQ,
15 FIN, VSQ, VTE, FYE, MEQ y VYR, FVR y LSN; y/o 15-18, 41-46, 71-79, 131-133, 233-238, 262-264 y 292. En determinadas modalidades, la o las sustituciones de aminoácido es/son sustituciones de aminoácido conservadoras. En determinadas modalidades, las sustituciones de aminoácido no reducen
20 sustancialmente la capacidad del CKP de unión de VEGF-A de origen no natural para unirse a VEGF-A humano. Por ejemplo, se pueden hacer alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras que se proporcionan en la presente) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión por VEGF-
25 A. La afinidad de unión de una variante de un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural se puede evaluar utilizando un método descrito en los Ejemplos más adelante.

Las sustituciones conservadoras se muestran en la **Tabla 17** a continuación con el título «sustituciones conservadoras». Se
30 proporcionan cambios más sustanciales en la **Tabla 17** con el título «ejemplos de sustituciones» y tal como se describe más adelante con respecto a las clases de cadenas laterales de

aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en una variante de un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural y analizar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, mantenimiento/mejora de unión a VEGF-A.

5

Tabla 17: Sustituciones conservadoras

10

Residuo original	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys

15

20

25

30

Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu

5

10

15

Las sustituciones no conservadoras implicarán intercambiar un
20 miembro de una de estas clases por otra clase.
Un ejemplo de variante sustitutiva es un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural madurado por afinidad, el cual puede generarse de manera conveniente, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de maduración por afinidad basadas en la
25 visualización en fagos tales como aquellas que se describen en la presente. Brevemente, se altera uno o más residuos en L1, L2, L3, L4 y/o L5 (es decir, se agrega, suprime o sustituye) y la variante CKP de unión a VEGF-A se visualiza en fagos y se analiza para determinar la afinidad de unión por VEGF-A. En
30 determinadas modalidades de la maduración por afinidad, la diversidad se introduce en los genes variables elegidos para su maduración mediante cualquiera de diversos métodos (por

ejemplo, PCR susceptible a errores, transposición de bucle o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Posteriormente, se crea una biblioteca secundaria. Luego la biblioteca se analiza para identificar cualesquiera variantes de CKP de origen no natural con la afinidad por VEGF-A deseada. En determinadas modalidades, la introducción de la diversidad implica abordajes dirigidos a los bucles, en los que se aleatorizan diversos residuos en L1, L2, L3, L4 y/o L5 (por ejemplo, aproximadamente 5, aproximadamente 4-6 o aproximadamente 6-10 residuos a la vez). Los residuos L1, L2, L3, L4 y/o L5 implicados en la unión a un ligando objetivo pueden identificarse, por ejemplo, mediante la utilización de mutagénesis por barrido de alanina o modelado.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCQSFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 215).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 216).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAKCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 542).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 363).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 364).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECMNQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 222).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen

no natural comprende la secuencia de aminoácidos
GCNIMLPYWGCGRDFECFYECICQYYQSCG (SEQ ID NO: 223).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
no natural comprende la secuencia de aminoácidos

5 GCNIMLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 142).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
no natural comprende la secuencia de aminoácidos
GCNILLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 405).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
10 no natural comprende la secuencia de aminoácidos
GCNILLPYWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 406).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
no natural comprende la secuencia de aminoácidos
GCNIMSPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 407).

15 En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
no natural comprende la secuencia de aminoácidos
GCNIMTPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 408).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
no natural comprende la secuencia de aminoácidos
20 GCNIMQPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 409).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
no natural comprende la secuencia de aminoácidos
GCNIMNPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 410).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
25 no natural comprende la secuencia de aminoácidos
GCNIMEPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 411).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
no natural comprende la secuencia de aminoácidos
GCNIMDPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 412).

30 En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
no natural comprende la secuencia de aminoácidos
GCNIMLPSWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 415).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCGRDFECLSGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 421).

5 En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCGRDFECLTGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 422).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCGRDFECLEGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 423).

10 En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCLCQYYQSCG (SEQ ID NO: 424).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos
15 GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 425).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCS (SEQ ID NO: 431).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
20 no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNILLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 435).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 386).

25 En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNILLPFWGCGRDFECVSQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 547).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos
30 GCNILQPFWGCGRDFECVSQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 548).

En determinadas modalidades, uno o más aminoácidos en la secuencia de un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural

proporcionado en la presente se sustituyen con aminoácidos no naturales. En determinadas modalidades, uno o más aminoácidos se sustituyen con el mismo aminoácido no natural. En determinadas modalidades, uno o más aminoácidos se sustituyen con un aminoácido no natural diferente. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un aminoácido no natural en cualquier posición de aminoácido en L1, L2, L3, L4 y/o L5, con respecto a la estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 216), donde la glicina del extremo N está protegida con C(=O)-oxetano-3ilo.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAXCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 568, donde X es ornitina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos XCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 361), donde X es N-acetilglicina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPXWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 362), donde X es sulfotirosina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPXWGCGRDFECLAGCVCQIIQSCG (SEQ ID NO: 362), donde X es 3,4-difluoro-L-fenilalanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural

comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPXWGCGRDFECLAGCVCQIIQSCG (SEQ ID NO: 362), donde X es 3,4-dicloro-L-fenilalanina. En determinadas modalidades, el

CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPXWGCGRDFECLAGCVCQIIQSCG (SEQ ID NO: 362), donde X es 4-cloro-L-fenilalanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural

5 comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPXWGCGRDFECLAGCVCQIIQSCG (SEQ ID NO: 362), donde X es 3-F,4-Cl-L-fenilalanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPXWGCGRDFECLAGCVCQIIQSCG (SEQ ID NO: 362),

10 donde X es 2-piridona (NH para)-L-alanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPXWGCGRDFECLAGCVCQIIQSCG (SEQ ID NO: 362), donde X es piridona (NH meta)-L-alanina.

15 En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIXLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 218), donde X es norleucina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen

20 no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFXGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 219), donde X es 1-naftilalanina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos

25 GCNIMLPFXGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 219), donde X es 2-naftilalanina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos

30 XCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 221), donde X es PEG₆-propargilglicina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos

GCNIXLPYWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 365), donde X es norleucina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos
 5 GCNIXLPFWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 144), donde X es norleucina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos
 10 GCNIXLPFWGCGRDFECVSQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 145), donde X es norleucina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos
 GCNIX₁LPFWGCGRDF-D/E-CVS-N/K/X₂-CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 540) donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas
 15 modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos
 GCNIXLPFWGCGRDFECVSKCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 545) donde X es norleucina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a
 VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de
 20 aminoácidos GCNIX₁LPFWGCGRDFECVSX₂CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 546) donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas
 modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIX₁LPFWGCGRDF-N/K/X₂-
 CVS-D/E-CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 541, donde X₁ es norleucina y
 25 X₂ es ornitina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos
 GCNIXLPFWGCGRDFKCVS-D/E-CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 561), donde X es norleucina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a
 30 VEGF A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos CNIXLPFWGCGRDFKCVSDCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 562),
 donde X es norleucina. En determinadas modalidades, el CKP de

unión a VEGF A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos sequence CNIXLPFWGCGRDFKCVSEICQYYQSCG (SEQ ID NO: 563), donde X es norleucina. En determinadas modalidades, el

5 secuencia de aminoácidos GCNIX₁LPFWGCGRDFX₂CVS-D/E-CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 564), donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIX₁LPFWGCGRDFX₂CVSDCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 565), donde X₁ es
10 norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIX₁LPFWGCGRDFX₂CVSEICQYYQSCG (SEQ ID NO: 566), donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF A de origen
15 no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIXLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 146), donde X es norleucina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos
20 GCNIX₁LPYWGCGRDF-D/E-CME-N/K/X₂-CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 538) donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIXLPYWGCGRDFECMEKCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 543) donde X es
25 norleucina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIX₁LPYWGCGRDFECMEX₂CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 544) donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
30 no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIX₁LPYWGCGRDF-N/K/X₂-CME-D/E-CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 539) donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIXLPYWGCGRDFKCME-D/E-CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 555) donde X es norleucina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIXLPYWGCGRDFKCMEDCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 556) donde X es norleucina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos sequence GCNIXLPYWGCGRDFKCMEECICQYYQSCG (SEQ ID NO: 557) donde X es norleucina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIX₁LPYWGCGRDFX₂CME-D/E-CICQYYQSCG (SEQ ID NO: 558) donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIX₁LPYWGCGRDFX₂CMEDCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 559) donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIX₁LPYWGCGRDFX₂CMEECICQYYQSCG (SEQ ID NO: 560) donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCDVX₁QPYWGCGPDI-D/E-CLS-N/K/X₂-CICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 534), donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCDVXQPYWGCGPDIDCLSKCICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 536), donde X es norleucina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCDVX₁QPYWGCGPDIDCLSX₂CICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 537) donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural

comprende la secuencia de aminoácidos GCDVX₁QPYWGCGPDI-N/K/X₂-CLS-D/E-CICHWYN-SCG (SEQ ID NO: 535), donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de

5 aminoácidos GCDVXQPYWGCGPDIDCLSN-CICHWYN-SCG (SEQ ID NO: 224), donde X es norleucina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCDVXQPYWGCGPDIKCLS-D/E-CICHWYN-SCG (SEQ ID NO: 549), donde X es norleucina. En determinadas modalidades, el

10 CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCDVXQPYWGCGPDIKCLSDCICHWYN-SCG (SEQ ID NO: 550), donde X es norleucina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos

15 GCDVXQPYWGCGPDIKCLSECICHWYN-SCG (SEQ ID NO: 551), donde X es norleucina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCDVX₁QPYWGCGPDIX₂CLS-D/E-CICHWYN-SCG (SEQ ID NO: 552), donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas

20 modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCDVX₁QPYWGCGPDIX₂CLSDCICHWYN-SCG (SEQ ID NO: 553), donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la

25 secuencia de aminoácidos GCDVX₁QPYWGCGPDIX₂CLSECICHWYN-SCG (SEQ ID NO: 554) donde X₁ es norleucina y X₂ es ornitina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLXFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 413), donde X es

30 gamma-bencil-L-prolina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLXFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 413),

donde X es gamma-(4-fluoro-bencil)-L-prolina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLXFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID N0: 413), donde X es 4-OH-L-prolina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLXFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID N0: 413), donde X es 4-fluoro-L-prolina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLXFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID N0: 413), donde X es 4-[4-(trifluorometil)bencil]-L-prolina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYXGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID N0: 417), donde X es N-metil indol. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYXGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID N0: 417), donde X es N-etil indol. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYXGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID N0: 417), donde X es N-isopropil indol. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYXGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID N0: 417), donde X es 5-aza-indol.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWCGRDXECLAGCVCQYYQSCG (SED ID N0: 419), donde X es 4-metil-L-fenilalanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWCGRDXECLAGCVCQYYQSCG (SED ID N0: 419), donde X es 2-naftil-L-alanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF de origen no natural comprende la secuencia

de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG (SED ID NO: 419), donde X es 2-quinolil-Alanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos G

5 GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG (SED ID NO: 419), donde X es 4,4'-bifenil-L-alanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG (SED ID NO: 419), donde X es 3-(3-quinolinil)-L-alanina. En determinadas

10 modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG (SED ID NO: 419), donde X es 3-(2-quinolinil)-L-alanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia

15 de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG (SED ID NO: 419), donde X es 3-(2-quinoxalinil)-L-alanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG (SED ID NO: 419), donde X es 4-

20 metil-2-piridil-alanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG (SED ID NO: 419), donde X es 4-etil-2-piridil-L-alanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural

25 comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG (SED ID NO: 419), donde X es benzotiazol-L-alanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG (SED ID NO: 419),

30 donde X es benzotiofeno-L-alanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos

GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 419), donde X es 3-(3-isoquinolinil)-L-alanina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos

5 GCNIMLPYWGCGRDFECXAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 420), donde X es t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentilglicina). En

determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos

10 GCNIMLPYWGCGRDFECXAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 420), donde X es 3-ciclobutil-L-alanina. En determinadas modalidades, el CKP de

unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECXAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 420),

donde X es 3-ciclopentil-L-alanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural

15 comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECXAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 420), donde X es

5,5,5-Trifluoro-L-leucina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos

20 GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCXCQYYQSCG (SEQ ID NO: 426), donde X es L-tert-Leucina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a

VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCXCQYYQSCG (SEQ ID NO: 426),

donde X es t-butil-L-alanina (también conocida como L-

25 Nepentilglicina). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de

aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCXCQYYQSCG (SEQ ID NO: 426), donde X es L-ciclopentilglicina. En determinadas modalidades,

30 la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCXCQYYQSCG (SEQ ID NO: 426), donde X es 3-ciclopentil-L-alanina. En

determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen

no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCXCQYYQSCG (SEQ ID NO: 426), donde X es L-ciclobutil-L-glicina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCXCQYYQSCG (SEQ ID NO: 426),
5 donde X es 3-ciclobutil-L-alanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCXCQYYQSCG (SEQ ID NO: 426), donde X es
10 5,5,5-Trifluoro-L-leucina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQXYQSCG (SEQ ID NO: 428), donde X es 2-piridone. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A
15 de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQXYQSCG (SEQ ID NO: 428), donde X es 3,4-hydroxy-L-fenilalanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQXYQSCG (SEQ
20 ID NO: 428), donde X es 3,4-fluoro fenilalanina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQXYQSCG (SEQ ID NO: 428), donde X es 3-fluoro, 4-OH-L-fenilalanina.

25 En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYXQSCG (SEQ ID NO: 430), donde X es 2-Chloro-L-Tirosina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de
30 aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYXQSCG (SEQ ID NO: 430), donde X es 2-metil-L- tirosina. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la

secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYXQSCG (SEQ ID NO: 430), donde X es 2-etil-L-tirosina, o 4-(naftalen-1-ol)-L-alanina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCX (SEQ ID NO: 432), donde X es D-serina, L-beta-homoserina, L-beta-alanina, N-alfa-metilglicina, glicina con su extremo carboxi convertido en un éster de glicerol, glicina con su extremo carboxi convertido en un éster de glicol, glicina con su extremo carboxi convertido en un éster de alcohol oxetanílico o glicina morfolina amida.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIXQPYWGGRDFECMEQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 436), donde X es norleucina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIX₁LPYWGCGRDFECX₂EQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 437). En determinadas modalidades, X₁ y X₂ son el mismo aminoácido no natural. En determinadas modalidades, X₁ y X₂ son aminoácidos no naturales diferentes. En determinadas modalidades, X₁ y X₂ son norleucina. En determinadas modalidades, X₁ es norleucina y X₂ es 3-ciclobutil-L-alanina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIXLPYWGCGRDFECLEQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 438), donde X es norleucina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIX₁LPYWGCGRDFECX₂EQCX₃CQYYQSCG (SEQ ID NO: 439). En determinadas modalidades, X₁, X₂ y/o X₃ son el mismo aminoácido

no natural. En determinadas modalidades, X_1 , X_2 y/o X_3 no son el mismo aminoácido no natural. En determinadas modalidades, X_1 es norleucina, X_2 es 3-ciclobutil-L-alanina, y X_3 es ciclobutil-L-glicina. En determinadas modalidades, X_1 es
 5 norleucina, X_2 es 3-ciclobutil-L-alanina, y X_3 es 3-ciclobutil-L-alanina. En determinadas modalidades, X_1 es norleucina, X_2 es 3-ciclobutil-L-alanina, y X_3 es norleucina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos
 10 CNIX₁QPYWGCGRDFECX₂EQCX₃CQYYQSCG (SEQ ID NO: 440). En determinadas modalidades, X_1 , X_2 y/o X_3 son el mismo aminoácido no natural. En determinadas modalidades, X_1 , X_2 y/o X_3 no son el mismo aminoácido no natural. En determinadas modalidades, X_1 es norleucina, X_2 es 3-ciclobutil-L-alanina y X_3 es
 15 ciclobutil-L-glicina. En determinadas modalidades, X_1 es norleucina, X_2 es 3-ciclobutil-L-alanina y X_3 es 3-ciclobutil-L-alanina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos
 20 GCNILLPYWGCGRDFECXEQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 441), donde X es 3-ciclobutil-L-alanina o t-butil-L-alanina (también conocida como L-Nepentilglicina).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos
 25 GCNILLPYWGCGRDFECMEQCXCQYYQSCG (SEQ ID NO: 442), donde X es ciclobutil-L-glicina o 3-ciclobutil-L-alanina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos
 30 X_1 CNIX₂LPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCX₃ (SEQ ID NO: 443). En determinadas modalidades, X_1 , X_2 y/o X_3 son el mismo aminoácido no natural. En determinadas modalidades, X_1 , X_2 y/o X_3 no son el mismo aminoácido no natural. En determinadas modalidades,

X_1 es N-acetilglicina, X_2 es norleucina y X_3 es glicina amida.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos X_1 CNILLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSC X_2 (SEQ ID NO: 444). En

5 determinadas modalidades, X_1 y X_2 son el mismo aminoácido no natural. En determinadas modalidades, X_1 y X_2 son aminoácidos no naturales diferentes. En determinadas modalidades, X_1 es N-acetilglicina y X_2 es glicina amida.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
10 no natural comprende la secuencia de aminoácidos X_1 CNILQPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSC X_2 (SEQ ID NO: 445). En determinadas modalidades, X_1 y X_2 son el mismo aminoácido no natural. En determinadas modalidades, X_1 y X_2 son aminoácidos no naturales diferentes. En determinadas modalidades, X_1 es N-
15 acetilglicina y X_2 es glicina amida.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos X_1 CNILQPYWGCGRDFECLEQCICQYYQSC X_2 (SEQ ID NO: 446). En determinadas modalidades, X_1 y X_2 son el mismo aminoácido no
20 natural. En determinadas modalidades, X_1 y X_2 son aminoácidos no naturales diferentes. En determinadas modalidades, X_1 es N-acetilglicina y X_2 es glicina amida.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos
25 GCDVLQPYWGCGPDIDCXSNICHWYNNSCG (SEQ ID NO: 447), donde X es 3-ciclobutil-L-alanina o t-butil-L-alanina (L-Nepentilglicina). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCXCHWYNNSCG (SEQ ID NO: 448), donde X es
30 ciclobutil-L-glicina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos

GCDVX₁QPYWGCGPDIDCX₂SNC2X₃CHWYNSCG (SEQ ID NO: 449). En determinadas modalidades, X₁, X₂ y/o X₃ son el mismo aminoácido no natural. En determinadas modalidades, X₁, X₂ y/o X₃ no son el mismo aminoácido no natural. En determinadas modalidades, 5 X₁ es norleucina, X₂ es 3-ciclobutil-L-alanina y X₃ es ciclobutil-L-glicina. En determinadas modalidades, X₁ es norleucina, X₂ es 3-ciclobutil-L-alanina y X₃ es 3-ciclobutil-L-alanina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen 10 no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCDVLQPYWGCGPDIDCX₁SNC2X₂CHWYNSCG (SEQ ID NO: 450). En determinadas modalidades, X₁ y X₂ son el mismo aminoácido no natural. En determinadas modalidades, X₁ y X₂ son aminoácidos no naturales diferentes. En determinadas modalidades, X₁ es 3- 15 ciclobutil-L-alanina y X₂ es ciclobutil-L-glicina. En determinadas modalidades, X₁ es 3-ciclobutil-L-alanina y X₂ es 3-ciclobutil-L-alanina.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos 20 X₁CDVLQPYWGCGPDIDCX₂SNC2X₃CHWYNSCX₄ (SEQ ID NO: 451). En determinadas modalidades, X₁, X₂, X₃ y/o X₄ son el mismo aminoácido no natural. En determinadas modalidades, X₁, X₂, X₃ y/o X₄ no son el mismo aminoácido no natural. En determinadas modalidades, X₁ es N-acetilglicina, X₂ es 3-ciclobutil-L- 25 alanina, X₃ es ciclobutil-L-glicina y X₄ es glicina amida. En determinadas modalidades, X₁ es acetilglicina, X₂ es ciclobutil-L-alanina, X₃ es ciclobutil-L-alanina y X₄ es glicina amida.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos 30 X₁CDVX₂QPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCX₃ (SEQ ID NO: 452). En determinadas modalidades, X₁, X₂ y/o X₃ son el mismo aminoácido no natural. En determinadas modalidades, X₁, X₂ y/o X₃ no son

el mismo aminoácido no natural. En determinadas modalidades, X_1 es N-acetilglicina, X_2 es norleucina y X_3 es glicina amida

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos

5 X_1 CDVLQPYWGCGPDIDCLSNICHWYNSCX $_2$ (SEQ ID NO: 453). En determinadas modalidades, X_1 y X_2 son el mismo aminoácido no natural. En determinadas modalidades, X_1 y X_2 son aminoácidos no naturales diferentes. En determinadas modalidades, X_1 es N-acetilglicina y X_2 es glicina amida

10 En determinadas modalidades, el extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está modificado (por ejemplo, tiene los extremos protegidos). En determinadas modalidades, el extremo N del péptido de nudo de

15 modificado (por ejemplo, tiene los extremos protegidos). En determinadas modalidades, tanto el extremo C como el extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A están modificados (por ejemplo, tienen los extremos protegidos). En determinadas modalidades, el grupo

20 carboxilo del extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está amidado. En determinadas modalidades, el grupo amina del extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está acetilado. En determinadas modalidades, el

25 grupo carboxilo del extremo C del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está amidado y el grupo amina del extremo N del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a VEGF-A está acetilado.

30 Características estructurales

En determinadas modalidades, la estructura de un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente

tiene una conectividad de enlace disulfuro que es diferente con respecto a la de la proteína EETI-II natural, es decir, diferente de la característica de patrón de enlace disulfuro C1-C4, C2-C5 y C3-C6 de EETI-II natural. En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente tiene una conectividad de enlace disulfuro C1-C4, C2-C3 y C5-C6. Los métodos para determinar la conectividad de enlace disulfuro de, por ejemplo, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural, incluyen, por ejemplo, resolver y analizar la estructura de cocrystal de un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural en complejo con VEGF-A, a través de espectrometría de masas y posteriormente alquilación reductora parcial o a través de espectrometría de masas y posteriormente digestión proteolítica, y hacer los cálculos estructurales tal como se describe en Sampoli et al. (2000) *Proteins Struct Funct Gen.* 40, 168-174, etc.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural tiene un contenido de hélice alfa de al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45% o al menos aproximadamente 50%, incluido cualquier rango entre estos valores. En determinadas modalidades, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 aminoácidos del CKP de unión a VEGF-A de origen no natural forman la hélice alfa. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural tiene una conectividad de enlace disulfuro de C1-C4, C2-C3 y C5-C6 y un contenido de hélice alfa de al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al

menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45% o al menos aproximadamente 50%, incluido cualquier rango entre estos valores. En determinadas

5 modalidades, el contenido de hélice alfa de un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural, se determina mediante, por ejemplo, dicroísmo circular (CD, por sus siglas en inglés), dispersión óptica rotatoria (ORD, por sus siglas en inglés), resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés),

10 al resolver y analizar la estructura de cocrystal de un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural en complejo con VEGF-A, a través de espectrometría de masas y posteriormente alquilación reductora parcial o a través de espectrometría de masas y posteriormente digestión proteolítica.

