

PROTEÍNAS DE FUSIÓN TERAPÉUTICAS

Información sobre el Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 31 de agosto de 2020, se denomina PAT058332_SL.txt y tiene un tamaño de 653.193 bytes.

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden capacidades tanto de unión a integrinas como de unión a fosfatidilserina. Las proteínas de fusión se pueden utilizar como agentes terapéuticos, en particular para la prevención o el tratamiento de trastornos inflamatorios agudos o crónicos y trastornos microvasculares y de órganos impulsados por el sistema inmunitario o la coagulación.

Discusión de Antecedentes

Las lesiones orgánicas inflamatorias agudas (AOI) son enfermedades históricamente desafiantes con una alta morbilidad, mortalidad y una importante necesidad médica insatisfecha. Las AOI típicas incluyen infarto de miocardio (MI) y accidente cerebrovascular que ocurren en 32,4 millones de pacientes en todo el mundo cada año. La Organización Mundial de la Salud considera a los pacientes con infarto de miocardio y accidente cerebrovascular previos como el grupo de mayor riesgo de sufrir más eventos coronarios y cerebrales, que se encuentran entre las principales causas de morbilidad en el mundo desarrollado. Otra AOI es la lesión renal aguda (AKI), que ocurre en aproximadamente 13,3 millones de personas por año. En los países de ingresos altos, la incidencia de AKI es de 3–5/1000 y se asocia con una alta mortalidad (14–46%) (Metha *et al.*, (2015) *Lancet*, 385(9987): 2616–43). Al igual que ocurre con el infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular, los supervivientes de AKI a menudo no se recuperan por completo y tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica o enfermedad renal en etapa terminal. Hasta la fecha, no existe ningún fármaco aprobado por la FDA para prevenir o tratar la AKI. El desarrollo de nuevos tratamientos para la AKI ha demostrado ser un desafío, sin resultados exitosos de ensayos clínicos hasta ahora. Es probable que esto se deba a la fisiopatología multifactorial y multifacética de la AKI que incluye disfunción microvascular inflamatoria y patomecanismos nefrotóxicos provocados por agresiones sépticas, isquémicas/de reperusión y/o nefrotóxicas. Estos impulsores pueden actuar de manera simultánea o consecutiva para causar

principalmente daño celular tubular pero también glomerular, pérdida de la reserva funcional renal y eventualmente insuficiencia renal.

Un denominador común de las AOI es el aumento de la muerte celular debido a la lesión tisular, el aumento de la generación de fragmentos celulares y micropartículas protrombóticas/proinflamatorias que pueden ingresar a la circulación y al tejido lesionado. Después de la infiltración tisular de neutrófilos para defenderse de la infección, los neutrófilos sufren apoptosis u otras formas de muerte celular en el tejido afectado. Los neutrófilos contienen sustancias nocivas, incluidas las enzimas proteolíticas y los patrones moleculares asociados al peligro (DAMP) que pueden promover el daño del tejido del huésped y propagar la inflamación. La captación eficiente de células moribundas desencadena eventos de señalización que conducen a la reprogramación de los macrófagos ($M\Phi$) hacia un fenotipo no inflamatorio, pro-resolutivo y la liberación de mediadores clave para la resolución y reparación exitosas del tejido afectado. Esta reprogramación se ha atribuido recientemente a una señalización metabólica que activa respuestas antiinflamatorias fagocíticas en macrófagos (Zhang *et al.*, (2019) *Cell Metabolism*, 29(2): 443–56). Esta eliminación de desechos o células envejecidas o moribundas de manera no inflamatoria se denomina "eferocitosis".

Sin embargo, en el caso de que la eferocitosis se retrase, las células necróticas pueden acumularse y causar, por ejemplo, respuestas inflamatorias que desencadenan citocinas proinflamatorias (TNF- α) o IL-10 inmunosupresora por parte de macrófagos (Greenlee-Wacker (2016) *Immunol. Reviews*, 273: 357–370). Además, si los restos celulares y las partículas no se eliminan de manera eficiente, pueden causar aglomeraciones y agregados celulares, como grupos de fragmentos de plaquetas y neutrófilos, microtrombos y/o liberación de patrones moleculares asociados al peligro (DAMPs) tales como ATP, ADN, histonas o HMGB1. Las consecuencias pueden incluir oclusión de la microvasculatura, disfunción e inflamación estéril pronunciada que da como resultado la progresión de la lesión tisular, insuficiencia orgánica primaria y secundaria o reparación inadecuada.