15 En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente compite por la unión a VEGF-A con un segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural, donde el segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de

20 aminoácidos NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos QYYQS (SEQ ID NO: 45) en referencia a la estructura

25 de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente compite por la unión a VEGF-A con un segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural, donde el segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de

30 aminoácidos GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 52). En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se une al mismo epítipo

en VEGF-A al que se une un segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural, donde el segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos QYYQS (SEQ ID NO: 45) en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se une al mismo epítipo en VEGF-A al que se une un segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural, donde el segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 52).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente compite por la unión a VEGF-A con un segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural, donde el segundo CKP de unión a VEGF-A comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GRDFE (SEQ ID NO: 97); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos QYYQS (SEQ ID NO: 45) en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente compite por la unión a VEGF-A con un segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural, donde el segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 102).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se une al mismo epítipo en VEGF-A al que se une un segundo CKP de unión a VEGF-A de

origen no natural, donde el segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GRDFE (SEQ ID NO: 97); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos QYYQS (SEQ ID NO: 45) en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se une al mismo epítipo en VEGF-A al que se une un segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural, donde el segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 102). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente compite por la unión a VEGF-A con un segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural, donde el segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos NIMLPFWG (SEQ ID NO: 35); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos HWYNS (SEQ ID NO: 46) en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente compite por la unión a VEGF-A con un segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural, donde el segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCDVMQPYWGCKQDSDCLAGCVCHWYNNSCG (SEQ ID NO: 55). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se une al mismo epítipo en VEGF-A al que se une un segundo CKP de unión a VEGF-A de

origen no natural, donde el segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos HWYNS (SEQ ID NO: 46) en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se une al mismo epítipo en VEGF-A al que se une un segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural, donde el segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCDVMQPYWGCKQDSDCLAGCVCHWYNNSCG (SEQ ID NO: 55). En determinadas modalidades, la proteína CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionada en la presente compite por la unión a VEGF-A con un segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural, donde el segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GPDID (SEQ ID NO: 118); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos HWYNS (SEQ ID NO: 46) en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente compite por la unión a VEGF-A con un segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural, donde el segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCDVMQPYWGCGPDIDCLAGCVCHWYNNSCG (SEQ ID NO: 123). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se une al mismo epítipo en VEGF-A al que se une un segundo CKP de unión a VEGF-A de

origen no natural, donde el segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GPDID (SEQ ID NO: 118); un L3 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos HWYNS (SEQ ID NO: 46) en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se
10 une al mismo epítipo en VEGF-A al que se une un segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural, donde el segundo CKP de unión a VEGF-A de origen no natural comprende la secuencia de aminoácidos GCDVMQPYWGCGPDIDCLAGCVCHWYNISCG (SEQ ID NO: 123). En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen
15 no natural proporcionado en la presente se une a un epítipo de VEGF-A que comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez o más de diez aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en V14, V15,
20 F17, D19, Y21, Q22, Y25, I46, K48, N62, D63, L66, M81, I83, K84, P85, H86, Q87, G88, Q89, I91, C104, R105 y P106. En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se une a un epítipo de VEGF-A que comprende K48, N62 y D63. En determinadas modalidades, un CKP
25 de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se une a un epítipo de VEGF-A que comprende H86. En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se une a un epítipo de VEGF-A que comprende Y21, Y25 y P106. En determinadas
30 modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se une a un epítipo de VEGF-A que comprende M81, D19 y Q22. En determinadas modalidades, un CKP

de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se une a un epítipo de VEGF-A que comprende F17, M81 y I91. En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se une a un epítipo de VEGF-A que comprende V14, F17, D19, Q22, M81 y I91. En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se une a un epítipo de VEGF-A que comprende Q22 e Y25.

En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se une a un epítipo de VEGF-A que se superpone con el epítipo de VEGF-A al que se une el anticuerpo anti-VEGF-A G6.31 (Fuh et al. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 6625-6631). En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se une a un epítipo de VEGF-A que se superpone con el epítipo de VEGF-A al que se une Flt-1. En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente se une a un epítipo de VEGF-A que se superpone con el epítipo de VEGF-A al que se une bevacizumab.

Características funcionales

En determinadas modalidades, un CKP de origen no natural que se «une específicamente» a VEGF-A (tal como un VEGF-A humano, un VEGF-A de ratón y/o un VEGF-A de rata) tiene un de valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} y más preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{-9} M) pero tiene una afinidad de unión por un homólogo de VEGF-A u otro factor de crecimiento que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces más débil que su afinidad de unión por VEGF-A.

En determinadas modalidades, la medida de la unión de un CKP

de unión a VEGF-A de origen no natural proporcionado en la presente a, por ejemplo, una proteína no objetivo (por ejemplo, un homólogo de VEGFA tal como VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D) u otros factores de crecimiento (tales como P1GF, EGF, NGF, IGF y PDGF) es menor que aproximadamente 10% de la unión del CKP de unión a VEGF-A de origen no natural a VEGF-A tal como se determina mediante métodos conocidos en la técnica, tales como ELISA, análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula comparada con la unión de una molécula testigo, que generalmente es un molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse mediante competencia con una molécula testigo que es similar a la objetivo, por ejemplo, un exceso de objetivo no etiquetado. En este caso, la unión específica se indica si la unión del objetivo etiquetado a una sonda se inhibe de forma competitiva mediante un exceso del objetivo sin etiquetar. Otros métodos para evaluar la unión de un CKP de origen no natural que se «une específicamente» a VEGF-A se describen en los Ejemplos.

La expresión «unión específica» o «se une específicamente» o es «específico para» un polipéptido o un epítipo específico en un objetivo polipeptídico específico tal como se usa en la presente la puede exhibir, por ejemplo, una molécula que tiene una Kd para el objetivo de al menos aproximadamente 10^{-4} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-5} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-6} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-7} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-8} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-10} M,

alternativamente al menos aproximadamente 10^{-11} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-12} M o mayor. En una modalidad, la expresión «unión específica» hace referencia a la unión donde una molécula se une a un polipéptido o epítopo específico en un polipéptido específico sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítopo de polipéptido.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural se une a VEGF-A con una K_d entre aproximadamente 1 pM a aproximadamente 500 nM. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural se une a VEGF-A con una K_d entre aproximadamente 1 pM a aproximadamente 50 pM, entre aproximadamente 50 pM a aproximadamente 250 pM, entre aproximadamente 250 pM a aproximadamente 500 pM, entre aproximadamente 500 pM a 750 pM, entre aproximadamente 750 pM a aproximadamente 1 nM, entre aproximadamente 1 nM a aproximadamente 25 nM, entre aproximadamente 25 nM a aproximadamente 50 nM, entre 50 nM a aproximadamente 100 nM, entre aproximadamente 100 nM a aproximadamente 250 nM, o entre aproximadamente 250 nM a aproximadamente 500 nM.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural se une a VEGF-A humano, un VEGF-A de ratón y/o un VEGF-A de rata. En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural que se une a VEGF-A humano, un VEGF de ratón y un VEGF de rata comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos QYYQS (SEQ ID NO: 45) en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural que se une a VEGF-A

humano, un VEGF-A de ratón y un VEGF-A de rata comprende la secuencia de aminoácidos GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 52).

En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen
 5 no natural que se une a VEGF-A humano, un VEGF-A de ratón y un VEGF-A de rata comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GRDFE (SEQ ID NO: 97); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende
 10 el aminoácido V y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos QYYQS (SEQ ID NO: 45) en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural que se une a VEGF-A humano, un VEGF de ratón y un VEGF de rata comprende la secuencia de aminoácidos
 15 GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO: 102).

En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural que se une a VEGF-A humano, un VEGF-A de ratón y un VEGF-A de rata comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35); un L2 que comprende la
 20 secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos HWYNS (SEQ ID NO: 46) en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a
 25 VEGF-A de origen no natural que se une a VEGF-A humano, un VEGF-A de ratón y un VEGF-A de rata comprende la secuencia de aminoácidos GCDVMQPYWGCKQDSDCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO: 55).

En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural que se une a VEGF-A humano, un VEGF-A de ratón y un
 30 VEGF-A de rata comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos GPDID (SEQ ID NO: 118); un L3 que

comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos HWYNS (SEQ ID NO: 46) en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural que se une a VEGF-A humano, un VEGF-A de ratón y un VEGF-A de rata comprende la secuencia de aminoácidos GCDVMQPYWGCGPDIDCLAGCVCHWYNISCG (SEQ ID NO: 123).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente tiene un valor de CI_{50} de menos de aproximadamente 0.5 nM, menos de aproximadamente 0.6 nM, menos de aproximadamente 0.7 nM, menos de aproximadamente 0.8 nM, menos de aproximadamente 0.9 nM o menos de aproximadamente 1.0nM, incluido cualquier rango entre estos valores.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural no inhibe la actividad de la tripsina proteasa tal como se mide en un ensayo de escisión por sustrato peptídico (por ejemplo, el ensayo de escisión por sustrato peptídico descrito en los Ejemplos).

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural es resistente a la digestión por tripsina. En determinadas modalidades, aproximadamente 30% o menos, aproximadamente 25% o menos, o aproximadamente 20% o menos del CKP de unión a VEGF-A de origen no natural se escinde en Arg13 dentro del bucle 2 luego de 24 h de incubación con tripsina a 37 °C.

También se contemplan moléculas de ácido nucleico que codifican para el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente, vectores de expresión que comprenden las moléculas de ácido nucleico que codifican para el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural y células que comprenden las moléculas de ácido nucleico. Además se proporcionan en la presente métodos

para producir un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente cultivando dichas células, expresando el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural y recuperando el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural del cultivo celular.

- 5 En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural se produce a través de traducción *in vitro*, tal como se describe en otra parte en la presente.

En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural se genera a través de síntesis de péptido química,
 10 por ejemplo, insertando los péptidos sintetizados químicamente L1, L2, L3, L4 y/o L5 en un marco de armazón (tal como la estructura de armazón I), o sintetizando químicamente el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural entero.

- 15 Péptidos de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se unen a la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL) 6 (LRP6) humana

Los receptores de LDL son proteínas de superficie celular transmembranarias que participan en la endocitosis d
 20 lipoproteína y ligandos proteicos mediada por receptor. La proteína relacionada con el receptor LDL 6 (LRP6) humana (Nos. de acceso: NM_002336 (ARNm) y NP_002327 (proteína); UniProtKB: 075581) funciona como un receptor o, con Frizzled, como correceptor para Wnt y transmite así la cascada de señalización
 25 canónica Wnt/beta-catenina (Kato et al. (2007) *Clin Cancer Res* 13:4042-4045). A través de su interacción con la cascada de señalización de Wnt/beta-catenina, LRP6 participa en la regulación de la diferenciación, proliferación y migración celular, y en el desarrollo de muchos tipos de cánceres (Li et
 30 al. (2004) *Oncogene* 23:9129-9135; Tung et al. (2012) *PLoS ONE* 7(5): e36565. doi:10.1371/journal.pone.0036565; Liu et al. (2010) *Proc Natl Acad Sci USA* 107:5136-5141).

La señalización de Wnt participa en muchas vías biológicas. Con respecto a enfermedades, participa en el cáncer y enfermedades metastásicas, osteoporosis y otros problemas metabólicos y enfermedades óseas, enfermedad neuronal y neurodegenerativa, artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias. Esta inhibición de la señalización de Wnt mediante el bloqueo de LRP6 puede tener una amplia gama de utilidades terapéuticas. La pérdida de masa ósea es un problema médico grave, no solo durante la osteoporosis posmenopáusica, sino también en la artritis reumatoide. Los huesos se degradan en el mieloma múltiple y en metástasis óseas. Por lo tanto, las estrategias terapéuticas para fortalecer los huesos, prevenir fracturas y restaurar el daño óseo son de gran interés (Kawai *et al.* (2011) *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 141-156; Mason and Williams (2010) *J. Osteoporosis*, tomo 2010, Artículo ID 460120, 9 páginas; doi:10.4061/2010/460120). Los inhibidores de la vía de Wnt DKK1 y SOST, debido a sus papeles en la supresión de la formación de nuevos huesos, se consideran que son objetivos terapéuticos muy prometedores; los anticuerpos que neutralizan la función de SOST muestran una actividad preclínica significativa (Ominsky *et al.* (2010) *J. Bone Miner. Res.* 25, 948-959) y se están sometiendo ahora a ensayos clínicos con humanos (Padhi *et al.* (2011) *J. Bone Miner. Res.* 26, 19-26).

La señalización de Wnt poco regulada participa en enfermedades que van desde la osteoporosis al cáncer (Clevers (2006) *Cell* 127: 469-80; MacDonald *et al.* 2009. *Dev Cell* 17: 9-26; Nusse (2008) *Cell Res* 18: 523-7; Polakis (2007) *Curr Opin Genet Dev* 17: 45-51). Esta lista se ha expandido para incluir trastornos metabólicos (Mani *et al.* (2007) *Science* 315: 1278-82 y neurodegeneración (Caricasole *et al.* (2004) *J Neurosci* 24: 6021-7; De Ferrari *et al.* (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104:

9434-9). Existe una relación especialmente clara entre las mutaciones de la proteína de la poliposis cólica adenomatosa (APC, por sus siglas en inglés), que evitan la regulación eficaz de los niveles de β -catenina y cánceres colorrectales (Polakis (2007) *Curr Opin Genet Dev* 17: 45-51). Además cabe señalar que fuerte relación genética entre LRP5 y la homeostasis ósea. Las mutaciones de pérdida de función en LRP5 pueden provocar el trastorno recesivo autosómico síndrome osteoporosis-seudoglioma (OPPG, por sus siglas en inglés), caracterizado por la pérdida de masa ósea, defectos oculares y predisposición a fracturas (Gong *et al.* (2001) *Cell* 107: 513-23).

En la presente se proporciona CKP de origen no natural que se une a la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 6 (LRP6) humana, donde el CKP de origen no natural comprende la siguiente estructura de armazón de cistina (es decir, la estructura de armazón I):



20

donde:

Z_1 y Z_2 son cualquier aminoácido;

L1 es el Bucle 1 y tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en: $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$, $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$, $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ y $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$, donde cada uno de $X_1 - X_{10}$ es cualquier aminoácido;

L2 es el Bucle 2 y tiene la estructura: $X_1X_2X_3X_4X_5$, donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido;

L3 es el Bucle 3 y tiene la estructura: $X_1X_2X_3$ donde cada uno de $X_1 - X_3$ es cualquier aminoácido;

L4 es el Bucle 4 y tiene la estructura: X_1 , donde X_1 es cualquier aminoácido; y

L5 es el Bucle 5 y tiene la estructura: $X_1X_2X_3X_4X_5$, donde cada uno de $X_1 - X_5$ es cualquier aminoácido.

En determinadas modalidades, Z_1 y/o Z_2 del péptido de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se une a LRP6 es G. En determinadas modalidades, Z_1 y/o Z_2 comprenden más de un aminoácido. En determinadas modalidades, Z_1 y/o Z_2 comprenden 4 aminoácidos. En determinadas modalidades, Z_1 y/o Z_2 comprenden 5 aminoácidos.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 donde X_1 es un aminoácido seleccionado de R, V, M, A, G, N, S y E; donde X_2 es un aminoácido seleccionado de T, N, S, G, R y A; donde X_3 es un aminoácido seleccionado de N, R, H, V, K, S, G, I e Y; donde X_4 es un aminoácido seleccionado de R, V, N, I, K, S y T; donde X_5 es un aminoácido seleccionado de V, R, K, I, T, S, L y N; y donde X_6 es un aminoácido seleccionado de K, G, A, I, R, N, S y V. En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 donde X_7 es un aminoácido seleccionado de G, R, K, E, P y T. En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 donde X_8 es un aminoácido seleccionado de G, R, K, Q, A y S. En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 donde X_9 es un aminoácido seleccionado de R o G. En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 donde X_{10} es un aminoácido seleccionado de E, W y G. En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L5 donde X_1 es un aminoácido seleccionado de G, S, N, Y, A y R; donde X_2 es un aminoácido seleccionado de P, G, S, V, E, R, F y D; donde X_3 es un aminoácido seleccionado de N, G, S, E, P, K, H y R; donde X_4 es un aminoácido seleccionado de G, R, H, S, Q, V y D; y donde X_5 es un aminoácido

seleccionado de F, D, N, R, G, Y, S y T. En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L2 donde X_1 es K, X_2 es Q, X_3 es D, X_4 es S y X_5 es D. En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L3 donde X_1 es L, X_2 es A y X_3 es G. En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L4 donde X_1 es V.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural inhibe competitivamente la unión de una molécula competidora a LRP6. En determinadas modalidades, la molécula competidora es un anticuerpo anti-LRP6. En determinadas modalidades, la molécula competidora es un segundo CKP de unión a LRP6 de origen no natural.

Los CKP de unión a LRP6 de origen no natural que se unen a áreas superpuestas o similares en un objetivo se pueden identificar mediante ensayos de inhibición/unión competitivos. Dichos ensayos se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, S. J. Mather (ed.) 1996. *Current Directions in Radiopharmaceutical Research and Development*, 169- 179, Kluwer Academic Publishers; Zettner (1973) *Clin. Chem.* 19, 699-705; Gao (2012) *Analytical Methods* 4, 3718-3723.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural se une al mismo epítipo de LRP6 humana al que se une un segundo CKP de unión a LRP6 de origen no natural que comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos V/R/N/S/E/G-N/S/G/R-R/V/K/S/N/I/Y-V/N/I/R/S/T-R/K/I/N-G/I/R/K/S/A (SEQ ID NO: 185) o A/R/M/V/G/S-N/T/S/A-R/N/H-V/R/K-K/V/I-R/K/A/N/S/V-T/G/R/K/P-S/G/R/A (SEQ ID NO: 186) o R/A/Q-S/A-G/S/N/I-N/K-T/S/L/R-I/R/V-R/E/K-K/Q/A/R-R/G/Q-E/W/G/R (SEQ ID NO: 187); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido

V; y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos G/S/N/Y/A/R-P/G/S/V/E/R/F/D-N/G/S/E/P/K/H/R-G/R/H/S/Q/V/D-F/D/N/R/G/Y/S/T (SEQ ID NO: 188), en referencia a la estructura de armazón I.

- 5 En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos V/R/N/S/E/G-N/S/G/R-R/V/K/S/N/I/Y-V/N/I/R/S/T-R/K/I/N-G/I/R/K/S/A (SEQ ID NO: 185) o A/R/M/V/G/S-N/T/S/A-R/N/H-V/R/K-K/V/I-R/K/A/N/S/V-T/G/R/K/P-S/G/R/A (SEQ ID NO: 186) o R/A-S-G/S/N-N/K-T/S/L-I/R-R/E-K/Q/A-R/G-E/W/G (SEQ ID NO: 187)), en referencia a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende además un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93). En determinadas modalidades,
- 15 el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende además un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG. En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende además un L4 que comprende el aminoácido V. En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende además un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos G/S/N/Y/A/R-P/G/S/V/E/R/F/D-N/G/S/E/P/K/H/R-G/R/H/S/Q/V/D-F/D/N/R/G/Y/S/T (SEQ ID NO: 188).
- 20 En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 y/o L5 de cualquiera de los CKP de unión a LRP6 de origen no natural divulgados en la presente. En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 que comprende una secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 147-168 y 367, con respecto a la estructura de armazón I. En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende además un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 93. En determinadas
- 30

modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende además un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG. En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende además un L4 que comprende el aminoácido V. En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende además un L5 que comprende una secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 19 y 169-184.

Las secuencias de aminoácidos L1 y L5 descritas anteriormente se proporcionan en la **Tabla 18** a continuación:

15

20

25

30 **Tabla 18**

RTNRVKGG (SEQ ID NO: 147)	GPNGF (SEQ ID NO: 19)
VNRVRG (SEQ ID NO: 148)	SGGRD (SEQ ID NO: 169)
MNHVKARR (SEQ ID NO: 149)	GPNGF (SEQ ID NO: 19)
RSVNKI (SEQ ID NO: 150)	GSSRN (SEQ ID NO: 170)
VNKIKG (SEQ ID NO: 151)	GVEGR (SEQ ID NO: 171)
PNSEYD (SEQ ID NO: 152)	GVNNG (SEQ ID NO: 172)

5

10

15

20

25

30

V/R/N/S/E/G-N/S/G/R- R/V/K/S/N/I/Y- V/N/I/R/S/T-R/K/I/N- G/I/R/K/S/A (SEQ ID NO: 185)	A/R/M/V/G/S-N/T/S/A-R/N/H- V/R/K-K/V/I-R/K/A/N/S/V- T/G/R/K/P-S/G/R/A (SEQ ID NO: 186)
R/A-S-G/S/N-N/K-T/S/L-	G/S/N/Y/A/R-P/G/S/V/E/R/F/D-

5

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen
10 no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de
aminoácidos RTNRVKGG (SEQ ID NO: 147); un L2 que comprende la
secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que
comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende
el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de
15 aminoácidos GPNGF (SEQ ID NO: 19), en referencia a la
estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen
no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de
aminoácidos VNRVRG (SEQ ID NO: 148); un L2 que comprende la
20 secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que
comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende
el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de
aminoácidos SGGRD (SEQ ID NO: 169), en referencia a la
estructura de armazón I.

25 En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen
no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de
aminoácidos MNHVKARR (SEQ ID NO: 149); un L2 que comprende la
secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que
comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende
30 el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de
aminoácidos GPNGF (SEQ ID NO: 19), en referencia a la
estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RSVNKI (SEQ ID NO: 150); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos GSSRN (SEQ ID NO: 170), en referencia a la estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen
10 no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos VNKIKG (SEQ ID NO: 151); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de
15 aminoácidos GVEGR (SEQ ID NO: 29), en referencia a la estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RNSIKR (SEQ ID NO: 152); un L2 que comprende la
20 secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos SVGHG (SEQ ID NO: 172), en referencia a la estructura de armazón I.

25 En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos VSNRVNKG (SEQ ID NO: 153); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende
30 el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos GPNGF (SEQ ID NO: 19), en referencia a la estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RGNIK (SEQ ID NO: 154); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos NESRG (SEQ ID NO: 173), en referencia a la estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen
10 no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RSGNTIRKRE (SEQ ID NO: 155); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de
15 aminoácidos GGPGG (SEQ ID NO: 174), en referencia a la estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ASSNSIRQGW (SEQ ID NO: 156); un L2 que comprende
20 la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos GPKSN (SEQ ID NO: 175), en referencia a la estructura de armazón I.

25 En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RSNRIR (SEQ ID NO: 157); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende
30 el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos YGHGD (SEQ ID NO: 176), en referencia a la estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RSNKLREARG (SEQ ID NO: 158); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos GSRQD (SEQ ID NO: 177), en referencia a la estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen
10 no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos VNSVKR (SEQ ID NO: 159); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de
15 aminoácidos SRGVN (SEQ ID NO: 178), en referencia a la estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos GSNKIRPR (SEQ ID NO: 160); un L2 que comprende la
20 secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos GPNDF (SEQ ID NO: 179), en referencia a la estructura de armazón I.

25 En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos NRIRNS (SEQ ID NO: 161); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende
30 el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos GRGDY (SEQ ID NO: 180), en referencia a la estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SRNSIK (SEQ ID NO: 162); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos ASGSS (SEQ ID NO: 181), en referencia a la estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen
10 no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SNYVKR (SEQ ID NO: 163); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de
15 aminoácidos SPGGR (SEQ ID NO: 182), en referencia a la estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RANRVSGR (SEQ ID NO: 164); un L2 que comprende la
20 secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos GPNGF (SEQ ID NO: 19), en referencia a la estructura de armazón I.

25 En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SNRVKVRA (SEQ ID NO: 165); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende
30 el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos GPNGF (SEQ ID NO: 19), en referencia a la estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ENRTKG (SEQ ID NO: 166); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos GFRGT (SEQ ID NO: 183), en referencia a la estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen
10 no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos GNKIRA (SEQ ID NO: 167); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de
15 aminoácidos RDRVG (SEQ ID NO: 184), en referencia a la estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ANRVKRTS (SEQ ID NO: 168); un L2 que comprende la
20 secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos GPNGF (SEQ ID NO: 19), en referencia a la estructura de armazón I.

25 En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende un L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QAINRVKRQR (SEQ ID NO: 367); un L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KQDSD (SEQ ID NO: 93); un L3 que comprende la secuencia de aminoácidos LAG; un L4 que comprende
30 el aminoácido V; y un L5 que comprende la secuencia de aminoácidos GPNGF (SEQ ID NO: 19), en referencia a la estructura de armazón I.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural comprende una secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 189-210 y 366. SEQ ID NOs: 189-210 y 366 que se proporcionan a continuación.

5

	GCRNTRVKGGCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 189)
	GCVNRVRGCKQDSDCLAGCVCSGGRDCG	(SEQ ID NO: 190)
	GCMNHVKARRCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 191)
	GCRSVNKICKQDSDCLAGCVCGSSRNCG	(SEQ ID NO: 192)
10	GCVNLIKIGCKQDSDCLAGCVCGVEGRCG	(SEQ ID NO: 193)
	GCRNSIKRCKQNSDCLAGCVCSVGHGCG	(SEQ ID NO: 194)
	GCVSNRVNKGCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 195)
	GCRGNIIKCKQDSDCLAGCVCNESRGCG	(SEQ ID NO: 196)
	GCRSGNTIRKRECKQDSDCLAGCVCGPGGCG	(SEQ ID NO: 197)
15	GCASSNSIRQGWCKQDSDCLAGCVCGPKSNCG	(SEQ ID NO: 198)
	GCRSNRIRCKQDSDCLAGCVCYGHGDCG	(SEQ ID NO: 199)
	GCRSNKLRARGCKQDSDCLAGCVCGSRQDCG	(SEQ ID NO: 200)
	GCVNSVKRCKQDSDCLAGCVCSRGVNCG	(SEQ ID NO: 201)
	GCGSNKIRPRCKQDSDCLAGCVCGPNDFCG	(SEQ ID NO: 202)
20	GCNRIRNSCKQDSDCLAGCVCGRGDYCG	(SEQ ID NO: 203)
	GCSRNSIKCKQDSDCLAGCVCASGSSCG	(SEQ ID NO: 204)
	GCSNYVKRCKQDSDCLAGCVCSPPGGRCG	(SEQ ID NO: 205)
	GCRANRVSGRCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 206)
	GCSNRVKVRACKQDSDCLAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 207)
25	GCENRTKGCKQDSDCLAGCVCGFRGTCG	(SEQ ID NO: 208)
	GCGNKIRACKQDSDCLAGCVCRDRVCGG	(SEQ ID NO: 209)
	GCANRVKRTSCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 210)
	GCQAINRVKRQRCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 366)

30 En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural es una variante del CKP de unión a LRP6 de origen no natural descrito en la presente. En determinadas

modalidades, dicha variante comprende al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 sustituciones de aminoácido en una o más de las secuencias indicadas en las SEQ ID NOs: 19, 93, 147-168, 169-184 y 189-210 y/o en la secuencia de aminoácidos LAG. En determinadas modalidades, la o las sustituciones de aminoácido es/son sustituciones de aminoácido conservadoras. En determinadas modalidades, las sustituciones de aminoácido no reducen sustancialmente la capacidad del CKP de unión de LRP6 de origen no natural para unirse a LRP6 humano. Por ejemplo, se pueden hacer alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras que se proporcionan en la presente) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión por LRP6. La afinidad de unión de una variante de un CKP de unión a LRP6 de origen no natural se puede evaluar utilizando un método descrito en los Ejemplos más adelante.

Las sustituciones conservadoras se muestran en la **Tabla 17** que figura más atrás con el título «sustituciones conservadoras». Se proporcionan cambios más sustanciales en la **Tabla 17** con el título «ejemplos de sustituciones» y tal como se describe más adelante con respecto a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en una variante de un CKP de unión a LRP6 de origen no natural y analizar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, mantenimiento/mejora de unión a LRP6.

Las sustituciones no conservadoras implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Un ejemplo de variante sustitutiva es un CKP de unión a LRP6 de origen no natural madurado por afinidad, el cual puede generarse de manera conveniente, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de maduración por afinidad basadas en la visualización en fagos tales como aquellas que se describen en la presente.

Brevemente, se altera uno o más residuos en L1, L2, L3, L4 y/o L5 (es decir, se agrega, suprime o sustituye) y la variante CKP de unión a LRP6 se visualiza en fagos y se analiza para determinar la afinidad de unión por LRP6. En determinadas modalidades de la maduración por afinidad, la diversidad se introduce en los genes variables elegidos para su maduración mediante cualquiera de diversos métodos (por ejemplo, PCR susceptible a errores, transposición de bucle o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Posteriormente, se crea una biblioteca secundaria. Luego la biblioteca se analiza para identificar cualesquiera variantes de CKP de origen no natural con la afinidad por LRP6 deseada. En determinadas modalidades, la introducción de la diversidad implica abordajes dirigidos a los bucles, en los que se aleatorizan diversos residuos en L1, L2, L3, L4 y/o L5 (por ejemplo, aproximadamente 5, aproximadamente 4-6 o aproximadamente 6-10 residuos a la vez). Los residuos L1, L2, L3, L4 y/o L5 implicados en la unión a un ligando objetivo pueden identificarse, por ejemplo, mediante la utilización de mutagénesis por barrido de alanina o modelado.

En determinadas modalidades, un CKP de origen no natural que se «une específicamente» a LRP6 (es decir, tiene un de valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} y más preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{-9} M) pero tiene una afinidad de unión por otra proteína LRP que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces más débil que su afinidad de unión por LRP6.

En determinadas modalidades, la medida de la unión del CKP de unión a LRP6 de origen no natural a una proteína no objetivo (por ejemplo, un homólogo de LRP6 tal como LRP1, LRP1B, LRP2,

LRP3, LRP4, LRP5, LRP8, LRP10, LRP11 y LRP12) es menor que aproximadamente 10% de la unión de CKP de unión a LRP6 de origen no natural a LRP6 humana tal como se determina mediante métodos conocidos en la técnica, tales como ELISA, 5 clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula comparada con la unión de una molécula testigo, que generalmente es un molécula de estructura similar que no tiene 10 actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse mediante competencia con una molécula testigo que es similar a la objetivo, por ejemplo, un exceso de objetivo no etiquetado. En este caso, la unión específica se indica si la unión del objetivo etiquetado a una sonda se inhibe de forma 15 competitiva mediante un exceso del objetivo sin etiquetar. La expresión «unión específica» o «se une específicamente» o es «específico para» un polipéptido o un epítipo específico en un objetivo polipeptídico específico tal como se usa en la presente la puede exhibir, por ejemplo, una molécula que tiene 20 una Kd para el objetivo de al menos aproximadamente 10^{-4} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-5} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-6} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-7} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-8} M, 25 alternativamente al menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-10} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-11} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-12} M o mayor. En una modalidad, la expresión «unión específica» hace referencia 30 a la unión donde una molécula se une a un polipéptido o epítipo específico en un polipéptido específico sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo de

polipéptido.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural que se une específicamente a LRP6 se une a LRP6 humana con una Kd entre aproximadamente 1 pM a aproximadamente 500 nM. En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural se une a LRP6 humana con una Kd entre aproximadamente 1 pM a aproximadamente 50 pM, entre aproximadamente 50 pM a aproximadamente 250 pM, entre aproximadamente 250 pM a aproximadamente 500 pM, entre aproximadamente 500 pM a 750 pM, entre aproximadamente 750 pM a aproximadamente 1 nM, entre aproximadamente 1 nM a aproximadamente 25 nM, entre aproximadamente 25 nM a aproximadamente 50 nM, entre 50 nM a aproximadamente 100 nM, entre aproximadamente 100 nM a aproximadamente 250 nM, o entre aproximadamente 250 nM a aproximadamente 500 nM, incluido cualquier rango entre estos valores.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural inhibe la señalización de Wnt1, por ejemplo, tal como se determina utilizando métodos descritos en los Ejemplos más adelante.

También se contemplan moléculas de ácido nucleico que codifican para el CKP de unión a LRP6 de origen no natural descrito, vectores de expresión que comprenden las moléculas de ácido nucleico que codifican para el CKP de unión a LRP6 de origen no natural y células que comprenden las moléculas de ácido nucleico. Además se proporcionan en la presente métodos para producir un CKP de unión a LRP6 cultivando dichas células, expresando el CKP de unión a LRP6 de origen no natural y recuperando el CKP de unión a LRP6 de origen no natural del cultivo celular.

En determinadas modalidades, un CKP de unión a LRP6 de origen no natural se produce a través de traducción *in vitro*, tal como

se describe en otra parte en la presente.

Tal como se describe en otra parte en la presente, un CKP de unión a LRP6 de origen no natural se genera a través de síntesis de péptido química, por ejemplo, insertando los péptidos sintetizados químicamente L1, L2, L3, L4 y/o L5 en un marco de EETI-II o sintetizando químicamente el CKP de unión a LRP6 de origen no natural entero.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a LRP6 de origen no natural es un agente terapéutico en el tratamiento de enfermedades o afecciones donde participa una actividad excesiva de LRP6.

Métodos de producción

En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural se genera a través de manipulación genética. Diversos métodos de mutagénesis se han descrito anteriormente (junto con métodos adecuados para barrido y selección). Dichos métodos de mutagénesis incluyen, a modo no taxativo, por ejemplo, PCR susceptible a errores, transposición de bucle o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, inserción aleatoria de nucleótido u otros métodos anteriores a la recombinación. Se describen más detalles sobre estos métodos en, por ejemplo, Abou-Nadler *et al.* (2010) *Bioengineered Bugs* 1, 337-340; Firth *et al.* (2005) *Bioinformatics* 21, 3314-3315; Cirino *et al.* (2003) *Methods Mol Biol* 231, 3-9; Pirakitikulr (2010) *Protein Sci* 19, 2336-2346; Steffens *et al.* (2007) *J. Biomol Tech* 18, 147-149; y otros. Por consiguiente, en determinadas modalidades, se proporciona un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural generado a través de técnicas de manipulación genética.

En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen

no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural se genera a través de traducción *in vitro*. Brevemente, la traducción *in vitro* implica clonar la o las secuencias que codifican para la proteína en un vector que contiene un
5 promotor, producir ARNm transcribiendo la o las secuencias clonadas con una ARN polimerasa y sintetizar la proteína mediante traducción de su ARNm *in vitro*, por ejemplo, utilizando un extracto libre de células. Se puede generar una proteína variante deseada simplemente alterando la secuencia
10 codificante de proteína clonada. Se pueden traducir muchos ARNm de forma eficaz en extractos de germen de trigo o en lisados de reticulocito de conejo. Se describen más detalles sobre la traducción *in vitro* en, por ejemplo, Hope et al. (1985) *Cell* 43, 177-188; Hope et al. (1986) *Cell* 46, 885-894; Hope et al.
15 (1987) *EMBO J.* 6, 2781-2784; Hope et al. (1988) *Nature* 333, 635-640; y Melton et al. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 7057-7070. Por consiguiente, en la presente se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican para un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural
20 descritos en la presente. También se proporciona un vector de expresión enlazado funcionalmente con una molécula de ácido nucleico que codifica para un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural. Además se proporcionan células hospedadoras (incluidas, por
25 ejemplo, células hospedadoras procariontes tales como *E. coli*, células hospedadoras eucariontes tales como células de levadura, células de mamíferos, células CHO, etc.) que comprenden un ácido nucleico que codifica para un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de
30 origen no natural.

En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural se

genera a través de traducción *in vitro*. Brevemente, la traducción *in vitro* implica clonar la o las secuencias que codifican para la proteína en un vector que contiene un promotor, producir ARNm transcribiendo la o las secuencias clonadas con una ARN polimerasa y sintetizar la proteína mediante traducción de su ARNm *in vitro*, por ejemplo, utilizando un extracto libre de células. Se puede generar una proteína mutante deseada simplemente alterando la secuencia codificante de proteína clonada. Se pueden traducir muchos ARNm de forma eficaz en extractos de germen de trigo o en lisados de reticulocito de conejo. Se describen más detalles sobre la traducción *in vitro* en, por ejemplo, Hope et al. (1985) *Cell* 43, 177-188; Hope et al. (1986) *Cell* 46, 885-894; Hope et al. (1987) *EMBO J.* 6, 2781-2784; Hope et al. (1988) *Nature* 333, 635-640; y Melton et al. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 7057-7070. En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural se genera a través de síntesis química. En determinadas modalidades, los péptidos L1, L2, L3, L4 y/o L5 sintetizados químicamente se injertan en un marco basado en EETI-II (tal como la estructura de armazón I) para generar un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural entero o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural entero se sintetiza químicamente. Los métodos de síntesis de péptidos de fase sólida y fase líquida se conocen en la técnica y se describen con detalle en, por ejemplo, *Methods of Molecular Biology*, 35, Peptide Synthesis Protocols, (M. W. Pennington and B. M. Dunn Eds), Springer, 1994; Welsch et al. (2010) *Curr Opin Chem Biol* 14, 1-15; *Methods of Enzymology*, 289, Solid Phase Peptide Synthesis, (G. B. Fields Ed.), Academic Press, 1997; *Chemical Approaches to the*

Synthesis of Peptides and Proteins, (P. Lloyd-Williams, F. Albericio y E. Giralt Eds), CRC Press, 1997; Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach, (W. C. Chan, P. D. White Eds), Oxford University Press, 2000; Solid Phase
5 Synthesis, A Practical Guide, (S. F. Kates, F. Albericio Eds), Marcel Dekker, 2000; P. Seneci, Solid-Phase Synthesis and Combinatorial Technologies, John Wiley & Sons, 2000; Synthesis of Peptides and Peptidomimetics (M. Goodman, Editor-in-chief, A. Felix, L. Moroder, C. Tmiolo Eds), Thieme, 2002; N. L.
10 Benoiton, Chemistry of Peptide Synthesis, CRC Press, 2005; Methods in Molecular Biology, 298, Peptide Synthesis and Applications, (J. Howl Ed) Humana Press, 2005; y Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, Tomo 3, Building Blocks, Catalysts and Coupling Chemistry, (A. B. Hughs, Ed.)
15 Wiley-VCH, 2011.

Moléculas quiméricas que comprenden una proteína de EETI-II de origen no natural

Un CKP de origen no natural descrito en la presente (tal como
20 un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) también puede modificarse si es ventajoso de algún modo para formar una molécula quimérica que comprende el CKP de origen no natural fusionado (por ejemplo, fusionado recombinantemente) con otro polipéptido heterólogo o
25 secuencia de aminoácidos. En determinadas modalidades, dicha molécula quimérica comprende una fusión de un CKP de origen no natural descrito en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) con un anticuerpo para formar, por ejemplo, una
30 molécula divalente o una molécula biespecífica.

En determinadas modalidades, una molécula quimérica comprende una fusión de un CKP de origen no natural descrito en la

presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) con un segundo resto (tal como un dominio de transducción proteica) que se orienta hacia la molécula quimérica para administración a
5 diversos tejidos o, por ejemplo, a través de la barrera hematoencefálica, utilizando, por ejemplo, el dominio de transducción proteica de la proteína TAT de virus de inmunodeficiencia humana (Schwarze *et al.*, 1999, *Science* 285: 1569-72).

10 En determinadas modalidades, el CKP de origen no natural proporcionado en la presente puede utilizarse como bi o multiespecífico (para diferentes ligandos objetivo o diferentes epítomos en el mismo ligando objetivo) en forma de multímero. Por ejemplo, un CKP de origen no natural
15 biespecífico dimérico tiene una subunidad con especificidad para una primera proteína o epítopo objetivo y una segunda subunidad con especificidad para una segunda proteína o epítopo objetivo. Las subunidades proteicas de CKP de origen no natural pueden unirse en una variedad de conformaciones que pueden
20 aumentar la valencia y, por consiguiente, la avidéz de unión por un ligando objetivo.

En determinadas modalidades, una molécula quimérica proporcionada en la presente comprende dos o más (tal como tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de
25 diez) proteínas de CKP de origen no natural. En determinadas modalidades, un ácido nucleico puede manipularse para codificar para dos o más copias de un CKP de origen no natural simple, cuyas copias se transcriben y traducen en tándem para producir un multímero enlazado covalentemente de subunidades idénticas.

30 En determinadas modalidades, el ácido nucleico puede manipularse para codificar para dos o más CKP de origen no natural diferentes, cuyas copias se transcriben y traducen en

tándem para producir un multímero enlazado covalentemente de subunidades diferentes que se unen, por ejemplo, a epítomos diferentes de un ligando objetivo simple, o, por ejemplo, a ligandos objetivo diferentes.

5 En otra modalidad, dicha molécula quimérica comprende una fusión de un CKP de origen no natural descrito en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítopo al cual se puede unir
10 selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. La etiqueta epítopo generalmente se coloca en el extremo amínico o carboxílico del CKP de origen no natural. La presencia de dichas formas de epítopo etiquetado de la proteína de CKP de origen no natural detectarse utilizando un anticuerpo contra
15 el polipéptido etiqueta. Además, proporcionar la etiqueta de epítopo posibilita que el CKP de origen no natural se purifique rápidamente mediante purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la etiqueta de epítopo. Diversos polipéptidos etiqueta
20 y sus respectivos anticuerpos se conocen en la técnica. Los ejemplos incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-His) o poli-histidina-glicina (poli-His-Gly); el polipéptido etiqueta flu HA y su anticuerpo 12CA5 (Field *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8, 2159-2165); y la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para la misma (Evan *et al.* (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5, 3610-3616]; y la etiqueta de la glicoproteína D (gD) del virus del herpes simple y su anticuerpo (Paborsky *et al.* (1990) *Protein Eng.*, 3, 547-553). Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido Flag (Hopp *et ál.* (1988)
25 *BioTechnology*, 6,1204-1210); el péptido de epítopo KT3 (Martin *et al.* (1992) *Science*, 255, 192-194]; un péptido de epítopo de α -tubulina (Skinner *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 15163-

15166); y la etiqueta peptídica de proteína 10 del gen T7 (Lutz-Freyermuth *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 87, 6393-6397].

En determinadas modalidades, la molécula quimérica puede
5 comprender una fusión de una proteína de CKP de origen no natural descrito en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) con una inmunoglobulina o una región específica de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula
10 quimérica (por ejemplo, una «inmunoadhesina»), dicha fusión podría hacerse en la región Fc de una molécula IgG. Las fusiones de Ig proporcionadas en la presente incluyen polipéptidos que comprenden aproximadamente o solo los residuos 94-243, los residuos 33-53 o los residuos 33-52 de humano en lugar de al
15 menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una modalidad preferida específica, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones de bisagra, CH2 y CH3, o de bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina véase además la patente
20 estadounidense N.º 5,428,130 expedida el 27 de junio de 1995. En determinadas modalidades, un CKP de origen no natural descrito en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) se fusiona, por ejemplo, en el extremo N o C, con la región
25 constante de una IgG (Fc) En determinadas modalidades, la molécula de fusión CKP de origen no natural/Fc activa el componente de complemento de la respuesta inmunitaria. En determinadas modalidades, la proteína de fusión CKP de origen no natural/Fc aumenta el valor terapéutico del CKP de origen
30 no natural. En determinadas modalidades, una proteína de CKP de origen no natural descrita en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6

de origen no natural) se fusiona (tal como fusionada recombinantemente), por ejemplo, en el extremo N o C, con una proteína de complemento, tal como Clq. Diversas publicaciones describen métodos para obtener proteínas de origen no natural
5 cuyas semividas se modifican introduciendo un polipéptido de unión a FcRn en las moléculas (WO 1997/43316, US 5869046, US 5747035, WO 1996/32478, WO 1991/14438) o fusionando las proteínas con anticuerpos cuyas afinidades de unión por FcRn están conservadas pero las afinidades por otros receptores Fc
10 se han reducido en gran medida (WO 1999/43713) o fusionando con dominios de anticuerpos de unión a FcRn (WO 2000/09560, US 4703039). Las técnicas y métodos específicos para aumentar la semivida de las moléculas fisiológicamente activas (por ejemplo, CKP de origen no natural) también se pueden encontrar en US 7083784. En determinadas modalidades, una proteína de
15 CKP de origen no natural descrita en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) se fusiona con una región Fc de una IgG que comprende mutaciones de residuo de aminoácido (tales como se numeran mediante el índice EU de Kabat):
20 M252Y/S254T/T256E o H433K/N434F/Y436H.

En determinadas modalidades, las proteínas de CKP de origen no natural descritas en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen
25 no natural) se fusionan con moléculas que aumentan o extienden la semivida *in vivo* o en suero. En determinadas modalidades, un CKP de origen no natural descrito en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) se fusiona con albúmina, tal como
30 seroalbúmina humana (HSA, por sus siglas en inglés), polietilenglicol (PEG), polisacáridos, moléculas de inmunoglobulina (IgG), complemento, hemoglobina, un péptido de

unión, lipoproteínas u otros factores para aumentar su semivida en el torrente sanguíneo y/o su penetración en tejidos.

Se pueden generar moléculas quiméricas adicionales que comprenden CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o CKP de unión a LRP6 de origen no natural a través de técnicas de transposición de genes, transposición de motivos, transposición de exones y/o transposición de codones (denominadas colectivamente «transposición de ADN»). La transposición de ADN puede emplearse para alterar las actividades de los CKP de origen no natural (por ejemplo, CKP de origen no natural con afinidades mayores o tasas de disociación más bajas). Véanse, en general, US 5605793, US5811238, US 5830721, US 5834252, US 5837458, Patten *et al.* (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 724-33; Harayama (1998) *Trends Biotechnol.* 16, 76-82; Hansson, *et al.*, (1999) *J. Mol. Biol.* 287, 265-76; y Lorenzo and Blasco, (1998) *Biotechniques* 24, 308-313.

En determinadas modalidades, un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural proporcionado en la presente se altera al someterlo a mutagénesis aleatoria mediante PCR susceptible a errores, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos anteriores a la recombinación. Una o más porciones de un polinucleótido que codifica para una armazón que se une a un objetivo específico pueden recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

Cualquiera de estas fusiones puede generarse mediante técnicas estándares, por ejemplo, mediante expresión de la proteína de fusión de un gen de fusión recombinante construido utilizando secuencias génicas disponibles al público o mediante síntesis de péptidos química.

Conjugados que comprenden un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural

En la presente se proporcionan inmunoconjugados que comprenden
5 un CKP de origen no natural descrito en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) conjugado con un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen
10 bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de estas) o isótopos radioactivos (es decir, un radioconjugado).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de estas que pueden utilizarse incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos que no son de unión de toxina diftérica, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A,
15 cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaaria*
20 *officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Otras toxinas incluyen maitansina y maitansinoides, caliqueamicina y otros agentes citotóxicos. Una variedad de radionúclidos se encuentra disponible para la producción de CKP de origen no natural radioconjugados. Los
25 ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y e ^{186}Re .

Los conjugados de un CKP de origen no natural descrito en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) y, por ejemplo, agente citotóxico se producen utilizando una variedad de
30 agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres

(tales como HCl de dimetil adipimidato), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexandiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolieno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminapentaacético etiquetado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido con un CKP de origen no natural proporcionado en la presente. Véase W094/11026.

En otra modalidad, el CKP de origen no natural descrito en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) puede conjugarse con un «receptor» (tal como estreptavidina) para el uso en la «preorientación» ocular donde el conjugado de proteína de armazón de EETI-II de origen no natural-receptor se administra al paciente ocular y posteriormente se elimina el conjugado no unido de la circulación utilizando un agente aclarador y luego se administra un «ligando» (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido) o un agente terapéutico.

En determinadas modalidades, el CKP de origen no natural proporcionado en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) puede utilizarse como bi o multiespecífico (para diferentes ligandos objetivo o diferentes epítomos en el mismo ligando objetivo) en forma de multímero. Los acoplamientos pueden ser covalentes o no covalentes. Por ejemplo, un CKP de

origen no natural biespecífico dimérico tiene una subunidad con especificidad para una primera proteína o epítipo objetivo y una segunda subunidad con especificidad para una segunda proteína o epítipo objetivo. Las subunidades de CKP de origen no natural pueden unirse, por ejemplo, a través de conjugación, en una variedad de conformaciones que pueden aumentar la valencia y, por consiguiente, la avidéz de unión por un ligando objetivo o de unión a múltiples ligandos objetivo.