En la fase aguda de las AOI, las vías eferocitóticas parecen estar significativamente reguladas por disminución. La inflamación o la respuesta aguda a una lesión (señales mecánicas, hipoxia, estrés oxidativo, radiación, inflamación e infección) suprimen la eferocitosis o fagocitosis eficaz mediante la regulación por disminución de las proteínas de unión a fosfatidilserina (PS) dedicadas que incluyen proteínas puente y receptores de eferocitosis/depuración de la superficie celular. Un ejemplo de desfuncionalización de un receptor de eferocitosis es el desprendimiento proteolítico de receptores de la familia TAM como Mer tirosina quinasa (MerTK). MerTK es una proteína de membrana integral expresada preferentemente en células fagocíticas, donde actúa

como proteína de señalización pero también promueve la eferocitosis (a través de proteínas como Gas6 o Proteína S) e inhibe la señalización inflamatoria. La escisión proteolítica y la liberación del ectodominio soluble de MerTK se induce por la metaloproteinasa ADAM17. El proceso de desprendimiento puede reducir la eferocitosis de las células fagocíticas mediante la privación de MerTK de superficie. Además, el ectodominio liberado también puede inhibir la eferocitosis *in vitro* (Zhang *et al.*, (2015) J Mol Cell Cardiol., 87:171–9; Miller *et al.*, (2017) Clin Cancer Res., 23(3):623–629). Las cantidades elevadas de Mer soluble en suero/plasma se observan típicamente en enfermedades inflamatorias, malignas o autoinmunes como la nefropatía diabética o el lupus eritematoso sistémico (SLE) y pueden marcar la gravedad de la enfermedad (Ochodnický P (2017) Am J Pathol., 187(9):1971–1983; Wu *et al.*, (2011) Arthritis Res Ther. 13:R88). Además, las proteínas puente, como el glóbulo de grasa de la leche y la proteína factor 8 EGF (MFG–E8), también se regulan por disminución durante las enfermedades inflamatorias más agudas y crónicas. De manera similar al Mer soluble, se puede encontrar una concentración sérica/plasmática reducida de MFG–E8 en pacientes con infarto de miocardio o pacientes con angina estable (Dai *et al.*, (2016) World J Cardiol., 8(1): 1–23) y puede marcar la gravedad de la enfermedad como se describe para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD; Zhang *et al.*, (2015) *supra*).

La exposición a fosfatidilserina (PS) en células moribundas es una señal antiinflamatoria e inmunosupresora conservada evolutivamente para las células inmunes. Un gran número de los principales patógenos de mamíferos utilizan la captación mediada por PS como parte de una infección celular virulenta (Birge *et al.*, (2016) Cell Death Diff., 23(6): 962–78). Los virus, por ejemplo, pueden unirse a receptores de unión a PS directamente o mediante proteínas como Gas6 (Morizono & Chen (2014) J Virol., 88 (8): 4275–90). Es posible que la inactivación de las vías de depuración endógenas en respuesta a una lesión presente una respuesta desarrollada evolutivamente para reducir la eficiencia de un agente infeccioso para entrar y secuestrar las células después de la lesión y, por lo tanto, eludir la respuesta inmunitaria y la defensa del huésped. En consecuencia, la modulación por disminución de las vías de depuración mejoraría la eficacia de los efectores inmunitarios innatos y adaptativos para combatir las infecciones. Como consecuencia de un "fuego amigo", la eferocitosis puede verse afectada temporalmente durante una lesión orgánica aguda y pueden ocurrir las complicaciones mencionadas anteriormente en las AOI. Una acumulación de células moribundas, restos y MP proinflamatorias y protrombóticas son características de las AOI y representan los principales desencadenantes de inflamación y daño microvascular. Es de destacar que dicha acumulación de micropartículas proinflamatorias y protrombóticas es común en enfermedades graves con alta necesidad médica y puede contribuir