En determinadas modalidades, los CKP de origen no natural proporcionados en la presente se genomanipulan para proporcionar grupos reactivos para conjugación. En determinadas modalidades, el extremo N y/o el extremo C también pueden servir para proporcionar grupos reactivos para conjugación. En determinadas modalidades, el extremo N se conjuga con un resto (tal como, pero sin limitarse a, PEG) mientras que el extremo C se conjuga con otro resto (tal como, pero sin limitarse a, biotina) o viceversa.

Se proporciona un CKP de origen no natural descrito en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) conjugado con uno o más restos, incluidos, a modo no taxativo, péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión, moléculas de ácido nucleico, moléculas pequeñas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas. Además se proporciona el uso de un CKP de origen no natural descrito en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) conjugado químicamente (incluidas conjugaciones covalentes y no covalentes) con una proteína o polipéptido heterólogo (o fragmento del mismo, con un polipéptido de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos

100 aminoácidos). La fusión no debe ser necesariamente directa, sino que puede producirse a través de secuencias conectoras descritas en la presente.

En determinadas modalidades, un CKP de origen no natural descrito en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) o análogos o derivados del mismo pueden conjugarse con un agente de diagnóstico o detectable. Dichos conjugados de CKP de origen no natural pueden ser útiles para monitorear o pronosticar el desarrollo o evolución de una enfermedad como parte de un procedimiento de evaluación clínica, tal como para determinar la eficacia de una terapia específica. Dicho diagnóstico y detección puede lograrse acoplando el CKP de origen no natural con sustancias detectables incluidas, pero sin limitarse a, diversas enzimas, tales como, pero sin limitarse a, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero sin limitarse a, estreptavidin/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero sin limitarse a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero sin limitarse a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero sin limitarse a, luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radioactivos, tales como, pero sin limitarse a, yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In ,) y tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn y ^{117}Tm ; metales emisores de positrones que

utilizan diversas tomografías de emisión de positrones, iones metálicos paramagnéticos no radioactivos y moléculas que están radioetiquetadas o conjugadas con radioisótopos específicos.

También se proporcionan CKP de origen no natural (tales como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) conjugados con un resto terapéutico. En determinadas modalidades, un CKP de origen no natural puede conjugarse con un resto terapéutico tal como citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citóxico, un agente terapéutico o un ion metálico radioactivo, por ejemplo, emisores alfa. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es nocivo para las células.

En determinadas modalidades, un CKP de origen no natural descrito en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) se conjuga con restos terapéuticos tales como un ion metálico radioactivo, tal como emisores alfa tales como ^{213}Bi o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos, incluidos pero sin limitarse a, ^{131}In , ^{131}Lu , ^{131}Y , ^{131}Ho , ^{131}Sm , con polipéptidos. En determinadas modalidades, el quelante macrocíclico es ácido 1, 4, 7, 10- tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetra-acético (DOTA) que puede acoplarse al CKP de origen no natural a través de una molécula conectora. Dichas moléculas conectoras se conocen comúnmente en la técnica y se describen, por ejemplo, en Denardo *et al.* (1998) *Clin Cancer Res.* 4, 2483-90; Peterson *et al.* (1999) *Bioconjug. Chem.* 10, 553-557; y Zimmerman *et al.* (1999) *Nucl. Med. Biol.* 26, 943-50.

Las técnicas para conjugar restos terapéuticos con anticuerpos se conocen en la técnica y pueden aplicarse a los CKP de origen no natural divulgados en la presente, véase, por ejemplo, Amon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In

Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56. (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2da Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53
5 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results y Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radio labeled Antibody
10 In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe *et al.*, 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58. Se pueden adaptar abordajes similares para uso con los CKP de origen no natural proporcionados en la presente.

15 El resto terapéutico o fármaco conjugado con un CKP de origen no natural descritos en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) debe elegirse para lograr el efecto o efectos profilácticos o terapéuticos deseados para un trastorno
20 específico en un sujeto. Un médico u otro profesional sanitario debe considerar lo siguiente al decidir sobre el resto terapéutico o fármaco para conjugar con un armazón: la naturaleza de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad y la condición del sujeto.

25 En determinadas modalidades, los CKP de origen no natural descritos en la presente (tal como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) también se pueden acoplar a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoanálisis o purificación del
30 antígeno objetivo. Dichos soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, cristal, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Modificaciones covalentes

También se contemplan modificaciones covalentes de CKP de origen no natural descritos en la presente (tales como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural). Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar residuos de aminoácidos objetivo un CKP de origen no natural con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos de extremo N o C del CKP de origen no natural. La derivación con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular el CKP de origen no natural con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para uso en el método para purificar un ligando objetivo y viceversa. Los agentes de reticulación comúnmente utilizados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluyen ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidil-propionato), maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(*p*-azidofenil)-dithio]propioimidato.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos glutaminilo y asparaginilo en los residuos glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetilación de la amina del extremo N y amidación de cualquier grupo carboxilo del extremo C.

Otro tipo de modificación covalente de un CKP de origen no natural comprende enlazar el CKP de origen no natural con uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la forma establecida en US 4640835, US 4496689, US 4301144, US 4670417, US 4791192 o US 4179337.

El término «polietilenglicol» o «PEG» significa un compuesto de polietilenglicol o derivado del mismo, con o sin agentes de acoplamiento, restos de acoplamiento o activación (por ejemplo, con tiol, triflato, tresilato, azirdina, oxirano, N-hidroxisuccinimida o un resto maleimida). El término «PEG» pretende indicar polietilenglicol de un peso molecular entre 500 y 150.000 Da, incluidos análogos del mismo, donde por ejemplo el grupo OR del extremo ha sido reemplazado por un grupo metoxi (denominado mPEG).

En determinadas modalidades, los CKP de origen no natural descritos en la presente (tales como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de unión a LRP6 de origen no natural) se derivan con polietilenglicol (PEG). PEG es un polímero lineal, soluble en agua de unidades repetidas de óxido de etileno con dos grupos hidroxilo de extremo. Los PEG se clasifican por sus pesos moleculares que típicamente varían de aproximadamente 500 daltones a aproximadamente 40.000 daltones. En una modalidad preferida en la presente, los PEG empleados tienen pesos moleculares que varían de 5.000 daltones a aproximadamente 20.000 daltones. Los PEG acoplados a CKP de origen no natural descritos en la presente pueden ser ramificados o no ramificados (por ejemplo, Monfardini, C. *et al.* 1995 *Bioconjugate Chem* 6:62-69). Se encuentran PEG disponibles en el mercado de Nektar Inc., Sigma Chemical Co. y otras empresas. Dichos PEG incluyen, pero no se limitan a, monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH),

monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S),
 monometoxipolietilenglicol-succinimidil succinato (MePEG-S-
 NHS), monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH₂),
 monometoxipolietilenglicol-tresilato (MePEG-TRES),
 5 monometoxipolietilenglicol-imidazolil-carbonilo (MePEG-IM).

En determinadas modalidades, el polímero hidrófilo que se
 emplea, por ejemplo, PEG, se taponea en un extremo mediante un
 grupo no reactivo tal como un grupo metoxi y etoxi. Luego, el
 polímero se activa en el otro extremo mediante reacción con un
 10 agente de activación adecuado, tal como haluros cianúricos (por
 ejemplo, cloruro, bromuro o fluoruro cianúrico), diimidazol, un
 reactivo anhídrido (por ejemplo, un anhídrido dihalosuccínico,
 tal como anhídrido dibromosuccínico), azida de acilo, éter de
p-diazoiumbencilo, 3-(*p*-diazoniumfenoxi)-2-hidroxipropiléter)
 15 y similares. El polímero activado a continuación se hace
 reaccionar con un CKP de origen no natural de la presente (tal
 como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de
 unión a LRP6 de origen no natural) para producir un CKP de
 origen no natural derivado con un polímero. Alternativamente,
 20 se puede activar un grupo funcional en el CKP de origen no
 natural proporcionado en la presente para hacer reacción con
 el polímero, o los dos grupos pueden unirse en una reacción de
 acoplamiento coordinada utilizando métodos de acoplamiento
 conocidos. Se apreciará fácilmente que los CKP de origen no
 25 natural proporcionados en la presente pueden derivarse con PEG
 utilizando una gama de esquemas de reacción distintos conocidos
 y utilizados por los expertos en la técnica.

Liposomas

30 Los CKP de origen no natural descritos en la presente (tales
 como un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o un CKP de
 unión a LRP6 de origen no natural) también pueden formularse

como liposomas. Los liposomas que contienen una proteína de
armazón de EETI-II de origen no natural descrita en la presente
pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica, tales
como los descritos en Epstein *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EUA*
5 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EUA*, 77: 4030
(1980); y las patentes estadounidenses N.º 4,485,045 y
4,544,545. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se
describen en la patente estadounidense N° 5,013,556.

Los liposomas particularmente útiles pueden generarse mediante
10 el método de evaporación de fase inversa con una composición
lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y
fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas
se extruyen a través de filtros de un tamaño de poro definido
para proporcionar liposomas con el diámetro deseado. También
15 se incluye opcionalmente un segundo agente terapéutico dentro
del liposoma. Véase, Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.*,
81(19): 1484 (1989).

Composiciones y formulaciones farmacéuticas que comprenden
20 péptidos de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se
unen al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A)
humano

En determinadas modalidades, se proporciona en la presente una
composición farmacéutica que comprende un CKP de unión a VEGF-A
25 de origen no natural y un excipiente farmacéuticamente
aceptable. En determinadas modalidades la composición puede
contener también, soluciones amortiguadoras, portadores,
estabilizadores, conservantes y/o agentes de carga, para
producir la composición adecuada para administración ocular a
30 un paciente para lograr un efecto o resultado deseado. En
determinadas modalidades, la composición farmacéutica
comprende uno o más potenciadores de permeabilidad que permiten

que un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural penetre la córnea. Los ejemplos de dichos potenciadores de permeabilidad incluyen, por ejemplo, tensioactivos, ácidos biliares, agentes quelantes, conservantes, ciclodextrinas (es decir, oligonucleótidos cilíndricos con una superficie externa hidrófila y una superficie interna lipófila que forma complejos con fármacos lipófilos), etc. Dichos potenciadores de permeabilidad aumentan la estabilidad química y la biodisponibilidad y reducir la irritación local. En determinadas modalidades, una composición farmacéutica proporcionada en la presente comprende además agentes que aumentan la absorción y distribución de CKP de unión a VEGF-A de origen no natural en diversos compartimientos oculares. En determinadas modalidades, una composición farmacéutica proporcionada en la presente comprende un ácido poliacrílico reticulado que puede potenciar la biodisponibilidad ocular en virtud de sus propiedades mucoadhesivas. En determinadas modalidades, una composición farmacéutica proporcionada en la presente comprende un polímero bioadhesivo.

En determinadas modalidades, una composición farmacéutica proporcionada en la presente se formula como un sistema de gelificación in situ, por ejemplo, un líquido basado en polímero viscoso que exhibe una transición de fase sol-a-gel en la superficie ocular debido a un cambio en un parámetro fisicoquímico específico (resistencia iónica, temperatura, pH o intercambio de disolvente) cuando la composición entra en contacto con el fluido lagrimal. En determinadas modalidades, se formula una composición farmacéutica proporcionada en la presente como un spray ocular. En determinadas modalidades, se formula una composición farmacéutica proporcionada en la presente como liposomas. En determinadas modalidades, se formula una composición farmacéutica proporcionada en la

presente como niosomas (es decir, vesículas basadas en tensioactivo no iónico que contienen, por ejemplo, colesterol como excipiente). En determinadas modalidades, se formula una composición farmacéutica proporcionada en la presente como

5 farmacosomas (es decir, vesículas formadas mediante fármacos anfifílicos). En determinadas modalidades, se formula una composición farmacéutica proporcionada en la presente como una microemulsión. Los detalles adicionales sobre diversas formulaciones farmacéuticas oftálmicas se proporcionan, por

10 ejemplo, en Gaikwad et al. (2013) *Indo Amer J Pharm Res.* 3, 3216-3232; Achouri et al. (2012) *Drug Dev Indust Pharm.* 39, 1599-1617; Lu (2010) *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 4, 49-57; Baranowski et al. (2014) *Sci World J.* doi.org/10.1155/2014/861904; Lang (1995) *Adv Drug Deliv Rev.*

15 16, 39-43; Short (2008) *Toxicologic Path.* 36, 49-62; y otros. En determinadas modalidades, una composición farmacéutica que comprende un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente es estable a temperatura ambiente (tal como a aproximadamente 20-25°C) durante aproximadamente 0.5 semanas,

20 aproximadamente 1.0 semanas, aproximadamente 1.5 semanas, aproximadamente 2.0 semanas, aproximadamente 2.5 semanas, 3.5 semanas, aproximadamente 4.0 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses,

25 aproximadamente 6 meses o más de 6 meses, incluido cualquier rango entre estos valores. En determinadas modalidades, una composición farmacéutica que comprende un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente es estable en condiciones aceleradas (tal como almacenamiento a

30 aproximadamente 37°C) durante aproximadamente 0.5 semanas, aproximadamente 1.0 semanas, aproximadamente 1.5 semanas, aproximadamente 2.0 semanas, aproximadamente 2.5 semanas, 3.5

semanas, aproximadamente 4.0 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses o más de 6 meses, incluido cualquier
5 rango entre estos valores.

Métodos de tratamiento utilizando péptidos de nudo de cistina (CKP) de origen no natural que se unen al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A)

10 El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A), una glicoproteína dimérica de aproximadamente 40 kDa, es un mitogen de célula endotelial potencia que estimula la proliferación, migración y formación de vasos que conduce al crecimiento angiogénico de nuevos vasos sanguíneos y permeabilidad vascular
15 aumentada. Las condiciones de oxígeno bajo en la retina o córnea inducen la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) y el crecimiento anormal (tal como excesivo o de otra forma inadecuado) de vasos sanguíneos filtrantes que contribuye a la patología de diversas
20 enfermedades oculares debilitantes incluidas, por ejemplo, ceguera diabética, retinopatías, retinopatía primariamente diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), retinopatía diabética proliferativa (PDR), retinopatía del prematuro (ROP), neovascularización coroidea (CNV), edema
25 macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Rippel-Lindau, histoplasmosis ocular, oclusión de la vena de la retina (oclusión de rama venosa de la retina (BRVO) y oclusión de la vena central de la retina (CRVO), neovascularización corneana, neovascularización retinal y rubeosis. La formación de nuevos
30 vasos sanguíneos inducida por VEGF-A es nociva, y la neovascularización retinal, intertrabecular o corneana pueden conducir en ultima instancia a la pérdida de la visión.

En determinadas modalidades, se proporciona en la presente un método para tratar una enfermedad o trastorno ocular en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural o una
5 composición (tal como una composición farmacéutica) que comprende un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente. En una modalidad determinada, se proporcionan en composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) que comprenden un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural
10 descrito en la presente para uso en un tratamiento de una enfermedad o trastorno ocular en un sujeto. En determinadas modalidades, se proporciona el uso de un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) en la producción
15 de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno ocular en un sujeto.

En determinadas modalidades, el sujeto que se tratará es un mamífero (por ejemplo, humano, primate no humano, rata, ratón, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato, etc.). En
20 determinadas modalidades, el sujeto es un ser humano. En determinadas modalidades, el sujeto es un paciente clínico, un voluntario de ensayo clínico, un animal de experimento, etc. En determinadas modalidades, se sospecha que el sujeto padece o está en riesgo de padecer una enfermedad o trastorno ocular
25 caracterizado por angiogénesis anormal y/o permeabilidad vascular anormal (tales como los descritos en la presente). En determinadas modalidades, el sujeto ha sido diagnosticado con una enfermedad o trastorno ocular caracterizado por angiogénesis anormal y/o permeabilidad vascular anormal (tales
30 como los descritos en la presente).

En determinadas modalidades, la enfermedad o trastorno ocular es una enfermedad ocular proliferativa vascular tal como una

enfermedad ocular proliferativa vascular seleccionada del grupo que consiste en ceguera diabética, retinopatías, retinopatía primariamente diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), retinopatía diabética proliferativa (PDR), retinopatía del prematuro (ROP), neovascularización coroidea (CNV), edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Rippel-Lindau, histoplasmosis ocular, oclusión de la vena de la retina (oclusión de rama venosa de la retina (BRVO) y oclusión de la vena central de la retina (CRVO), neovascularización corneana, neovascularización retinal y rubeosis. En determinadas modalidades, la neovascularización corneana resulta en infección ocular, inflamación ocular, traumatismo ocular (incluidas quemaduras químicas) o pérdida de la barrera de célula primitiva limbal. En determinadas modalidades, la neovascularización corneana resulta de queratitis herpética, tracoma u oncocerciasis.

En determinadas modalidades, la cantidad eficaz de un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente) se administra directamente al ojo del sujeto (tal como por vía intravítrea o tópica), tal como se describe con mayor detalle en otra parte en la presente. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) se administra en combinación con un segundo agente. En pacientes en quienes la enfermedad o trastorno se desencadena por medio de una respuesta inflamatoria, se puede considerar una terapia combinada con un agente antiinflamatorio. Por ejemplo, el uso combinado de esteroides y un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP

de origen no natural) para reducir la inflamación y prevenir la formación de nuevos vasos sanguíneos, respectivamente, puede ser particularmente ventajoso en pacientes con, por ejemplo, neovascularización corneana. Los pacientes que padecen una

5 enfermedad o trastorno ocular secundario a una infección bacteriana, viral, fúngica o por *acanthamoeba* pueden beneficiarse de la administración de un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) en combinación

10 con un agente antimicrobiano y opcionalmente un agente antiinflamatorio, Los pacientes con vasos sanguíneos en el estroma corneano como resultado de una enfermedad o trastorno ocular están en riesgo significativo de rechazo inmunitario tras un trasplante de córenea. Por lo tanto, la administración

15 de un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) antes de (y opcionalmente también posteriormente a) un trasplante de córnea puede ser beneficiosa particularmente para pacientes con vasos sanguíneos en el

20 estroma corneano ya que la reducción exitosa de la vascularización corneana reducirá el riesgo de rechazo del injerto. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) se administra en

25 combinación con un segundo agente antiangiogénico. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) se administra en combinación con un inhibidor de matriz de metaloproteasa.

30 En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) se administra en combinación

con una segunda terapia. En determinadas modalidades, la segunda terapia es terapia de fotocoagulación con láser (LPT, por sus siglas en inglés). La LPT utiliza luz láser para provocar un daño controlado de la retina para producir un efecto terapéutico beneficioso. Pequeños impulsos de luz láser pueden sellar los vasos sanguíneos filtrantes, destruir los vasos sanguíneos anormales, sellar los desgarros retinianos y destruir el tejido anormal en la zona posterior del ojo. Es rápido, no invasivo y generalmente no requiere anestesia más allá que gotas oculares anestésicas. Las técnicas y aparatos de LPT están disponibles para los oftalmólogos (véase Lock *et al.* (2010) *Med J Malaysia* 65:88-94). Los detalles adicionales sobre LPT se pueden encontrar, por ejemplo, en WO 2014/033184. En determinadas modalidades, la segunda terapia es terapia fotodinámica (PDT, por sus siglas en inglés). La PDT utiliza una molécula activada por luz para provocar un daños localizado en el endotelio neovascular que resulta en oclusión del vaso. La luz se aplica a la retina como un punto circular simple a través de un cable de fibra óptica y una lámpara de hendidura, utilizando un lente de aumento oftálmico adecuado (tratamiento con láser). El compuesto activado por luz se inyecta en la circulación antes del tratamiento con láser y el daño se inflige mediante fotoactivación del compuesto en el área afectada por la neovascularización. Un compuesto activado por luz utilizado comúnmente es verteporfina (Visudyne®). La verteporfina se transporta en el plasma principalmente por medio de lipoproteínas. Luego de que la verteporfina se ha activado por luz en presencia de oxígeno, se generan oxígeno singlete de vida corta altamente reactivo y radicales de oxígeno reactivos que dañan el endotelio que rodea a los vasos sanguíneos. Se sabe que el endotelio dañado libera factores procoagulantes y vasoactivos a través de las vías de la lipo-

oxigenasa (leucotrieno) y ciclooxigenasa (eicosanoides tales como tromboxano), que resultan en agregación plaquetaria, formación de coágulo de fibrina y vasoconstricción. La verteporfina parece acumularse preferencialmente en la neovasculatura. La longitud de onda del láser utilizado para la fotoactivación del compuesto activado por luz puede ser varias dependiendo del compuesto activado por luz específico utilizado. Los detalles adicionales sobre PDT se pueden encontrar, por ejemplo, en WO 2014/033184.

En determinadas modalidades, la segunda terapia es diatermia y cauterización, donde los vasos sanguíneos se bloquean mediante aplicación de una corriente coagulante a través de una unidad de diatermia unipolar o mediante cuaterización térmica utilizando una aguja de electrólisis insertada en los vasos sanguíneos de alimentación en el limbo.

Administración

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) se administra, por ejemplo, a través de inyección, por ejemplo, inyección subconjuntival, inyección intracorneana o inyección intravítrea. La administración en forma acuosa es habitual, con un volumen típico de 20-150µl por ejemplo 40-60µl o 50µl. La inyección puede hacerse a través de una aguja de calibre 30 x 1/2 pulgada (12,7 mm). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) se proporciona en una jeringa estéril precargada lista para administración.

En determinadas modalidades, la jeringa tiene bajo contenido de silicona o no contiene silicona. La jeringa puede ser de cristal. Utilizar una jeringa precargada para la administración

tiene la ventaja de que se puede evitar cualquier contaminación de la solución antagonista estéril antes de la administración. Las jeringas precargadas también son fáciles de manipular para el oftalmólogo que las administra. Véase, por ejemplo, WO 5 2014/033184, Fagan et al. (2013) *Clin Exp Ophthalmol.* 41, 500-507; Avery et al. (2014) *Retina.* 34 Suppl 12, S1-S18; y Doshi et al. (2015) *Seminar Ophthalmol.* 26, 104-113 para obtener más detalles sobre la administración intravítrea.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen 10 no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) se administra tópicamente, por ejemplo, en forma de gotas oculares. Los detalles adicionales sobre la administración tópica de fármacos al ojo se encuentran, por ejemplo, en Loftsson et al. (2012) *Acta* 15 *Ophthalmologica.* 90, 603-608; Patel et al. (2013) *World J. Pharmacol.* 2, 47-64; Freeman et al. (2009) *Exp Rev Ophthalmol.* 4, 59-64; y Boddu et al. (2014) *Recent Patents on Drug Delivery and Formulation.* 8, 27-36.

En determinadas modalidades, se utiliza un dispositivo 20 intravítreo para administrar de forma continua el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) en el ojo. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural (o composición que comprende dicho CKP de 25 origen no natural) se administra a través de inserto ocular (incluidos, pero sin limitarse a, por ejemplo, Ocuserts, Lactisers, Soluble Ocular Drug Inserts (SODI, siglas en inglés para insertos de fármaco oculares solubles), Minidiscs, lentes de contacto, películas, tiras de papel filtro, insertos 30 lagrimales artificiales y escudos de colágeno). Véase, por ejemplo, Gaikwad et al. (2013) *Indo Amer J Pharm Res.* 3, 3216-3232). En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A

de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) se administra como un depósito de liberación lenta, un parche/reservorio ocular, un implante ocular (tal como un implante escleral o vítreo). Diversos sistemas de administración escleral y intravítrea se conocen en la técnica. Estos sistemas de administración son típicamente no biodegradables y pueden ser activos o pasivos. Por ejemplo, en WO 2010/088548 se describe un sistema de administración que tiene un cuerpo rígido que utiliza difusión pasiva para administrar un agente terapéutico. En WO 2002/100318 se divulga un sistema de administración que tiene un cuerpo flexible que permite la administración activa a través de un diferencial de presión. Alternativamente, se pueden lograr una administración activa a través de bombas en miniatura implantables. Un ejemplo de un sistema de administración intravítreo que utiliza una bomba en miniatura para administrar un agente terapéutico es Ophthalmic MicroPump System™ comercializado por Replenish, Inc. que puede programarse para administrar una cantidad fija de un agente terapéutico durante una cantidad de veces predeterminada. En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) se encapsula en un contenedor similar a una cápsula pequeño (por ejemplo, un recipiente de elastómero de silicona). El contenedor generalmente se implanta en el ojo por encima del iris. El contenedor comprende una abertura de liberación. La liberación del CKP de unión a VEGF-A de origen no natural (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) puede controlarse mediante una membrana posicionada entre el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) y la abertura, o por medio de una bomba en miniatura conectada

al contenedor. Alternativamente, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) puede depositarse en una matriz de liberación lenta que evita la difusión rápida del antagonista desde el contenedor. Preferiblemente, el dispositivo intravítreo se diseña para liberar el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) a una tasa inicial que es más alta el primer mes. La tasa de liberación disminuye lentamente, por ejemplo, en el transcurso del primer mes después de la implantación, hasta una tasa que es aproximadamente 50% menor que la tasa inicial. El contenedor puede tener un tamaño que es suficiente para alojar un suministro del CKP de unión a VEGF-A de origen no natural (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) que dura aproximadamente cuatro a seis meses. Dado que una dosis reducida del CKP de unión a VEGF-A de origen no natural (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) puede ser suficiente para un tratamiento eficaz cuando la administración es continua, el suministro en el contenedor puede durar un año o más, preferiblemente aproximadamente dos años, más preferiblemente aproximadamente tres años. Debido a que solo se necesita una cirugía pequeña para implantar un sistema de administración y se evitan las inyecciones intravítreas, se pueden evitar problemas relacionados con el cumplimiento por parte del paciente con inyecciones intravítreas repetidas. Las concentraciones intravítreas del CKP de unión a VEGF-A de origen no natural (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) se reducen y por lo tanto se reduce el riesgo potencial de efectos secundarios del CKP de unión a VEGF-A de origen no natural (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) que ingresa a la

circulación.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) se administra a través de iontoforesis. La iontoforesis es una técnica no invasiva en la cual se aplica una pequeña corriente eléctrica para potenciar la penetración del fármaco ionizado en el tejido (véase, por ejemplo, Myles et al. (2005) *Adv Drug Deliv Rev* 57, 2063-79 y Eljarrat-Binstock et al. (2006) *J Controlled Release* 110, 479-89). El fármaco se aplica con un electrodo que tiene la misma carga que el fármaco, y el electrodo de conexión a tierra, que tiene la carga opuesta, se coloca en otra parte del cuerpo para completar el circuito. El fármaco sirve como el conductor de la corriente a través del tejido.

Los detalles adicionales sobre la administración del fármaco al ojo se proporcionan, por ejemplo, en Kuno et al. (2011) *Polymers* 3, 193-221; Short (2008) *Toxicologic Path.* 36, 49-62; Ghateet al. (2006) *Expert Opin Drug Deliv* 3, 275-87; Davis et al. (2004) *Curr Opin Mol Therap* 6, 195-205; Gaudana et al. (2010) *AAPS J.* 12, 348-360; y otros.

Formulaciones de administración de liberación lenta/acción prolongada

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) se proporciona como formulaciones de liberación lenta. Las formulaciones de liberación lenta típicamente se obtienen mezclando un agente terapéutico con un polímero biodegradable o encapsulándolo en micropartículas.

Una formulación de liberación lenta de acuerdo con la invención

típicamente comprende el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural), un portador polimérico y un modificador de liberación para modificar una tasa de liberación del CKP de unión a VEGF-A de origen no natural (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) del portador polimérico. Al variar las condiciones de fabricación de las composiciones de administración basadas en polímeros, se pueden modular las propiedades cinéticas de liberación de las composiciones resultantes. El portador polimérico generalmente comprende uno o más polímeros o copolímeros biodegradables o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el portador polimérico puede seleccionarse de ácido poli-láctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), poliláctido-co-glicólido (PLGA), poliésteres, poli (ortoéster), poli(fosfazina), poli (éster de fosfato), policaprolactonas o combinaciones de estos.

En determinadas modalidades, el portador polimérico es PLGA. El modificador de liberación es típicamente un alcohol graso de cadena larga que comprende preferiblemente de 10 a 40 átomos de carbono. Los modificadores de liberación utilizados comúnmente incluyen alcohol caprílico, alcohol pelargónico, alcohol cáprico, alcohol laurílico, alcohol miristílico, alcohol cetílico, alcohol palmitoleílico, alcohol estearílico, alcohol isoestearílico, alcohol elaidílico, alcohol oleílico, alcohol linoleílico, alcohol elaidolinoleílico poliinsaturado, alcohol linolenílico poliinsaturado, alcohol elaidolinolenílico, alcohol ricinoleílico poliinsaturado, alcohol araquidílico, alcohol behenílico, alcohol erucílico, alcohol lignocerílico, alcohol cerílico, alcohol montanílico, alcohol cluitílico, alcohol miricílico, alcohol melisílico y alcohol gedílico.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen

no natural descrito en la presente (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) se incorpora a una composición de liberación sostenida basada en microesferas. En determinadas modalidades, las microesferas se preparan con PLGA. La cantidad
5 de CKP de unión a VEGF-A de origen no natural (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) incorporada en las microesferas y la tasa de liberación del CKP de unión a VEGF-A de origen no natural (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) pueden controlarse variando las
10 condiciones utilizada para preparar las microesferas. Los procesos para producir dichas formulaciones de liberación lenta se describe en US 2005/0281861 y US 2008/0107694.

En determinadas modalidades, el CKP de unión a VEGF-A de origen
15 dicho CKP de origen no natural) se incorpora a un implante biodegradable (tal como una microaguja). Los implantes de matriz (tales como microagujas) se utilizan típicamente para tratar enfermedades ocular que requieren una dosis de carga y posteriormente dosis de ajuste gradual del fármaco durante un
20 período de tiempo de 1 día hasta 6 meses (Davis et al. (2004) *Curr Opin Mol Therap* 6, 195-205). Se hacen más comúnmente con los copolímeros ácido poli-láctico (PLA) y/o ácido poli-láctico-glicólico (PLGA), que se degradan con agua y dióxido de carbono. La tasa y la extensión de la liberación del fármaco
25 a partir del implante se pueden reducir alterando las concentraciones relativas de láctido (lenta) y glicólido (rápida), alterando las relación en peso de polímero, agregando recubrimientos de polímero adicionales o utilizando fármacos hidrófobos insolubles. La liberación del fármaco generalmente
30 sigue la cinética de primer orden con un impulso inicial de liberación del fármaco y posteriormente una reducción rápida en los niveles del fármaco. Los implantes biodegradables no

requieren extracción, ya que se disuelven con el tiempo (Hsu (2007) *Curr Opin Ophthalmol* 18, 235-9). Los implantes biodegradables también permiten flexibilidad en la dosis y el tratamiento de duración corta (semanas) a duración larga (meses a un año), dependiendo de la relación de los polímeros PLA/PLGA, que es otro beneficio de ajustar la administración del fármaco a la evolución de la enfermedad, debido a que los requisitos de dosis y tratamiento pueden cambiar con el tiempo. Los detalles adicionales sobre la fabricación e implantación de implantes biodegradables (tales como implantes de PLGA o PLA) para la administración ocular se proporcionan, por ejemplo, en WO 2006/093758, US 2006/0182783, WO 2009/026461, US 2008/0181929, US 2009/0263460, US 2010/0015158, US 2011/0207653 y US 2014/0154321. Los detalles adicionales sobre las microagujas para la administración de fármacos ocular se proporciona, por ejemplo, en Donnelly et al. (2010) *Drug Deliv* 14, 187-207; USP7918814, Yavux et al. (2013) *Sci World J.* doi.org/10.1155/2013/732340 y en otras partes.

20 **Artículos de fabricación y kits**

En determinadas modalidades, se proporciona un artículo de fabricación que contiene un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente y materiales útiles para el tratamiento de una enfermedad o trastorno ocular (tal como una enfermedad ocular proliferativa ocular o trastorno ocular caracterizada por angiogénesis excesiva): El artículo de fabricación puede comprender un contenedor y una etiqueta o prospecto en o asociado con el contenedor. Los contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas, etc. Los contenedores puede estar fabricados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. En determinadas modalidades, el contenedor aloja una composición que es eficaz

para tratar una enfermedad o trastorno ocular (tal como una enfermedad ocular proliferativa ocular o trastorno ocular caracterizada por angiogénesis excesiva) y puede tener un conjunto completo de artículos necesarios para implantar un sistema de administración ocular o intraocular de liberación lenta, incluidos, pero sin limitarse a, dispositivo de inyección, medicamentos tópicos e inyectables, instrumentos quirúrgicos, suturas y agujas para suturar y parches oculares. En determinadas modalidades, el contenedor comprende paquetes de dosis unitarias estériles. Al menos un agente activo en la composición es el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente. La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza en el tratamiento de una enfermedad o trastorno ocular (tal como una enfermedad ocular proliferativa ocular o trastorno ocular caracterizada por angiogénesis excesiva). La etiqueta o prospecto también comprenderá instrucciones para administrar el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural (o composición que comprende dicho CKP de origen no natural) al paciente. También se contemplan artículos de fabricación y kits que comprenden terapias de combinación. Prospecto se refiere a las instrucciones que se suelen incluir en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias referentes al uso de dichos productos terapéuticos. En determinadas modalidades, el prospecto indica que la composición que comprende el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural se utiliza en el tratamiento de una enfermedad o trastorno ocular (tal como una enfermedad ocular proliferativa ocular o trastorno ocular caracterizada por angiogénesis excesiva descrita en la presente). También se proporcionan kits que son útiles para diversos

fines, por ejemplo, para aislar o detectar VEGF-A, opcionalmente en combinación con los artículos de fabricación. Para el aislamiento y purificación de VEGF-A, el kit puede contener un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente acoplado a perlas (por ejemplo, perlas de sefarosa). Se pueden proporcionar kits que contienen el CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente para detección y cuantificación de VEGF-A *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o transferencia. Así como el artículo de fabricación, el kit comprende un contenedor y una etiqueta o folleto informativo en o asociado con el contenedor. Por ejemplo, el contenedor aloja una composición que comprende al menos un CKP de unión a VEGF-A de origen no natural descrito en la presente. Se pueden incluir contenedores adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes y soluciones amortiguadoras, anticuerpos testigo, etc. La etiqueta o prospecto puede proporcionar una descripción de la composición así como instrucciones para el uso *in vitro* o de diagnóstico.

20 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales y métodos para los Ejemplos 2-43

Visualización de EETI-II en el fago M13.

Se visualizó EETI-II en la superficie del bacterioófago M13 modificando un fagémido descrito anteriormente pS2202b (Skelton, N. J., Koehler, M. F., Zobel, K., Wong, W. L., Yeh, S., Pisabarro, M. T., Yin, J. P., Lasky, L. A. y Sidhu, S. S. (2003) Origins of PDZ domain ligand specificity. Structure determination and mutagenesis of the Erbin PDZ domain. *J Biol Chem* **278**, 7645-7654). Se utilizaron técnicas de biología molecular estándar para reemplazar el fragmento de pS2202d que codificaba para el dominio Erbin PDZ por un fragmento de ADN que codificaba para EETI-II. El fagémido resultante (p8EETI-

II) contenía un marco de lectura abierto que codificaba para la señal de secreción de proteína de unión a maltosa, seguida de una etiqueta gD y EETI-II y finalizaba con la proteína p8 de la cápside principal de M13. Se coinfectaron p8EETI-II que
 5 albergaban *E. Coli* con el fago auxiliar M13-K07 y los cultivos se cultivaron en 30 ml de medio 2YT complementado con 50 µg/ml de Carbenicilina y 25 µg/ml de Kanamicina 30 °C durante toda la noche. El fago propagado se purificó de acuerdo con el protocolo estándar (Tonikian, R., Zhang, Y., Boone, C. y Sidhu,
 10 S. S. (2007) Identifying specificity profiles for peptide recognition modules from phage-displayed peptide libraries. *Nat Protoc* **2**, 1368-1386) y se volvió a suspender en 1 ml de solución amortiguadora PBT (PBS, 0,5% de BSA y 0,1% de TWEEN®20), resultando en la producción de partículas de fago
 15 que encapsulaban ADN de p8EETI-II y en las que se podía visualizar EETI-II. El nivel de visualización se analizó utilizando un ELISA de fago.

Construcción de bibliotecas y clasificación.

Las bibliotecas de EETI-II se construyeron siguiendo el método de mutagénesis de Kunkel (Kunkel, T. A., Roberts, J. D. y Zakour, R. A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol* **154**, 367-382). Se construyeron tres bibliotecas: La Biblioteca 1, en la que al bucle 1 (3-8) se le asignó de forma aleatoria el
 20 codón degenerado que codificaba para todos los aminoácidos naturales excepto Cys en 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud; o la Biblioteca 2, en la que al bucle 5 (22-26) se le asignó de forma aleatoria el mismo conjunto de codón degenerado con una longitud fija de 5 aminoácidos; o la Biblioteca 3, en la que
 25 al bucle 1 se le asignó de forma aleatoria 6, 8 y 10 aminoácidos y al bucle 5 se le asignaron 5 aminoácidos simultáneamente con el codón degenerado que codificaba para 19 aminoácidos. Los
 30

oligonucleótidos para la mutagénesis se sintetizaron utilizando mezclas regulares de Trimer Phosphoramidites que codificaban para 19 aminoácidos a concentración equimolar. (Glen Research, Sterling, VA). La plantilla de terminación es el ADN monocatenario de p8EETI-II que contiene tres codones de terminación en la región de 3-26 y se utilizó para construir las tres bibliotecas. La concentración de las tres bibliotecas contenía $\sim 3 \times 10^{10}$ de miembros exclusivos y se cicló a través de pasadas de selección de unión contra hVEGF (8-109) capturado en placa durante cuatro pasadas siguiendo el protocolo estándar (Tonikian, R., Zhang, Y., Boone, C. y Sidhu, S. S. (2007) Identifying specificity profiles for peptide recognition modules from phage-displayed peptide libraries. *Nat Protoc* **2**, 1368-1386) con la variación de que se utilizaron 25ug/ml de hVEGF(8-109) para revestir la placa y el fago eluído se propagó cultivando el cultivo durante toda la noche a 30°C.

ELISA de fago spot.

Después de cuatro pasadas de selección de unión, se recogieron e inocularon los clones de fago individuales en 450µl de medios 2YT que contenían 50µg/ml de Carbenicilina y el fago auxiliar M13-K07 en bloques de 96 pocillos, que se cultivaron a 37°C durante toda la noche. El sobrenadante se analizó con ELISA de fago spot de la siguiente forma: se revistieron inmunoplasacas de 384 pocillos MAXISORP™ con hVEGF(8-109) o BSA y el sobrenadante de fago diluido (1:3) con solución amortiguadora PBT se agregó a los pocillos. Se lavaron las placas y el fago unido se detectó con anti-M13-HRP y posteriormente sustrato TMB. En estos ensayos, la unión de fago a BSA sola se sometió a prueba en paralelo para evaluar la unión de fondo. Los clones cuyas señales de unión para hVEGF(8-109) fueron más de 3 veces mayores que las de BSA (fondo) se consideraron como positivos. Los clones positivos se sometieron a análisis de secuencia de

ADN.

Cristalografía.

Para formar un complejo estable, se concentró VEGF-A hasta 7 mg/ml y se concentró con un exceso molar de 6 veces de la variante VEGF_CKP9.54.90. Los cristales de VEGFA/ VEGF_CKP9.54.90 del grupo de espacio monoclinico primitivo $P12_11$ se cultivaron a 19°C mediante el método de difusión de vapor de gota suspendida utilizando una relación de gota de 2:1 proteína:solución de depósito. La solución de depósito contenía 100 mM de HEPES pH 7.4 y 26% de PEG 3350. Los cristales se crioprotegieron en la solución de depósito complementada con 25% de PEG 200 y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido antes de la recolección de datos.

Recolección de datos y determinación de estructura.

Los datos de difracción de rayos X se recogieron a 1.64 Å en la línea de haz 21IDF en la Fuente de Fotones Avanzada. Los datos se procesaron utilizando iMosflm. La estructura se resolvió mediante reemplazo molecular utilizando Phaser in Phenix con la estructura de apo VEGF-A publicada anteriormente (PDB: 1VPF) como modelo de búsqueda y un dímero de VEGF-A en la unidad asimétrica. Hubo una densidad $F_o - F_c$ clara para la variante VEGF_CKP9.54.90, de forma que la estructura de dicha variante se acumuló en densidad manualmente utilizando Coot y luego se sometieron a pasadas repetitivas de refinamiento y reacumulación utilizando Phenix y Coot.

Ensayo de KDR-CHO VEGF para determinar la CI_{50} celular

Se cultivaron células KDR-CHO (células CHO transfectadas de forma estable con KDR etiquetado con gD) en medio de cultivo celular (DMEM/Ham's F-12, 10% de FBS diafiltrado (GIBCO No. de catálogo 26400), 25 mM de HEPES, 2 mM de L-GLUTAMAX™). Para el ensayo de estimulación de VEGF, se colocaron en placas 5×10^4

células/pocillo en 100µl de medio de emplacado de células (DMEM/Ham's F-12, 0.2% de BSA, 0.25% de FBS diafiltrado, 25 mM de HEPES, 2 mM de L-GLUTAMAX™) en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos y se incubaron a 37°C durante toda la noche. El medio se reemplazó con 100µl de medio de estimulación de células libre de suero (DMEM/Ham's F-12, 0.5% de BSA, 25 mM de HEPES) y las células se incubaron a 37°C durante 2 hr. Una hora antes de la estimulación, el medio se reemplazó con 50µl de medio de estimulación de células libre de suero. Simultáneamente, se preincubó VEGF (50 ng/ml para hVEGF, 100 ng/ml para mVEGF y rVEGF) con una cantidad titulada de CKP o anti-VEGF en 50µl de medio de estimulación de células libre de suero a 37°C durante 1 hora y se agregaron a las células. Las células se estimularon durante 15 min a 37°C y se retiró el medio. Se lisaron las células con 130µl de solución amortiguadora de lisis celular healda (150 mM de NaCl, 50 mM de HEPES, 0.5% de Triton-X 100, cóctel inhibidor de proteasa y fosfatasa HALT (ThermoFisher Scientific, Inc.No. de catálogo 78444), 5 mM de EDTA). La fosforilación de Tyr mediada por VEGF de KDR se determinó mediante ensayo basado en ELISA. Brevemente, se revistieron placas de 96 pocillos MAXISORP™ (ThermoFisher Scientific, Inc.No. de catálogo 439454) con 100µl de anticuerpo anti-gD diluido en PBS (1µg/ml) a 4°C durante toda la noche y se lavaron tres veces con solución amortiguadora de lavado (PBS, 0.05% de TWEEN®20, pH 7.4). Las placas se bloquearon con 300µl de solución amortiguadora de bloqueo (PBS, 0.5% de BSA) a temperatura ambiente durante 1 hora y posteriormente se lavaron tres veces con solución amortiguadora de lavado. El lisado celular de KDR-CHO mencionado anteriormente (100µl) se agregó a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se lavaron cuatro veces con solución amortiguadora de lavado y

posteriormente se incubaron con 100µl de 0.5µg/ml de anti-fosfotirosina conjugado con biotina (clon 4G10, Millipore No. de catálogo 16-103) en solución amortiguadora de bloqueo a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavarse cuatro
 5 veces, las placas se incubaron con 100µl de estreptavidina conjugada con HRP en solución amortiguadora de bloqueo a temperatura ambiente durante 30 min. Después de lavarse cuatro veces, las placas se desarrollaron con 100µl de sustrato TMB (BD Biosciences) a temperatura ambiente durante 20~30 min y se
 10 detuvieron mediante la adición de 50µl de solución de H₂SO₄. La densidad óptica de cada pocillo se determinó usando un lector de microplacas fijado a 450 nm.

ELISA de competición

15 Se estableció la especificidad de unión de cada péptido mediante ELISA de competición. Primero, se confirmó la unión de cada factor de crecimiento con su receptor correspondiente en una formato de ELISA en placa revistiendo las placas MAXISORP™ con VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGf-2, NGF, EGF,
 20 PDGF-ββ o IGF-1 a 2 o 5µg/mL durante toda la noche a 4° C en PBS. Tras bloquear con solución amortiguadora de bloqueo (PBS con 0.5% de BSA y 0.05% de TWEEN®20) durante 2 horas a temperatura ambiente, las fusiones de receptor-Fc o receptores biotiniladps se diluyeron en serie utilizando solución
 25 amortiguadora de ensayo (PBS con 0.5% de BSA y 0.05% de TWEEN®20) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se detectó la cantidad de receptor-Fc o receptor biotinilado unido mediante incubación con anti-Fc-HRP humano (Life Technologies) o estreptavidina-HRP de alta afinidad
 30 (ThermoFisher Scientific, Inc.) respectivamente durante 30 min. El ELISA de competición se llevó a cabo de forma idéntica la descrita anteriormente excepto que tras el bloqueo, un

mezcla de péptido diluido en serie que contenía una concentración constante de fusión receptor-Fc o receptor biotinilado (la concentración del receptor se fijó en CE₆₀) se agregó y se incubó durante 1 hora. Todas las proteínas y anticuerpos humanos recombinantes se compraron a R &D Sistema (Minneapolis, MN).

Ensayos de unión SPR.

La cinética de unión y las afinidades de los inhibidores de VEGF-A se evaluaron utilizando tecnología de resonancia de plasmones superficiales en un instrumento BIACORE™ 3000 (GE Healthcare) a 37°C utilizando la solución amortiguadora HBS-EP (10 mM de HEPES pH 7.4, 150 mM de NaCl, 3 mM de EDTA y 0.005% v/v de tensioactivo P20) que contenía 0.1% de DMSO (v/v). Dependiendo del formato de ensayo se utilizó un sensor de estreptavidina (SA) o un sensor revestido con dextrano (CM5) tal como se describe a continuación.

Para uso con el sensor SA, el VEGF-A primero se biotiniló (no más de 2 biotina/ VEGF-A) incubando la proteína con NHS-PEG4-Biotina enlazada a EZ (Pierce) en una relación molar 1:1.5 respectivamente, en PBS durante 2 horas sobre hielo. A continuación se aplacó la reacción mediante la adición de un exceso molar de 10 de Glicina pH 8.0 y se intercambió la solución amortiguadora de la muestra en PBS utilizando fitros de ultracentrífuga Amicon de 0.5 mL 3000 MWCO (EMD Millipore). El estado de biotinilación de la proteína se verificó mediante análisis LC-MS. El VEGF-A biotinilado luego se capturó en la superficie hasta una señal de unidad de resonancia (RU, por sus siglas en inglés) de aproximadamente ~400. La la inmovilización de VEGF-A en el sensor CM5, primero se activó la superficie con una mezcla de clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. A

continuación se diluyó el VEGF-A en solución amortiguadora de acoplamiento (0.1 M de solución amortiguadora de acetato, pH 5.0) y se inyectó hasta que la señal alcanzó aproximadamente ~400 RU y posteriormente se lavó con 1 M de etanolamina pH 8.0 para aplacar los sitios activados restantes.

Tras la etapa de captura, se preparó una serie de concentraciones de péptido en solución amortiguadora de HBS-EP con concentraciones de DMSO coincidentes a 0.1% y se inyectaron a una tasa de flujo de 80µL/min. Los sensorgramas resultantes se analizaron a continuación utilizando un modelo de unión 1:1 para obtener los datos cinéticos y las afinidades utilizando Scrubber 2.0 (BioLogic Software).