a su morbilidad. Ejemplos de tales indicaciones son la sepsis y el cáncer (Yang *et al.*, (2016) *Tumour Biol.*, 37(6): 7881–91; Zhao *et al.*, (2016) *J Exp Clin Cancer Res.*, 35: 54; Muhsin-Sharafaldine *et al.*, (2017) *Biochim Biophys Acta Gen Subj.*, 1861(2): 286–295; Ma *et al.*, (2017) *Sci Rep.*, 7(1): 4978; Souza *et al.*, (2015) *Kidney Int.* 87(6): 1100–8). Los esfuerzos previos de descubrimiento de fármacos en esta área se han centrado en proteínas de unión a PS, que pueden servir como base para un diseño de candidatos de fármacos según lo revisado por (Li *et al.*, (2013) *Exp Opin Ther Targets*, 17(11): 1275–1285).

Un subconjunto de proteínas de unión a PS también reconoce y se une a integrinas, como $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$, que se expresan en muchos tipos de células, incluidos los fagocitos. Estas proteínas actúan como puente entre PS y exponen las células apoptóticas/moribundas a las integrinas, lo que da como resultado eferocitosis (también denominada fagocitosis) por macrófagos y fagocitos no profesionales. Algunas proteínas puente también se regulan por disminución durante las enfermedades inflamatorias más agudas y crónicas. Se han sugerido previamente usos terapéuticos para tales proteínas puente o versiones truncadas de las mismas (WO2006122327 (sepsis), WO2009064448 (lesión orgánica después de isquemia/reperfusión), WO2012149254 (isquemia cerebral) The Feinstein Institute for Medical Research; WO2015025959 (infarto de miocardio) Kyushu University & Universidad Médica de Tokio; WO20150175512 (resorción ósea) Universidad de Pennsylvania; WO2017018698 (fibrosis tisular) Fundación de Investigación y Negocios de la Universidad de Corea y US20180334486 (fibrosis tisular) Nexel Co., Ltd.); documento WO2020084344; sin embargo, el uso de proteínas naturales o de tipo salvaje está limitado por una serie de problemas. Por ejemplo, se considera que MFG–E8 de tipo salvaje (wtMFG–E8) tiene poca capacidad de desarrollo, baja solubilidad y se expresa con un rendimiento muy bajo cuando se cultiva en sistemas de expresión celular. El trabajo de Castellanos *et al.*, (2016) ha demostrado que MFG–E8 expresado en células de insectos o CHO como fusión Fc–IgG está completamente agregado y solo podría purificarse eficientemente mediante la adición de detergentes como Triton X–100 o CHAPS (Castellanos *et al.*, (2016) *Protein Exp. Pur.*, 124: 10–22).

Las principales funciones de MFG–E8 informadas hasta ahora son mejorar la eferocitosis (Hanayama 2004 *Science*), para modular la captación/procesamiento de lípidos (Nat Med. 2014). rMFG–E8 regula el almacenamiento de lípidos específicos de los enterocitos al promover la actividad de la hidrolasa de triglicéridos de los enterocitos (TG) (JCI 2016). Se demostró que el MFG–E8 intracelular es un supresor de la acumulación de lípidos hepáticos y la inflamación, actuando mediante la inhibición de la cascada de señalización ASK1–JNK/p38. (Zhang *et al* 2020). Además, se han descrito propiedades antiinflamatorias, promoción de la angiogénesis,

aterosclerosis, remodelación tisular y regulación de la hemostasia para MFG–E8. Además, se ha informado que MFG–E8 elimina el exceso de colágeno en los tejidos pulmonares mediante la unión del colágeno a través de su dominio C1. Curiosamente, los macrófagos MFG–E8 –/– exhibieron una captación de colágeno defectuosa que podría ser rescatada por MFG–E8 recombinante que contiene al menos un dominio discoidina (Atabai et al 2009).