Síntesis y plegado de CKP.

Se disolvieron péptidos de LRP6 precursores lineales en DMSO (0.5mg/mL) en 0.1M de bicarbonato de amonio (pH 9), 1mM de glutatión reducido en 50% de DMSO y se incubaron con agitación a temperatura ambiente durante 24h. Los CKP plegados se purificaron mediante RP-HPLC en una columna C18 y luego las fracciones recogidas se analizaron mediante espectrometría de masas, se concentraron y se liofilizaron antes del uso.

Cultivo celular y transfección.

Las células HEK293 transfectadas de forma estable con un reportero de Wnt photinus-luciferina-4-monooxigenasa (Gong et al. (2010) *PLoS ONE* 5,9: e12682). y pRL-SV40 Renilla luciferasa (Promega) se cultivaron hasta un 90% de confluencia en DMEM:F12 (50:50) complementado con 10% de FBS, 2 mM de GLUTAMAX™ y 40 µg/ml de higromicina. Las células se incubaron en un incubador humidificado con 5% de CO₂ a 37 °C durante 24 h. Tras la incubación, las células se tripsinizaron (0.05% de Gibco 15400-54 en PBS) luego se diluyeron hasta 4x10⁵ células/ml en DMEM:F12 (50:50) complementado con 10% de FBS, 2 mM de GLUTAMAX™. Se cargaron 20.000 células en pocillos individuales de las placas

optilux de 96 pocillos de microprueba blancas (No. de catálogo 353947) y se incubaron durante ~24h. Cada pocillo se transfectó utilizando FUGENE® HD con Wnt1-pCDNA3.2 (5ng/pocillo) o Wnt3a-pCDNA3.2 (25ng/pocillo) y luego se cultivaron durante 24h.

5 Todas las variantes de unión a LRP6 se diluyeron en DMSO y se agregaron a las células hasta una concentración final de DMSO de 1% a concentraciones de péptido de 0, 0.1, 0.1, 1.0, 10 y 100µM durante 6 horas. Para la estimulación con Wnt3a recombinante (5036-WN-010/CF, Sistemas R&D), se diluyó en PBS
10 hasta 50ng/mL y se agregó a los medios de incubación con el CKP indicado.

A continuación se midió la respuesta de la luciferasa en todos los ensayos con el kit DUAL-GLO® de Promega de acuerdo con las instrucciones del fabricante, salvo que se utilizó para mitad
15 del volumen de cada reactivo. La luminiscencia de photinus-luciferina-4-monooxigenasa y la luminiscencia de Renilla se midieron en un lector de múltiples etiquetas Perkin Elmer ENVISION™. Las relaciones de luminiscencia entre photinus-luciferina-4-monooxigenasa: Renilla se calcularon y
20 normalizaron hasta la relación en las células testigo que expresaban o se trataron con la proteína Wnt indicada. Las constantes de inhibición se calcularon utilizando datos normalizados en Prism Graphpad utilizando log(inhibidor) con respecto a la respuesta normalizada - pendiente de variable
25 $Y=100/(1+10^{((\text{LogCI}_{50}-X)*\text{Pendiente de Hill}))}$. La significancia estadística se determinó utilizando el método de Holm-Sidak, con $\alpha=5.000\%$. Los cálculos asumen que todas las hileras son muestras de poblaciones con la misma difracción (SD) y las CI_{50} se identificaron como significativamente diferentes utilizando
30 la prueba F de la suma de los cuadrados extra donde $P<0.05$ cuando significativa.

Ejemplo 2A: Generación de variantes de EETI-II de origen no natural que se unen a VEGF-A

Se eligió a EETI-II (**Figura 1**) como armazón para visualización en la superficie del bacteriófago M13. Se fusionó EETI-II con el extremo N de la proteína p8 de la cápside principal de M13. Además, se genomanipuló una etiqueta gD en el extremo N de la secuencia de EETI-II a efectos de verificar los niveles de visualización. Se generaron tres bibliotecas de fago peptídico en función del marco de EETI-II de la siguiente forma:

10 biblioteca I en la que los residuos de aminoácidos del bucle 1 se asignaron de forma aleatoria y la longitud del bucle varió (6, 8, 10 residuos); biblioteca II en las que los residuos de aminoácidos del bucle 5 se asignaron de forma aleatoria y la longitud del bucle natural se mantuvo fija; y biblioteca III

15 en la que el contenido de aminoácidos de ambos bucles 1 y 5 se asignó de forma aleatoria simultáneamente y la longitud del bucle 1 varió de 6 a 10 residuos de aminoácidos mientras que la longitud del bucle 5 se mantuvo fija. Juntas, las tres bibliotecas contenían 3×10^{10} miembros exclusivos y se ciclaron

20 a través de pasadas de selección con respecto a VEGF-A. El barrido con respecto a VEGF-A generó trece variantes únicas que se unen a hVEGF₈₋₁₀₉ (véase la **Tabla 19**). Estas variantes contenían variaciones en la composición de aminoácidos en el bucle 1 o en ambos bucles 1 y 5 simultáneamente. Además, varias

25 variantes tiene un bucle más largo en comparación con el bucle natural presente en EETI-II. También se observó un motivo **YXS** conservado en el bucle 5. Los investigadores generaron péptidos de nudo de cistina plegados solubles que corresponden a siete de estas variantes únicas, y todos demostraron unión a hVEGF-

30 A en un ELISA de competición en fago (**Tabla 19**). Además, los investigadores evaluaron algunas de las variantes en un ensayo celular y las mismas demostraron inhibición en especies

cruzadas de la actividad de VEGF-A humano, de ratón y rata con CI_{50} en μM bajo.

Tabla 19: Agentes de unión basados en EETI-II con respecto a hVEGF-A

VARIANTE	BUCLE 1	BUCLE 5	n	ELISA	S/N*
EETI-II	PRILMR (SEQ ID NO: 92)	GPNGF (SEQ ID NO: 15)		0.01	1.11
VEGF_CKP1	ETDWYPHQID (SEQ ID NO: 225)	GPNGF (SEQ ID NO: 15)	2	0.9	16.9
VEGF_CKP2	GETVFEQFLW (SEQ ID NO: 226)	GPNGF (SEQ ID NO: 15)	2	3.2	48.1

VEGF_CKP3	HMMYDY (SEQ ID NO: 227)	EMYDA (SEQ ID NO: 235)	2	3.1	42.9
VEGF_CKP4	KKWQWWYM (SEQ ID NO: 228)	YPWTE (SEQ ID NO: 236)	5	2.6	35.3
VEGF_CKP5	PAIQNWKEHP (SEQ ID NO: 229)	SWWPSL (SEQ ID NO: 237)	2	1.9	28.4
VEGF_CKP6	PTTRFKQY (SEQ ID NO: 8)	GPNGF (SEQ ID NO: 15)	28	3.5	51.9
VEGF_CKP7	QDPTFNWALY (SEQ ID NO: 9)	QMYQS (SEQ ID NO: 16)	2	3.4	54.5
VEGF_CKP8	QLMHPFWG (SEQ ID NO: 230)	HWYRS (SEQ ID NO: 238)	2	3.9	59.4

5

10

15

20

25

30

VEGF_CKP10	RDLDVKWD (SEQ ID NO: 11)	QYYSS (SEQ ID NO: 18)	3	3.2	43.7
VEGF_CKP11	RTPWEPHDIT (SEQ ID NO: 12)	GPNGF (SEQ ID NO: 15)	16	4.1	57.5
VEGF_CKP12	TTPWPPHEIM (SEQ ID NO: 13)	GPNGF (SEQ ID NO: 15)	75	3.5	55.2
VEGF_CKP13	VTPWKPHWIN (SEQ ID NO: 14)	GPNGF (SEQ ID NO: 15)	2	3.5	56.3

*S/N = relación entre señal y ruido en comparación con un

testigo de BSA

Tabla 20: ELISA de competición en fago y actividades de inhibición celular de agentes de unión solubles basados en EETI-II con respecto a hVEGF-A

VARIANTE	<i>In vitro</i> CI ₅₀ (μ M)	Ensayo celular		
		hVEGF-A (25 ng/ml)	mVEGF (50 ng/ml)	rVEGF (50 ng/ml)
VEGF_CKP6	3	47	169	711.2 (parcial)
VEGF_CKP7	12	18	39	7
VEGF_CKP9	0.6	12	10	1
VEGF_CKP10	1	45	ND*	18
VEGF_CKP11	80	ND*	ND*	ND*
VEGF_CKP12	60	102	243	1220 (parcial)
VEGF_CKP13	80	ND*	ND*	ND*

*ND= no determinado

Para mejorar adicionalmente la potencia de estas variantes, los investigadores hicieron un seguimiento de VEGF_CKP7 y VEGF_CKP9. Se procedió a una aleatorización blanda en los bucles 1 y 5 dentro del marco VEGF-CKP7, que resultó en 16 variantes únicas que se unen a VEGF-A humano (véase la **Tabla 21** a continuación).

Tabla 21: Agentes de unión madurados por afinidad CKP_7 con respecto a hVEGF-A

VARIANTE	BUCLE 1	BUCLE 5	n	ELISA	S/N*
VEGF_CKP7	QDPTFNWALY (SEQ ID NO: 9)	QMYQS (SEQ ID NO: 16)	1	0.1	1.3
VEGF_CKP7.2	DDPSFDWSVY (SEQ ID NO: 287)	RMYS (SEQ ID NO: 292)	1	1.2	21.5

5

10

15

20

25

30

VEGF_CKP7 . 35	QDPTFNWAEY (SEQ ID NO: 62)	QMYQS (SEQ ID NO: 16)	3	0.6	10.6
VEGF_CKP7 . 43	QDPTLNWATY (SEQ ID NO: 289)	QMYQS (SEQ ID NO: 16)	1	0.5	6.3
VEGF_CKP7 . 46	EDPTVDWAQY (SEQ ID NO: 290)	QMYQS (SEQ ID NO: 16)	1	0.3	4.9
VEGF_CKP7 . 50	QDPSLNWADY (SEQ ID NO: 63)	QMHQS (SEQ ID NO: 74)	1	0.8	14.3
VEGF_CKP7 . 54	LDRTLNWALY (SEQ ID NO: 64)	QMYNS (SEQ ID NO: 75)	1	0.5	9.3
VEGF_CKP7 . 57	LDPSFNWSLY (SEQ ID NO: 65)	QMYDS (SEQ ID NO: 76)	2	1.0	17.4

5

10

15

20

25

VEGF_CKP7.81	LDPTVNWALF (SEQ ID NO: 67)	QHYKT (SEQ ID NO: 77)	1	1.1	18.6
VEGF_CKP7.88	QDPKLNWAVY (SEQ ID NO: 68)	QLFNS (SEQ ID NO: 78)	2	0.5	7.7
LRP6_CKP7.89	LDPSFDWALY (SEQ ID NO: 69)	QLYNS (SEQ ID NO: 79)	1	0.5	8.1

*S/N = relación entre señal y ruido en comparación con un
testigo de BSA

Se procedió a una aleatorización blanda en los bucles 1 y 5

dentro del marco VEGF-CKP9, que resultó en 16 variantes únicas que se unen a VEGF-A humano (véase la **Tabla 22-24** a continuación).

5 **Tabla 22: Variantes maduras por afinidad de Bucle 1 de VEGF_CKP9 con respecto a VEGF-A**

10	VARIANTE	SECUENCIA L1	n	ELISA	S/N
	VEGF_CKP9	QLMQPFWG (SEQ ID NO: 10)		0.4	7.4
	VEGF_CKP9.L1.2	HLFEPLWG (SEQ ID NO: 245)	17	1.6	12.5
15	VEGF_CKP9.L1.7	QVMRPFWG (SEQ ID NO: 246)	3	1.5	8.9

20	VEGF_CKP9.L1.8	QVMQPAWG (SEQ ID NO: 247)	1	1.2	12.8
	VEGF_CKP9.L1.19	HRLQPLWG (SEQ ID NO: 248)	3	1.4	11.6
25	VEGF_CKP9.L1.26	ELLQPSWG (SEQ ID NO: 249)	4	1.7	11.9
30	VEGF_CKP9.L1.57	NPMLPFWG (SEQ ID NO: 33)	3	3.7	31.8
	VEGF_CKP9.L1.64	NVLLPLWG (SEQ ID NO: 250)	1	2.3	19.9
	VEGF_CKP9.L1.68	DIMQPLWG (SEQ ID NO: 26)	1	2.0	23.2

5

10

15

*S/N = relación entre señal y ruido en comparación con un testigo de BSA

20

Tabla 23: Variantes maduras por afinidad de Bucle 5 de VEGF_CKP9 con respecto a VEGF-A

25

30

VARIANTE	SECUENCIA L5	n	ELISA	S/N
VEGF_CKP9	HWYQS (SEQ ID NO: 17)		0.9	11.6
VEGF_CKP9.L5.7	RWYNS (SEQ ID NO: 133)	11	1.4	18.9
VEGF_CKP9.L5.18	HWYQS (SEQ ID NO: 17)	1	1.6	20.4
VEGF_CKP9.L5.43	RWYHS (SEQ ID NO: 43)	2	0.9	13.6

5

*S/N = relación entre señal y ruido en comparación con un testigo de BSA

10

15

Tabla 24: Variantes maduras por afinidad de Bucle1/Bucle 5 de VEGF_CKP9 con respecto a VEGF-A

20

VARIANTE	BUCLE 1	BUCLE 5	n	ELISA	S/N*
VEGF_CKP9	QLMQPFWG (SEQ ID NO: 10)	HWYQS (SEQ ID NO: 17)		0.4	7.4
VEGF_CKP9 .2	DVLQPFWG (SEQ ID NO: 28)	HWYQS (SEQ ID NO: 17)	20	2.4	31.1
VEGF_CKP9 .3	QISQPFWG (SEQ ID NO: 29)	HFYNS (SEQ ID NO: 41)	1	1.6	24.5
VEGF_CKP9 .4	DRMQPLWG (SEQ ID NO: 30)	LWYKS (SEQ ID NO: 42)		N/D	N/D

30

5

10

15

20

25

30

VEGF_CKP9 .9	QLLEPMWG (SEQ ID NO: 254)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	1	1.1	19.7
VEGF_CKP9 .14	KLLQPMWG (SEQ ID NO: 255)	RWYQS (SEQ ID NO: 44)	1	2.0	30.1
VEGF_CKP9 .11	DRMQPYWG (SEQ ID NO: 256)	QWYKS (SEQ ID NO: 262)	1	1.1	14.1
VEGF_CKP9 .20	NLMLPFWG (SEQ ID NO: 31)	RWYHS (SEQ ID NO: 43)	1	1.7	13.3
VEGF_CKP9 .22	QRTQPFWG (SEQ ID NO: 32)	RWYQS (SEQ ID NO: 44)	1	1.2	17.2
VEGF_CKP9 .47	KIMQPLWG (SEQ ID NO: 257)	LWYDS (SEQ ID NO: 263)	1	1.0	14.6

5

10

15

20

25

30

VEGF_CKP9 .54	NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33)	QYYQS (SEQ ID NO: 45)	1	2.1	28.4
VEGF_CKP9 .59	DPMQPFWG (SEQ ID NO: 34)	RWYQS (SEQ ID NO: 44)		N/D	N/D
VEGF_CKP9 .63	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	1	2.0	29.7
VEGF_CKP9 .69	ALLQPLWG (SEQ ID NO: 259)	RWYNS (SEQ ID NO: 133)	1	1.0	14.3
VEGF_CKP9 .71	QLLQPLWG (SEQ ID NO: 37)	RWYQS (SEQ ID NO: 44)	1	1.0	16.5
VEGF_CKP9 .72	RLLEPSWG (SEQ ID NO: 260)	QWYQS (SEQ ID NO: 264)	1	0.6	10.0
VEGF_CKP9	HLLLPLWG	RWYHS			

5

10

*S/N = relación entre señal y ruido en comparación con un testigo de BSA

Estos clones se seleccionaron para validación adicional en un ensayo de titulación en fago, y se generaron formas plegadas solubles correspondientes a diez de estas secuencias para evaluación *in vitro* adicional (véase la **Tabla 25** a continuación). De este conjunto de variantes, VEGF_CKP9.2, VEGF_CKP9.54 y VEGF_CKP9.63 exhibieron potencia mejorada con respecto VEGF-A en comparación con el VEGF-CKP9 original en ensayo *in vitro* y celulares, con CI_{50} en un rango 100 – 200 nM (véase la **Tabla 25**).

Tabla 25: Actividad inhibidora en ELISA de competición en fago y ELISA de interacción VEGF-A-KDR.

30

VARIANTE	ELISA de fago $CI_{50}(\mu M)$	Celular $CI_{50}(nM)$
VEGF_CKP9	1.36	11700
VEGF_CKP9.2	0.168	270
VEGF_CKP9.3	1.50	N/D
VEGF_CKP9.4	1.95	N/D
VEGF_CKP9.20	1.34	N/D
VEGF_CKP9.22	>100	N/D
VEGF_CKP9.54	0.45	188) .

5

10 Para mejorar la potencia, los investigadores seleccionaron las
moléculas 9.54 y 9.63 principales y generaron nuevas
bibliotecas de fagos basadas en estos marcos en las cuales se
asignó de forma aleatoria el bucle 2. Las nuevas bibliotecas
se barrieron con respecto a hVEGF-A y produjeron varias
15 variantes de bucle 2 que demostraron una potencia
significativamente mejorada con respecto a VEGF en comparación
con las moléculas 9.54 y 9.63 originales (véanse las **Tablas 26**
y **27** a continuación, respectivamente), exhibiendo las moléculas
más potentes una CI_{50} en un rango de 0.5 – 2 nM (véase la **Tabla**
20 **28** a continuación).

Tabla 26: Variantes de bucle 2 de unión a VEGF-A madurados
por afinidad basados en el marco 9.54

25	VARIANTE	BUCLE 1	BUCLE 2	BUCLE 5	n	ELIS A	S/N *
30	VEGF_CKP9	QLMQPFW G (SEQ ID NO: 10)	KQDSD (SEQ ID NO: 93)	HWYQS (SEQ ID NO: 17)			
	VEGF_CKP9 .54	NIMLPFW G (SEQ ID NO: 33)	KQDSD (SEQ ID NO: 93)	QYYQS (SEQ ID NO: 45)			
	VEGF_CKP9	NIMLPFW G	GQSFE (SEQ ID NO: 93)	QYYQS (SEQ ID NO: 45)	8	2.4	29.

5

10

15

20

25

30

VEGF_CKP9 .54.14	NIMLPFW G (SEQ ID NO: 33)	QADYA (SEQ ID NO: 299)	QYYQS (SEQ ID NO: 45)	1	2.5	23.5
VEGF_CKP9 .54.16	NIMLPFW G (SEQ ID NO: 33)	GVDYL (SEQ ID NO: 300)	QYYQS (SEQ ID NO: 45)	1	2.4	30.8
VEGF_CKP9 .54.31	NIMLPFW G (SEQ ID NO: 33)	GTNFL (SEQ ID NO: 301)	QYYQS (SEQ ID NO: 45)	1	2.3	32.5
VEGF_CKP9 .54.44	NIMLPFW G (SEQ ID NO: 33)	SRDFD (SEQ ID NO: 302)	QYYQS (SEQ ID NO: 45)	1	2.4	34.4

5

10

15

20

25

30

VEGF_CKP9 .54.56	NIMLPFW G (SEQ ID NO: 33)	GKDFH (SEQ ID NO: 305)	QYYQS (SEQ ID NO: 45)	1	2.3	35. 8
VEGF_CKP9 .54.59	NIMLPFW G (SEQ ID NO: 33)	GPDLQ (SEQ ID NO: 96)	QYYQS (SEQ ID NO: 45)	1	2.3	35. 4
VEGF_CKP9 .54.64	NIMLPFW G (SEQ ID NO: 33)	SGDFA (SEQ ID NO: 306)	QYYQS (SEQ ID NO: 45)	1	2.2	22. 4
VEGF_CKP9 .54.69	NIMLPFW G (SEQ ID NO: 33)	GKELN (SEQ ID NO: 307)	QYYQS (SEQ ID NO: 45)	1	2.5	21. 7
	NIMLPFW	GPSMD	QYYQS			

5

10

15

*S/N = relación entre señal y ruido en comparación con un
20 testigo de BSA

Tabla 27: Variantes de bucle 2 de unión a VEGF-A madurados por afinidad basados en el marco VEGF_CKP9.63

*S/N = relación entre señal y ruido en comparación con un
25 testigo de BSA

30

VARIANTE	BUCLE 1	BUCLE 2	BUCLE 5	EL IS A	S/N*
VEGF_CKP9	QLMQPFWG (SEQ ID NO: 10)	GRDLQ (SEQ ID NO: 322)	HWYQS (SEQ ID NO: 17)		
VEGF_CKP9 .63	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	GVDLS (SEQ ID NO: 323)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)		
	DVMQPYWG	GPDID	HWYNS		

5

10

15

20

25

30

VEGF_C KP9.63 .12	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	GMDIE (SEQ ID NO: 326)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	2.6	39 .9
VEGF_C KP9.63 .14	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	DGDYQ (SEQ ID NO: 327)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	1.5	21 .3
VEGF_C KP9.63 .15	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	GNDVS (SEQ ID NO: 328)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	1.5	21 .4
VEGF_C KP9.63 .16	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	GRDMD (SEQ ID NO: 119)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	2.2	10 .3
			HWYNS		

5

10

15

20

25

30

VEGF_CKP9. 63.27	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	DGDFD (SEQ ID NO: 331)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	2. 1	26. 0
VEGF_CKP9. 63.30	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	AGDFE (SEQ ID NO: 332)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	2. 0	26. 0
VEGF_CKP9. 63.37	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	EMDFD (SEQ ID NO: 120)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	0. 6	8.6
VEGF_CKP9. 63.39	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	GNSFE (SEQ ID NO: 333)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	1. 6	18. 9
VEGF_CKP9. 63.42	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	GQDLT (SEQ ID NO: 334)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	1. 7	23. 1

5

10

15

20

25

30

VEGF_CKP9. 63.54	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	GFDMD (SEQ ID NO: 338)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	1. 4	19. 9
VEGF_CKP9. 63.56	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	GESLS (SEQ ID NO: 211)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	1. 8	8.4
VEGF_CKP9. 63.62	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	DLNYE (SEQ ID NO: 339)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	1. 8	25. 4
VEGF_CKP9. 63.65	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	GRDLQ (SEQ ID NO: 322)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	2. 0	27. 1
VEGF_CKP9. 63.69	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	GVDLS (SEQ ID NO: 323)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	2. 9	23. 7

5

10

15

Tabla 28. Actividad inhibidora de las variantes VEGF_CKP9.54 y
20 VEGF_CKP9.63 derivadas del bucle 2 con respecto a VEGF-A

25

30

VARIANTE	BUCLE 1	BUCLE 2	BUCLE 5	KD R- VE GF CI 50 (n M)	Cel ula r CI5 0 (nM)
VEGF_CKP 9	QLMQPFWG (SEQ ID NO: 10)	KQDSD (SEQ ID NO: 93)	HWYQS (SEQ ID NO: 17)	56 9	117 00
VEGF_CKP 9.54	NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33)	KQDSD (SEQ ID NO: 93)	QYYQS (SEQ ID NO: 45)	5. 8	188)
	NIMLPFWG	GOSEE	QYYQS		

5

10

15

20

25

30

VEGF_CKP 9.54.59	NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33)	GPDLQ (SEQ ID NO: 96)	QYYQS (SEQ ID NO: 45)	0. 5	3.0 6
VEGF_CKP 9.54.90	NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33)	GRDFE (SEQ ID NO: 97)	QYYQS (SEQ ID NO: 45)	0. 2	1.3 5
VEGF_CKP 9.63	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	KQDSD (SEQ ID NO: 93)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	10 .8	140
VEGF_CKP 9.63.1	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	GENFL (SEQ ID NO: 117)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	0. 4	0.4 9
VEGF_CKP 9.63.27	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	GRDMD (SEQ ID NO: 119)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	0. 3	5.2 8
VEGF_CKP 9.63.44	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	EMDFD (SEQ ID NO: 120)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	0. 2	2.0 5

5

10

15

20

25

30

VEGF_CKP 9.63.27	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	GRDMD (SEQ ID NO: 119)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	0. 3	5.2 8
VEGF_CKP 9.63.44	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	EMDFD (SEQ ID NO: 120)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	0. 2	2.0 5
VEGF_CKP 9.63.69	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	GESLS (SEQ ID NO: 211)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	2. 1	26. 4
VEGF_CKP 9.63.12	DVMQPYWG (SEQ ID NO: 35)	GPDID (SEQ ID NO: 118)	HWYNS (SEQ ID NO: 46)	0. 7	1.8 3

Las afinidades / potencias de VEGF_CKP9.63.1, VEGF_CKP9.63.27, VEGF_CKP9.63.44, VEGF_CKP9.63.69 y VEGF_CKP9.63.12 por hVEGF-A (8-109) se muestran a continuación en la **Tabla 29**.

5 Tabla 29

VARIANTE	k_a	k_d	K_D
EM63	0.16 ± 0.03	1.6 ± 0.5	100 ± 9 nM
L2.9.63.1	6 ± 1	0.37 ± 0.13	5.8 ± 1.2
L2.9.63.12	8 ± 1	0.10 ± 0.04	1.1 ± 0.2
L2.9.63.27	11 ± 4	0.15 ± 0.04	1.4 ± 0.2
L2.9.63.44	10 ± 2	0.11 ± 0.02	1.2 ± 0.2
L2.9.63.69	3 ± 1	0.20 ± 0.04	6.9 ± 0.7

15

Las variantes VEGF_CKP9.54.90 (véase la fila 2 de la **Tabla 26**) y VEGF_CKP9.63.12 (véase la fila 6 de la **Tabla 27**), así como las variantes originales VEGF_CKP9.54 (véase la fila 12 de la **Tabla 24**) y VEGF_CKP9.63 (véase la fila 15 de la **Tabla 24**), se unen con afinidad similar a VEGF-A humano, de ratón y de rata, tal como se determinó mediante resonancia de plasmones superficiales. Véase la **Tabla 30** a continuación.

Tabla 30: Cinética y afinidades de unión de VEGF_CKP9.54.90, VEGF_CKP9.63.12, VEGF_CKP9.54 y VEGF_CKP9.63 para diversas isoformas de VEGF.

30

VARIANTE	Isoforma de VEGF	k_a	k_a (error)	k_d	k_d (error)	K_D (nM)	K_D (error)
9.54	8-109 humano	1.26×10^6	1.10×10^5	2.18×10^{-1}	1.19×10^{-2}	175.88	18.21
	165	8.23×10^5	1.11×10^5	1.49×10^{-1}	1.29×10^{-2}	189.6	34.57

5

10

15

20

25

30

20	9.54. 90	8-109 humano	5.15x 10 ⁷	1.62x1 0 ⁷	4.05x1 0 ⁻²	8.77x1 0 ⁻³	0.87	0.1 3
		165 humano	1.58x 10 ⁷	3.87x1 0 ⁶	1.33x1 0 ⁻²	1.70x1 0 ⁻³	0.89	0.1 0
		164 de ratón	8.71x 10 ⁶	2.79x1 0 ⁶	1.01x1 0 ⁻²	2.12x1 0 ⁻³	1.31	0.2 4
		rata	1.72x 10 ⁷	7.43x1 0 ⁶	1.35x1 0 ⁻²	3.33x1 0 ⁻³	0.90	0.1 4
		conejo	5.15x 10 ⁷	1.36x1 0 ⁷	6.75x1 0 ⁻²	8.99x1 0 ⁻³	1.14	0.1 8
30	9.63	8-109 humano	6.62x 10 ⁵	9.83x1 0 ⁴	1.81x1 0 ⁻¹	2.56x1 0 ⁻²	281. 44	43. 53
		165 humano	3.40x 10 ⁵	2.79x1 0 ⁴	1.30x1 0 ⁻¹	1.33x1 0 ⁻²	381. 89	19. 15
		164 de ratón	5.57x 10 ⁵	4.60x1 0 ⁴	1.60x1 0 ⁻¹	1.35x1 0 ⁻²	288. 75	11. 08
		rata	4.56x 10 ⁵	1.49 x10 ⁵	2.46x1 0 ⁻¹	9.23x1 0 ⁻²	523. 93	25. 06

5

10

15

VEGF_CKP9.54.90 también es altamente selectiva para VEGF-A y no se une ni inhibe la actividad de otras isoformas de VEGF tales como VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D ni de otros factores de crecimiento tales como P1GF, EGF, NGF, IGF y PDGF. Tal como se muestra en las **Figura 2A** y **2B**, la variante VEGF_CKP9.54.90 interrumpe la interacción entre VEGF-A y KDR así como también la interacción entre VEGF-A y Flt-1, pero no interrumpe la interacción entre VEGF-B y Flt-1, entre VEGF-C y Flt-4, entre VEGF-D y Flt-4, entre PIGF-2 y Flt-1, entre EGF y EGFR, entre PDGF y PDGFR, entre NGF y NGFR ni entre IGF e IGFR.

A diferencia de EETI-II, VEGF_CKP9.54.90, VEGF_CKP9.54 y VEGF_CKP9.63.12 no inhiben la actividad de tripsina proteasa tal como se mide mediante un ensayo de escisión de sustrato peptídico (Stanger et al. (2014) *FEBS Lett.* 588 (23), 4487-96). Véase la **Figura 3**. Sin embargo, VEGF_CKP9.54.90 y

VEGF_CKP9.63.12 mantienen un grado de resistencia a la digestión por tripsina (véase la **Figura 4**). Aproximadamente 20% de VEGF_CKP9.54.90 se escindió en Arg13 dentro del bucle 2 luego de 24 h de incubación con tripsina a 37 °C.

5 VEGF_CKP9.54, VEGF_CKP9.63 y VEGF_CKP9.54.90 contienen cada una aproximadamente una hélice alfa de 3 giros y adoptan cada una un distintivo de disulfuro que es diferente del de EETI-II natural (C1-C4, C2-C3, C5-C6 para VEGF_CKP9.54.90 con respecto a C1-C4, C2-C5, C3-C6 para EETI-II natural). Véase la **Figura**
10 **5**. En un lado de la hélice, VEGF_CKP9.54.90 forma una estructura bicíclica fusionada que está puenteada mediante dos enlaces disulfuro (C1-C4 y C2-C3) que abarcan los bucles 1, 2 y 3, y ~ 1,5 de giro de la hélice alfa. El bucle 5 se forma en el lado opuesto de la hélice y está limitado por el enlace disulfuro
15 C5-C6.

Se obtuvieron estructuras de cocrystal de VEGF_CKP9.54, VEGF_CKP9.63 y VEGF_CKP9.54.90 en complejo con VEGF-A. Las estructuras de cocrystal de VEGF_CKP9.54, VEGF_CKP9.63 y VEGF_CKP9.54.90 en complejo con VEGF-A eran en gran medida
20 similares. Véanse las **Figuras 5 y 6** para la estructura de cocrystal de VEGF_CKP9.54 en complejo con VEGF-A. Dado que las estructuras de VEGF_CKP9.54, VEGF_CKP9.63, y VEGF_CKP9.54.90 son similares en gran medida, (véanse las **Figuras 5 y 6**) se llevaron a cabo estudios adicionales con
25 VEGF_CKP9.54.90. La hélice definida por los residuos Phe15 - Tyr26 de VEGF_CKP9.54.90 forma interacciones hidrófobas y polares extensas con la superficie de VEGF (véase la **Tabla 31** a continuación). Además, existe una red de enlaces H del esqueleto que se forma dentro y estabiliza la hélice alfa de
30 ~3 giros. En general, VEGF_CKP9.54.90 exhibe una estructura compacta y rígida, estabilizada mediante contactos intramoleculares polares e hidrófobos, incluidas interacciones

esqueleto-esqueleto, cadena lateral-esqueleto y cadena lateral-cadena lateral (**Tabla 32**). La superficie de VEGF_CKP9.54.90 que hace contacto con VEGF-A es de naturaleza principalmente hidrófoba con pocas cadenas laterales polares (**Tabla 31**), mientras que la superficie opuesta del péptido que no interactúa con VEGF se expone al disolvente y es de naturaleza principalmente polar.

Tabla 31. Residuos de VEGF_CKP9.54.90 que están dentro de 4 Å del dímero de VEGF-A

Residuos de VEGF_CKP9.54.90 dentro de 4 Å de VEGFA	
VEGF_CKP9.54.90 (Cadena 1)	VEGF_CKP9.54.90 (Cadena 2)
I4	I4
M5	M5
L6	L6
P7	P7
F8	F8
W9	W9
R13	R13
D14	D14
F15	F15
L18	L18
A19	A19
V22	V22
C23	C23

5

10

15

Tabla 32: Resumen de las interacciones intramoleculares de VEGF_CKP9.54.90

20

25

30

Residuo 1	Residuo 2	Comentarios
Cys2	Cys21	Disulfuro
Asn3	Trp9	Enlace H de cadena principal
Asn3	Met5	Asp3 crea un enlace H con el nitrógeno de la cadena principal M5
Asn3	Leu6	Enlace H de cadena principal
Leu6	Trp9	Enlace H de cadena principal
Pro7	Gly10	Enlace H de cadena principal
Phe8	Cys11	Enlace H de cadena principal
Phe8	Leu18	Interacción de Van der Waals
Trp9	Ile4, Leu18, Val22, Tyr25, Tyr26	La Trp nuclear forma una red de interacciones de Van der Waals

5

10

15

20

25

30

Cys11	Cys17	Disulfuro
Gly12	Asp14	Enlace H de cadena principal
Asp14	Glu16, C17	Asp14 crea un enlace H estabilizador con el extremo N de la hélice
Phe15	Leu18, Ala19	Interacciones de Van der Waals estabilizadoras de hélice
Leu18	Val22	Interacciones de Van der Waals estabilizadoras de hélice
Val22	Tyr26	Interacciones de Van der Waals estabilizadoras de hélice
Phe15 - Tyr26		Red de enlaces H de esqueleto estabilizadora de una hélice de ~3 giros
Cys23	Cys29	Disulfuro

5

10

La interfaz de unión de VEGF_CKP9.54.90 en VEGF-A se superpone con la de los receptores naturales y el anticuerpo G6.31 (**Figuras 7 y 8**). Los residuos de contacto en VEGF-A que están en la interfaz peptídica se resumen en la **Tabla 33** y se muestran en la **Figura 9**. El epítipo de unión de VEGF_CKP9.54.90 en VEGF-A es distinto del de ranibizumab y bevacizumab (**Figura 10**), que no se unen a VEGF-A de ratón ni rata debido a su interacción con VEGF-A humano depende de un residuo clave Gly88 que está sustituido por Ser en roedores. El modo de unión de VEGF_CKP9.54.90 sugiere que no es sustancialmente dependiente de Gly88, y esta noción se valida mediante la observación de que el péptido se une eficazmente a VEGF-A humano y de roedor. Se utilizó mutagénesis dirigida al sitio para validar varios contactos en la interfaz proteína - péptido observados a partir de la estructura de cristal. Tal como se esperaba, las mutaciones Y21A, Q89A y F17A/M81A en VEGF-A condujeron a una unión reducida de VEGF_CKP9.54.90 en VEGF-A. Véase la **Figura 11**. Sin embargo, la mutación K48A potenció la unión de VEGF_CKP9.54.90 en ~ 2-3 veces, un comportamiento que es similar al observado con el anticuerpo G6.31 (Fuh et al. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 6625-6631). Véase la **Tabla 34** a

continuación y la **Figura 11.**

5

10

15

Tabla 33. Residuos de dímero de VEGF-A que están dentro de 4 Å de VEGF_CKP9.54.90

20

25

30

Residuos de VEGF-A dentro de 4 Å de VEGF_CKP9.54.90	
VEGF-A (Cadena dimérica A)	VEGF-A (Cadena dimérica B)
	V14
	V15
F17	F17
M18	M18
	D19
Y21	Y21
Q22	Q22
Y25	Y25
I46	I46
K48	K48
N62	N62
D63	D63

5

10

15

20 Tabla 34: Cinética y afinidades de unión de VEGF_CKP9.54.90, VEGF_CKP9.63.12, VEGF_CKP9.54 y VEGF_CKP9.63 para diversos mutantes de hVEGF-A.

25

30

VARIA NTE	MUTANTE DE VEGF	ka	ka (erro r)	kd	kd (erro r)	KD (nM)	KD (erro r)
9.54. 90	N	7.81x1 0 ⁷	1.86x 10 ⁷	0.030 0	9.79x 10 ⁻³	0.37	0.09
	Y21A	3.72x1 0 ⁷	1.30x 10 ⁷	0.120 2	2.44x 10 ⁻²	3.50	0.30
	K48A	6.04x1 0 ⁷	2.12x 10 ⁷	0.011 6	3.77x 10 ⁻³	0.19	0.02
	Q89A	1.71x1 0 ⁷	8.38x 10 ⁶	0.145 8	5.99x 10 ⁻²	8.80	0.45
	F17A/M8 1A						

5

10

15

20

25

30

9.63 .12	N	8.43 x10 ⁶	1.47x1 0 ⁶	0.009 6	0.0035	1.07	0.20
	Y21A	1.99 x10 ⁷	6.84x1 0 ⁶	1.48x 10 ⁻¹	3.13x1 0 ⁻²	9.84	4.41
	K48A	5.30 x10 ⁷	3.77x1 0 ⁷	0.017	0.013	0.33	0.01
	Q89A	7.43 x10 ⁶	2.09x1 0 ⁶	0.47	2.71x1 0 ⁻¹	36.4 9	1.62
	F17A/M 81A						
9.54	N	4.10 x10 ⁶	8.59x1 0 ⁵	0.234 9	0.0778	55	7
	Y21A	6.63 x10 ⁵	6.39x1 0 ³	0.210 1	0.0389	317	56
	K48A	2.64 x10 ⁶	2.24x1 0 ⁵	0.058 7	0.0010	22	3
	Q89A	3.37 x10 ⁵	1.41x1 0 ⁵	0.793 0	0.5101	1882	460

5

10

15

A continuación, se evaluaron las variantes de unión a VEGF-A
20 VEGF_CKP9.54.90, VEGF_CKP9.63.12, y VEGF_CKP9.63.44 para
determinar su eficacia *in vivo* en un modelo de
neovascularización coroidea impulsada por VEGF-A. Se crearon
puntos quemados por láser en ojos de ratas y se monitoreó la
formación de nuevos vasos sanguíneos después de un período de
25 14 días en presencia o ausencia de péptido que se administró
por vía intravítrea en diferentes intervalos. El péptido
VEGF_CKP9.54.90 demostró inhibición eficaz de la
neovascularización coridea inducida por láser en ojos de rata,
tal como se mide por la reducción significativa observada en
30 el área neovascular en los ojos tratados con péptido en
comparación con los ojos testigo. Véase la **Figura 12**.
La estructura de cocrystal de VEGF_CKP9.54.90 en complejo con

VEGF-A reveló que los residuos de aminoácidos natural en los bucles 3 y 4 no están necesariamente en sentidos óptimos para la unión a VEGF-A (véase la **Figura 9**) y podrían modificarse para potenciar su interacción con la superficie de VEGF-A o para dar lugar a interacciones intramoleculares dentro del péptido que podrían mejorar el plegado y estabilidad del péptido. Por lo tanto, con el objetivo de mejorar adicionalmente la potencia y el comportamiento de las moléculas principales, se construyeron nuevas bibliotecas de fagos basadas en las secuencias de 9.54, 54.1 y 9.63, 63.12 en las cuales solo los bucles 3 y 4 se asignaron de forma aleatoria. Estos marcos específicos, aunque eran ligeramente más débiles que las moléculas principales, se seleccionaron a efectos de permitir un rango dinámico en el ensayo suficiente para detectar una mejora en la afinidad. Se identificaron muchos clones nuevos que contenían variaciones solo en los bucles 3 y 4 que exhibieron unión mejorada a VEGF-A. Se seleccionaron catorce de las secuencias obtenidas y se injertaron en los bucles 3 y 4 dentro de las moléculas principales VEGF_CKP9.54.90 o VEGF_CKP9.63.12 y las moléculas solubles correspondientes a continuación se generaron en forma plegada. La secuencias de aminoácidos de las catorce variantes maduradas por afinidad se proporcionan en la **Tabla 35** a continuación.

Tabla 35: Variantes de bucle 3/bucle 4 de unión a VEGF-A

VARIANT E	BUCLE 1	BUCLE 2	BUCLE 3	BUCLE 4	BUCLE 5
9.54.90.7	NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33)	GRDFE (SEQ ID NO: 97)	LQQ	I	QYYQS (SEQ ID NO: 45)
9.54.90	NIMLPFWG	GRDFE			QYYQS

5

10

15

20

25

30

9.54.90 .31	NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33)	GRDFE (SEQ ID NO: 97)	VYQ	I	QYYQS (SEQ ID NO: 45)
9.54.90.44	NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33)	GRDFE (SEQ ID NO: 97)	FIN	I	QYYQS (SEQ ID NO: 45)
9.54.90.53	NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33)	GRDFE (SEQ ID NO: 97)	FSQ	I	QYYQS (SEQ ID NO: 45)
9.54.90.55	NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33)	GRDFE (SEQ ID NO: 97)	VTE	I	QYYQS (SEQ ID NO: 45)
9.54.90.62	NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33)	GRDFE (SEQ ID NO: 97)	FYE	I	QYYQS (SEQ ID NO: 45)
9.54.90.67	NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33)	GRDFE (SEQ ID NO: 97)	MEQ	I	QYYQS (SEQ ID NO: 45)
9.54.90 .71	NIMLPFWG (SEQ ID NO: 33)	GRDFE (SEQ ID NO: 97)	VYR	I	QYYQS (SEQ ID

5

10

15

Todas las moléculas solubles que contenían variaciones en L3/L4 exhibieron potencia mejorada en el ensayo celular con respecto a 54.90 o 63.12.12. Tres moléculas principales, VEGF_CKP9.54.90.67, VEGF_CKP9.54.90.53 y VEGF_CKP9.63.12.12 tuvieron valores de CI_{50} celular en el rango de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 1 nM . Véase la **Figura 13** y la **Tabla 36** a continuación.

20

Tabla 36: Valores de CI_{50} para las variantes en la Tabla 35

25

30

VARIANTE	Celular CI_{50} (nM)	MEJORA EN VECES CON RESPECTO A LA VARIANTE 9.54.90
9.54.90	1.35	1
9.54.90.12	1.20	1.125
9.54.90.13	0.96	1.41
9.54.90.25	1.26	1.07
9.54.90.44	1.16	1.16
9.54.90.62	0.92	1.47

5

10

La estructura de cocrystal de VEGF_CKP9.63 en complejo con VEGF-A reveló que el residuo Tyr en la posición 8 dentro del bucle 1 podría formar un enlace hidrógeno con la cadena lateral de Gln22 en VEGF-A. Véase la **Figura 14**. En las variantes derivadas de VEGF_CKP9.54 (tales como las variantes en la **Tabla 35**) el aminoácido en la posición 8 es Phe. Por lo tanto, los investigadores buscaron mutar el Phe8 en Tyr I en algunas variantes en la **Tabla 35**, con el fin de mejorar la afinidad y/o solubilidad de la variante de F8Y resultante. La mutación F8Y exhibió una mejora modesta en la afinidad / potencia de algunas moléculas (por ejemplo, VEGF_CKP9.54.1.F8Y, VEGF_CKP9.54.90.F8Y y VEGF_CKP9.54.90.67.F8Y), mientras que en unos pocos casos diferentes demostró un efecto mínimo o ligeramente negativo (por ejemplo, VEGF_CKP9.54.90.13.F8Y y VEGF_CKP9.54.90.62.F8Y). Véase la **Tabla 37**, donde se comparan las afinidades de unión de determinadas variantes (tales como se determinaron mediante resonancia de plasmones superficiales) y la **Tabla 38** en la que se comparan las potencias de determinadas variantes (tales como se determinaron mediante CI₅₀ celular). La sustitución F8Y ayudó a mejorar la solubilidad de VEGF_CKP9.54.90.67.F8Y en aproximadamente 2 mg/ml. Se seleccionó VEGF_CKP9.54.90.67.F8Y para estudios de seguimiento

adicionales.

5

10

15 Tabla 37: Cinética y afinidades de unión de VEGF_CKP9.54.1.F8Y, VEGF_CKP9.54.90.F8Y, VEGF_CKP9.54.90.67.F8Y, VEGF_CKP9.54.90.13.F8Y y VEGF_CKP9.54.90.62.F8Y por VEGF-A

20

25

30

VARIANTE	k_a	k_d	K_D
VEGF_CKP9	1.2 ± 0.3	40 ± 20	$5 \pm 1 \mu M$
VEGF_CKP9.54	3.4 ± 0.2	2.3 ± 0.8	$44 \pm 6 \text{ nM}$
VEGF_CKP9.54.1	15 ± 2	0.36 ± 0.17	$2.2 \pm 0.7 \text{ nM}$
VEGF_CKP9.54.1.F8Y	53 ± 12	0.38 ± 0.06	$0.78 \pm 0.11 \text{ nM}$
VEGF_CKP9.54.90	63 ± 16	0.17 ± 0.05	$0.40 \pm 0.08 \text{ nM}$
VEGF_CKP9.54.90.F8Y	70 ± 10	0.27 ± 0.01	$0.40 \pm 0.05 \text{ nM}$
VEGF_CKP9.54.90-Alkyn	50 ± 0.3	0.27 ± 0.004	$0.49 \pm 0.05 \text{ nM}$

La estabilidad oxidativa de diversas variantes de CKP se evaluó de la siguiente forma: se agregaron 5µL de 11mM AAPH (Calbiochem No. de catálogo 100110) en agua para 50uL de muestra de péptido variante (preparada como 1mg/mL de péptido en 20mM de acetato de histidina pH 5.5) y la mezcla se incubó durante 16 horas a 40°C. Al finalizar la incubación, la muestra se aplacó mediante la adición de 27.5uL de 40mM metionina, posteriormente mediante la adición de 160uL de 20mM acetato de histidina, 100mM de sacarosa a pH 5,5 para diluir las muestras. Las reacciones se analizaron mediante LC-MS.

Se observó que VEGF_CKP9.54.90 sufrió ~ 30% de oxidación en Met5 dentro del bucle 1. El reemplazo de Met 5 con el aminoácido no natural norleucina volvió a VEGF_CKP9.54.90 completamente resistente a la oxidación. El reemplazo de Met5 con norleucina también tuvo un efecto favorable sobre la eficacia de unión (mejora de ~ 2 veces). Se produjeron las variantes VEGF_CKP9.54.90.67 F8Y M5Nle, VEGF_CKP9.54.90.53 M5Nle y VEGF_CKP9.63.12.12 M5Nle. Las tres Met5Nle de las variantes Met5Nle exhibieron una mejora modesta en la potencia celular en ~ 1.5 - 2 x en comparación con sus moléculas originales.

A continuación, se evaluó el efecto de las sustituciones de aminoácidos basadas naftaleno en Trp9 en el bucle 1 de VEGF_CKP9.54.90 sobre la afinidad de unión a VEGF-A. Las estructuras de cristal de VEGF_CKP9.54.90 que forman complejos con VEGF indican que el residuo Trp9 de VEGF_CKP9.54.90 (y las variantes derivadas del mismo) interactúa con la superficie de VEGF-A, con espacio residual que podría permitir que se ajustaran sistemas de anillos más grandes. Para evaluar esta hipótesis, generamos variantes solubles de VEGF_CKP9.54.90 en las que el anillo de indol de Trp9 se reemplazó con isómeros

de 1 o 2-naftilo. Estas moléculas exhibieron una potencia celular reducida con respecto a la VEGF_CKP9.54.90 original. Se proporcionan datos adicionales sobre la potencia de las variantes derivadas de VEGF_CKP9.54.90 que comprenden la sustitución F8Y y/o una sustitución de aminoácido no natural en la **Tabla 38**:

Tabla 38: Valores de CI_{50} para variantes derivadas de VEGF_CKP9.54.90 que comprenden la sustitución F8Y y/o una sustitución de aminoácido no natural.

VARIANTE	Celular CI_{50} (nM)	MEJORA EN VECES CON RESPECTO A LA VARIANTE 9.54.90
9.54.90	1.35	1
9.54.90.F8Y	1.58	0.85
9.54.90.F7Y. $\Delta 2G$	3.01	0.44
9.54.90.M5.Nl e	1.95	0.69
9.54.90.Naph1	5.42	0.24
9.54.90.Naph2	17.1	0.08
9.54.90.13	0.96	1.41
9.54.90.13.F8 Y	2.02	0.67
9.54.90.62	0.92	1.47
9.54.90.62.F8 Y	1.14	1.18
9.54.90.67	1.1	1.23
9.54.90.67.F8 Y	0.66	2.05

5 Acortamiento de VEGF_CKP9.54.90 principal. El F8Y al recortar los dos residuos glicina en los extremos N y C para generar la variante VEGF_CKP9.54.90 F7Y Δ 2G) resultó en una ligera reducción de la potencia celular con respecto a VEGF_CKP9.54.90. Véase la **Tabla 38** que figura más atrás.

10

Ejemplo 2B: Generación de variantes de EETI-II de origen no natural de unión a VEGF-A que comprenden extensiones de aminoácidos en el extremo C

Para identificar variantes de péptidos adicionales con afinidad
15 mejorada por VEGF-A, se seleccionaron las moléculas 9.54 (SEQ ID NO: 52), 9.54.1 (SEQ ID NO: 99) y se generaron nuevas bibliotecas de fagos basadas en estos marcos en los cuales se agregaron dos aminoácidos adicionales a sus extremos C.

De la biblioteca 9.54, se identificaron veintidós clones cuyas
20 señales de unión para hVEGF-A (8-109) eran más de 3 veces mayores que para BSA (fondo) (**Tabla 39**). Estos resultados contenían variaciones en la composición de aminoácido dentro del bucle 2, dentro de los bucles 2 y 4, o dentro de los bucles 2, 4 y 5.

25

30

5

10

Tabla 39: Variantes de extensión de dos residuos en el extremo C basadas en 9.54

15

20

25

30

IDENTIFICADOR DEL CLON	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SEQ ID NO
9.54	GCNIMLPFWGCKQSDCLAGCVCQYYQSCG	52
9.54-28	GCNIMLPFWGCKQDFDCLAGCICQYYQSCGFH	455
9.54-39	GCNIMLPFWGCKQDFDCLAGCICQYYQSCGGE	457
9.54-10	GCNIMLPFWGCKQSDCLVGCICQYYQSCGSI	458
9.54-32	GCNIMLPFWGCKQDFDCLAGCVCQYYQSCGGR	459
9.54-13	GCNIMLPFWGCKQDFDCLAGCVCQYYQSCGRP	460
9.54-6	GCNIMLPFWGCKQDFDCLAGCVCQYYQSCGQY	461
9.54-24	GCNIMLPFWGCKQSDCLAGCVCQYYQSCGEN	462
9.54-34	GCNIMLPFWGCKQDFDCLAGCVCQYYQSCGDT	463
9.54-9	GCNIMLPFWGCKQDFDCLAGCVCQYYQSCGQH	464
9.54-12	GCNIMLPFWGCKQSDCLAGCICQYYQSCGQN	465
9.54-17	GCNIMLPFWGCKQSDCLAGCVCQYYQSCGEE	466
9.54-19	GCNIMLPFWGCKQSDCLAGCVCQYYQSCGDD	467
9.54-43	GCNIMLPFWGCKQSDCLAGCVCQYYQSCGDG	468
9.54-5	GCNIMLPFWGCKQDFDCLAGCVCQYYQSCGLE	469
9.54-1	GCNIMLPFWGCKQSDCLAGCVCQYYQSCGTD	470
9.54-4	GCNIMLPFWGCKQSDCLAGCVCQYYQSCGSE	471
9.54-15	GCNIMLPFWGCKQSDCLAGCVCQYYQSCGPE	472
9.54-42	GCNIMLPFWGCKQSDCLAGCVCQYYQSCGTN	473
9.54-27	GCNIMLPFWGCKQSDCLAGCVCQYYQSCGPH	474

5

- 10 De la biblioteca 9.54.1, se identificaron los clones cuyas señales de unión para hVEGF-A (8-109) eran más de 3 veces mayores que para BSA (fondo) (**Tabla 40**).

15 Tabla 40: Variantes de extensión de dos residuos en el extremo C basadas en 9.54.1

IDENTIFICADOR DEL CLON	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SEQ ID NO
9.54.1	GCNIMLPFWGCGQSFECLAGCVCQYYQSCG	99
9.54.1-2	GCNIMLPFWGCGQSFECLAGCICQYYQSCGIA	477
9.54.1-63	GCNIMLPFWGCGQSFECLAGCICQYYQSCGGS	478
9.54.1-36	GCNIMLPFWGCGQSFECLAGCICQYYQSCGTR	479
9.54.1-42	GCNIMLPFWGCGQSFECLAGCICQYYQSCGLS	533
9.54.1-90	GCNIMLPFWGCGQSFECLAGCICQYYQSCGVH	480

El clon 9.54-28 (en la **Tabla 39**) mostró una afinidad de unión mejorada de aproximadamente 10 veces por hVEGF-A(8-109) en comparación con 9.54, tal como se determinó mediante ELISA de competición de fagos (descrita anteriormente). (Ver la **Figura 15**). Los clones 9.54.1-2, 9.54.1-36, 9.54.1-42, 9.54.1-63

y 9.54.1-90 (en la **Tabla 40**) también mostraron una afinidad de unión mejorada de aproximadamente 10 veces por hVEGF-A(8-109) en comparación con 9.54.1, como se determinó mediante ELISA de competición de fagos. (Ver la **Figura 15**).

- 5 Se seleccionaron los péptidos 9.63 (SEQ ID NO: 55) y 9.63.44 (SEQ ID NO: 125) para su modificación adicional tal como se describió anteriormente. Se generaron nuevas bibliotecas de fagos basadas en estos marcos en los cuales se agregaron dos aminoácidos adicionales a sus extremos C.
- 10 De la biblioteca 9.63, se identificaron 28 clones cuyas señales de unión para hVEGF-A (8-109) eran más de 3 veces mayores que para BSA (fondo) (**Tabla 41**). Estos resultados contenían variaciones en la composición de aminoácido dentro de los bucles 2 y 4.

15

Tabla 41: Variantes de extensión de dos residuos en el extremo C basadas en 9.63

20

25

30

IDENTIFICADOR DEL CLON	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SEQ ID NO
9.63	GCDVMQPYWGCKQDSDCLAGCVCHWYNSCG	55
9.63-1	GCDVMQPYWGCKQDFDCLAGCVCHWYNSCGPS	481
9.63-4	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGFS	482
9.63-7	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGGK	483
9.63-10	GCDVMQPYWGCKQDFDCLAGCICHWYNSCGYL	484
9.63-16	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGDL	485
9.63-17	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGEK	486
9.63-19	GCDVMQPYWGCKQDSDCLAGCICHWYNSCGTD	487
9.63-20	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGQV	488
9.63-21	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGRL	489
9.63-22	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGYA	490
9.63-23	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGAS	491
9.63-25	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGSR	492
9.63-30	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGPT	493
9.63-36	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGSL	456

5

10

15

9.63-67	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYN SCGGI	500
9.63-68	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYN SCGVE	501
9.63-70	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYN SCGPL	503
9.63-72	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAG CI CHWYN SCGTS	527
9.63-74	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAG CI CHWYN SCGRP	504
9.63-77	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYN SCGND	505
9.63-79	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAG CI CHWYN SCGLQ	506
9.63-93	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAG CI CHWYN SCGDE	507

20

De la biblioteca 9.63.44, se identificaron 17 clones cuyas señales de unión para hVEGF-A (8-109) eran más de 3 veces mayores que para BSA (fondo) (**Tabla 42**). Estos resultados contenían una variación en la composición de aminoácido dentro del bucle 4. El clon 9.63.44-55 contenía una variación en la composición de aminoácido dentro del bucle 2 y el clon 9.63.44-10 contenía una variación en la composición de aminoácido dentro del bucle 3. Es interesante que el clon 9.63.44-12 en la **Tabla 42** y el clon 9.63-70 en la Tabla 41 tienen la misma secuencia de aminoácidos.

30

Tabla 42: Variantes de extensión de dos residuos en el extremo

C basadas en 9.63.44

5

10

15

20

25

30

IDENTIFICADOR DEL CLON	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SEQ ID NO
9.63.44	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCG	125
9.63.44-2-A	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGRT	508
9.63.44-55	GCDVMQPYWGCEIDFDCLAGCVCHWYNSCGQV	509
9.63.44-10-A	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGGI	510
9.63.44-54	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGYM	511
9.63.44-19	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGGQ	512
9.63.44-44	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGTP	513
9.63.44-14	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGVN	514
9.63.44-73	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGFN	515
9.63.44-16	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGEP	516
9.63.44-80	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGNS	517
9.63.44-41	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGST	518
9.63.44-82	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGRY	519
9.63.44-1	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGFS	520
9.63.44-2	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGQV	521
9.63.44-3	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGYA	522
9.63.44-4	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGSR	523
9.63.44-5	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGPT	524
9.63.44-6	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGSM	525
9.63.44-7	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGGI	526
9.63.44-8	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGTS	527
9.63.44-9	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGLQ	528
9.63.44-10	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGPE	529

5

10

Los clones 9.63.44-1 a 9.63.44-14 (en la **Tabla 42**) mostraron una afinidad de unión mejorada por hVEGF-A(8-109) en comparación con 9.63.44, como se determinó mediante ELISA de
15 competición de fagos. (Véanse las **Figuras 16A y 16B**).

Tomados juntos, los resultados anteriores indican que extender los péptidos principales 9.54 (SEQ ID NO: 52), 9.54.1 (SEQ ID NO: 99), 9.63 (SEQ ID NO: 55) y 9.63.44 al agregar dos aminoácidos en sus extremos C produjo variantes que tenían una
20 afinidad de unión ~10 veces mayor por hVEGF-A (8-109).

A continuación, se seleccionaron los péptidos 9.54.90 (SEQ ID NO: 102) y 63.12.12.M5L (SEQ ID NO: 386) para su modificación adicional tal como se describió anteriormente. Brevemente, se generaron nuevas bibliotecas de fagos basadas en 9.54.90 donde
25 se agregaron dos aminoácidos adicionales, tres aminoácidos adicionales o cuatro aminoácidos adicionales en el extremo C. Se generó un segundo conjunto de bibliotecas basadas en 63.12.12.M5L donde se agregaron dos aminoácidos adicionales en el extremo C.

30 De las bibliotecas 9.54.90 que comprenden extensiones en el extremo C de 2 aminoácidos, se identificaron 6 clones cuyas señales de unión para hVEGF-A (8-109) eran más de 3 veces

mayores que para BSA (fondo) (**Tabla 43**).

5

10

Tabla 43: Variantes de extensión de dos residuos en el extremo C basadas en 9.54.90

15

IDENTIFICADOR DEL CLON	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SEQ ID NO
9.54.90	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG	102
9.54.90-2x28	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGFH	379
9.54.90-2x2	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGIA	380
9.54.90-2x63	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGGS	381
9.54.90-2x36	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGTR	382
9.54.90-2x90	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGVH	383
9.54.90-2x42	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGLS	384

20

25

De las bibliotecas 9.54.90 que comprenden extensiones en el extremo C de 3 aminoácidos, se identificaron 10 clones cuyas señales de unión para hVEGF-A (8-109) eran más de 3 veces mayores que para BSA (fondo) (**Tabla 44**).

30

5

10 Tabla 44: Variantes de extensión de tres residuos en el extremo C basadas en 9.54.90

15

20

25

IDENTIFICADOR DEL CLON	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SE Q ID NO
9.54.90	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG	102
9.54.90-3X83	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGPLI	369
9.54.90-3X50	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGNYQ	370
9.54.90-3x49	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGPLQ	371
9.54.90-3x10	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGTFQ	372
	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGD	37

30

Todos los péptidos de las bibliotecas 9.54.90 que comprenden extensiones en el extremo C de 4 aminoácidos, contienen extensiones en el extremo C de 3 aminoácidos.

De las bibliotecas 63.12.12.M5L que comprenden extensiones en el extremo C de 2 aminoácidos, se identificaron 9 clones cuyas

señales de unión para hVEGF-A (8-109) eran más de 3 veces mayores que para BSA (fondo) (**Tabla 45**).

5

10 Tabla 45: Variantes de extensión de dos residuos en el extremo C basadas en 63.12.12.M5L

15

20

25

IDENTIFICADOR DEL CLON	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SEQ ID NO
63.12.12.M5L	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICHWYNSCG	386
63.12.12.M5L.2x2	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICHWYNSCGRT	387
63.12.12.M5L.2x77	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICHWYNSCGWK	388
63.12.12.M5L.2x48	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICHWYNSCGPL	389
63.12.12.M5L.2x25	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICHWYNSCGDE	390
63.12.12.M5L.2x69	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICHWYNSCGQF	391
63.12.12.M5L.2x12	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICHWYNSCGEQ	392
63.12.12.M5L.2x30	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICHWYNSCGPT	393
63.12.12.M5L.2x21	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICHWYNSCGRL	394
63.12.12.M5L.2x29	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNICHWYNSCGSL	395

30

Ejemplo 2C: Caracterización de variantes de EETI-II de origen no natural de unión a VEGF-A que comprenden extensiones de aminoácidos en el extremo C

Las variantes proporcionadas en las **Tablas 43-45** anteriores se evaluaron mediante ELISA de competición de fagos, tal como se

describió anteriormente, para identificar variantes con mayor afinidad de unión por hVEGF (8-109).

Los clones (por ejemplo, tales como los proporcionados en las **Tablas 39-45**) que mostraron mayor afinidad por hVEGFA (8-109),

5 inclusive, por ejemplo, 9.54.1-2, 9.54.1-36, 9.54.1-42, 9.54.1-63 y 9.54.1-90, y 9.63.44-1 - 9.63.44-14, se seleccionaron entonces para su evaluación adicional *in vitro*, tal como la actividad inhibidora en ELISA de competición de fagos y ELISA de interacción VEGF-KDR, tal como se describió
10 anteriormente.

Los clones se analizaron por medio de resonancia de plasmones superficiales para determinar sus afinidades por diversas isoformas de VEGF, inclusive hVEGF-A (8-109), hVEGF-A 165, VEGF-A 164 de ratón, VEGF-A de rata y VEGF-A de conejo.

15 Se llevaron a cabo análisis adicionales para evaluar la especificidad de los clones por VEGF-A. Por ejemplo, se llevaron a cabo ELISA de competición, tal como se describió anteriormente, con VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGf-2, NGF, EGF, PDGF- β o IGF-1.

20 Los clones también se evaluaron para verificar sus capacidades de inhibir la actividad de tripsina proteasa, tal como se mide mediante ensayo de escisión de sustrato de péptido (Stanger et ál. (2014) *FEBS Lett.* 588 (23), 4487-96).

Se determinaron la cinética y afinidades de unión de los clones
25 para los diversos mutantes de hVEGF, inclusive, por ejemplo, Y21A, K48A, Q89A y F17A/M81A, tal como se describió anteriormente.

A continuación, se evaluaron los clones para verificar su eficacia *in vivo* en un modelo impulsado por VEGF-A de
30 neovascularización coroidea, tal como se describió anteriormente.

La estabilidad oxidativa de las variantes se evaluó tal como

se describió anteriormente.

Ejemplo 3: Generación de variantes de EETI-II de origen natural que se unen a LRP6

5 Las bibliotecas de EETI-II sin modificación descritas en el Ejemplo 2A se ciclaron a través de pasadas de selección con respecto a la proteína E1E2 de LRP6. Se identificaron veintidós clones únicos que se unen a E1E2 de LRP6 (**Tabla 46**). Estas coincidencias iniciales contenían variaciones en el contenido
10 de aminoácidos dentro de los bucles 1 y 5. En diversas variantes, el bucle 1 exhibió una longitud mayor en comparación con la del marco EETI-II natural. De forma destacable, las nuevas secuencias participantes que se unían a LRP6 contenían un motivo consenso en el bucle 1 (**NXI**) que es similar a un
15 motivo (NAI) presente dentro de las moléculas Dkk1 naturales que son ligandos de LRP6 endógenos. Las nuevas variantes participantes recapitulan un motivo que está presente en ligandos naturales.

20

25

30

5

10 Tabla 46: Agentes de unión basados en EETI-II contra E1E2 de
IPD6

	VARIANTE	BUCLE 1	BUCLE 5	ELISA	S/N*
15	LRP6_C KP1	RTNRVKGG (SEQ ID NO: 147)	GPNGF (SEQ ID NO: 19)	3.23	45.49
20	LRP6_C KP2	VNRVRG (SEQ ID NO: 148)	SGGRD (SEQ ID NO: 169)	3.41	41.62
25	LRP6_C KP3	MNHVKARR (SEQ ID NO: 149)	GPNGF (SEQ ID NO: 19)	2.93	40.18
30	LRP6_C KP4	RSVNKI (SEQ ID NO: 150)	GSSRN (SEQ ID NO: 170)	2.82	25.39
	LRP6_C KP5	VNKIKG (SEQ ID NO: 151)	GVEGR (SEQ ID NO: 171)	3.04	35.71
	LRP6_C	RNSIKR (SEQ ID	SVGHG (SEQ	3.10	37.36

5

10

15

20

25

30

LRP6_C KP7	VSNRVNKG (SEQ ID NO: 153)	GPNGF (SEQ ID NO: 19)	3.30	28.96
LRP6_C KP8	RGNIIK (SEQ ID NO: 154)	NESRG (SEQ ID NO: 173)	3.23	37.56
LRP6_C KP9	RSGNTIRKRE (SEQ ID NO: 155)	GGPGG (SEQ ID NO: 174)	2.97	37.62
LRP6_C KP10	ASSNSIRQGW (SEQ ID NO: 156)	GPKSN (SEQ ID NO: 175)	3.29	37.38
LRP6_C KP11	RSNRIR (SEQ ID NO: 157)	YGHGD (SEQ ID NO: 176)	2.65	36.76
LRP6_C KP12	RSNKLREARG (SEQ ID NO: 158)	GSRQD (SEQ ID NO: 177)	0.60	6.78
LRP6_C KP13	VNSVKR (SEQ ID NO: 159)	SRGVN (SEQ ID NO: 178)	3.28	37.75

5

10

15

20

25

30

LRP6_ CKP14	GSNKIRPR (SEQ ID NO: 160)	GPNDF (SEQ ID NO: 179)	3.18	43.53
LRP6_ CKP15	NRIRNS (SEQ ID NO: 161)	GRGDY (SEQ ID NO: 180)	2.03	26.31
LRP6_ CKP16	SRNSIK (SEQ ID NO: 162)	ASGSS (SEQ ID NO: 181)	3.36	31.11
LRP6_ CKP17	SNYVKR (SEQ ID NO: 163)	SPGGR (SEQ ID NO: 182)	3.09	35.88
LRP6_ CKP18	RANRVSGR (SEQ ID NO: 164)	GPNGF (SEQ ID NO: 19)	1.67	18.32
LRP6_ CKP19	SNRVKVRA (SEQ ID NO: 165)	GPNGF (SEQ ID NO: 19)	3.27	41.96
LRP6_ CKP20	ENRTKG (SEQ ID NO: 166)	GFRGT (SEQ ID NO: 20)	3.10	38.69

5

10

LRP6_ CKP21	GNKIRA (SEQ ID NO: 167)	RDRVG (SEQ ID NO: 184)	2.80	33.69
LRP6_ CKP22	ANRVKRTS (SEQ ID NO: 168)	GPNGF (SEQ ID NO: 19)	3.43	42.86

20

*S/N = relación entre señal y ruido en comparación con un testigo de BSA

El dominio extracelular de LRP6 consiste en cuatro dominios
 25 impulsores (E1-E4) que interactúan con receptores Frizzled y
 proteínas Wnt para propagar la señalización de Wnt. Utilizando
 un abordaje modular, LRP6 distingue entre señalización de Wnt1
 o Wnt3a a través de unión selectiva de sus dominios E1-E2 o
 E3-E4 a isoformas de Wnt específicas, respectivamente (Hannoush
 30 et al. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 9172-9179). Para delinear
 farmacológicamente los brazos de señalización de Wnt1 y Wnt3a,
 los investigadores buscaron identificar ligandos que se unen

selectivamente a E1-E2 de LRP6.

De las secuencias identificadas, los investigadores generaron R1, LRP6_CKP6 y LRP6_CKP19 en forma soluble plegada a efectos de evaluar su actividad farmacológica contra la señalización de Wnt1 o Wnt3a. Tal como se muestra en las **Tablas 47 y 48** a continuación, no se observó selectividad significativa en R77 hacia Wnt1 o Wnt3a en un ensayo de reportero de señalización basado en células. Por otro lado, R1 y R19 exhibieron inhibición selectiva hacia señalización de Wnt1 con respecto a Wnt3a (160 veces y 11 veces para Wnt1 con respecto a Wnt3a, respectivamente) tal como se mide en un ensayo de reportero de luciferasa, respaldando la noción de estas variantes no están orientadas hacia los dominios E3-E4 de LRP6 ($CI_{50} > 44 \mu M$). En conjunto, los datos destacan la especificidad de las nuevas variantes participantes y su efecto en la imitación de un motivo que está presente en ligandos naturales. De forma más importante, las variantes identificadas proporcionan un medio farmacológico para interrogar la señalización de Wnt1 y Wnt3.

Tabla 47: Actividad inhibidora de variantes de CKP de unión a LRP6 contra la señalización de Wnt1

Lrp6-CKP (n=4)	Mejor ajuste de CI_{50} (nM) para Wnt1 (5ng/pocillo)	Intervalo de confianza del 95% (nM)
R1 F1	241.7	185.8 a 314.5
R1 F2	193.8	140.1 a 268.2
LRP6_CKP6 F1	22.866	13.593 a 38.463
LRP6_CKP6 F2	23.760	14.458 a 39.046
LRP6_CKP6 F3	4.625	3.037 a 7.044
LRP6_CKP19 F1	23.132	15.397 a 34.754
LRP6_CKP19 F2	49.330	31.391 a 77.520

5

10 Tabla 48: Actividad inhibidora de variantes de CKP de unión a LRP6 contra la señalización de Wnt3a

15	Lrp6-CKP (n=4)	Mejor ajuste de CI_{50} (nM) para Wnt3a (25ng/pocillo)	Intervalo de confianza del 95% (nM)
	R1 F1	38.594	16.093 a 92.554
	R1 F2	16.596	9.037 a 30.478
	LRP6_CKP6 F1	350.240	11840 a 1.036×10^7
	LRP6_CKP6 F2	275.584	24,695 a 3.075×10^6
	LRP6_CKP6 F3	Sin cobertura	Sin cobertura
20	LRP6_CKP19 F1	59.287	32.600 a 107.823
	LRP6_CKP19 F2	69.827	26.179 a 186.252

25 F1, F2 y F3 en las **Tablas 47 y 48** hacen referencia a las fracciones pico 1, 2 y 3, respectivamente, que se obtuvieron durante la purificación de R1, LRP6_CKP6 y LRP6_CKP19.