En estudios preclínicos, el MFG–E8 recombinante ha demostrado una protección convincente en varios modelos, en su mayoría de roedores, de enfermedades inflamatorias y orgánicas agudas, así como en modelos de enfermedad con cicatrización aberrante. Se ha demostrado que el MFG–E8 recombinante acelera la cicatrización de heridas/úlceras inducidas por diabetes e I/R (Uchiyama et al 2015/2017); reparación acelerada del epitelio intestinal después de una colitis (Bu et al 2007) y aceleración de la reparación del tendón después de una lesión (Shi et al 2019); MFG–E8 recombinante redujo el daño renal y la fibrosis en el modelo de obstrucción ureteral (UUO) (Brisette et al 2016). Además, la eficacia se confirmó en modelos típicos de fibrosis en los que el MFG–E8 recombinante aceleró la resolución de la fibrosis hepática inducida por TAA y CCl4 (An SY, Gastroenterology 2016) y se protegió en un modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (Atabai et al 2009). Recientemente, se publicó una versión truncada disminuida de C2 para ejercer una eficacia similar o incluso mejor en varios modelos de fibrosis preclínicos, incluido el modelo de fibrosis hepática TAA. (Documento WO2020084344).

Hajishengallis y Chavakis 2019 analizaron recientemente EDIL3 (proteína 3 que contiene dominio similar a discoidina I y repetición similar a EGF). Se demostró que EDIL3 (alias DEL–1) media la eferocitosis, regula el reclutamiento de neutrófilos y la inflamación, puede desencadenar como parte de la mielopoyesis de emergencia del nicho de células madre hematopoyéticas (dependiente de la integrina α v β 3) restringe la osteoclastogénesis e inhibe la pérdida ósea inflamatoria en roedores y primates no humanos. Se descubrió que EDIL3 es un componente integral del privilegio inmunológico del sistema nervioso central. Se probó el potencial de EDIL3 como proteína terapéutica como proteína de fusión con el fragmento Fc de IgG humana (DEL–1–Fc). La administración de DEL–Fc inhibió la infiltración de neutrófilos, bloqueó la pérdida ósea inflamatoria impulsada por IL–17 en un modelo de periodontitis en ratones (Eskan et al 2012 doi: 10.1038/ni.2260;). Además, DEL–1–Fc mejoró la inflamación periodontal, la destrucción de tejido y la pérdida ósea en un modelo de periodontitis de primates no humanos (Shin et al 2015 DOI: 10.1126/scitranslmed.aac5380). Además, DEL–1–Fc mejoró la encefalomiелitis autoinmune experimental remitente–recurrente (EAE), un modelo de esclerosis múltiple traslacional (Choi et al

2014 doi: 10.1038/mp.2014.146); Además, DEL-1-Fc disminuyó la incidencia y la gravedad de las adherencias peritoneales posoperatorias en un modelo de ratón Fu et al 2018.

La eliminación de células moribundas, desechos y micropartículas por las proteínas puente, por ejemplo, MFG-E8, EDIL3, Gas6, podría eliminar las principales causas de inflamación estéril y disfunción microvascular y así prevenir la progresión de la lesión tisular y permitir la resolución de la inflamación. Por lo tanto, un enfoque terapéutico para promover la eliminación de las células moribundas durante el curso de las AOI se podría utilizar para reducir o al menos aliviar la patología de las AOI y podría ser significativo en otros entornos de enfermedad donde las células moribundas o las micropartículas que exponen a PS no se eliminan lo suficiente. Como tal, existe la necesidad de un agente terapéutico que se pueda utilizar para reducir la lesión y la inflamación del tejido y que tenga propiedades de fabricación deseables para abordar la necesidad médica no satisfecha en las AOI.

Breve Descripción de la Invención

En la presente descripción, los solicitantes han generado proteínas de fusión terapéuticas recombinantes basadas en la estructura de las proteínas puente de origen natural (por ejemplo, MFG-E8) sin las propiedades indeseables mencionadas anteriormente y los problemas de producción de la proteína de tipo salvaje. Las proteínas de fusión de la presente descripción comprenden un dominio de unión a integrina (por ejemplo, dominio similar a EGF), un dominio de solubilización y un dominio de unión a fosfatidilserina (por ejemplo, dominio C1 de MFG-E8 o su parólogo EDIL3). Las proteínas de la invención son adecuadas para la prevención o el tratamiento de trastornos de órganos provocados por fibrosis, sistema inmunológico o inflamatorios crónicos o agudos. Las proteínas de la invención también pueden encontrar su aplicación para permitir, acelerar y promover la reparación y regeneración.

Las proteínas de fusión mantienen las principales funciones biológicas de la proteína MFG-E8 o EDIL3 de tipo salvaje, por ejemplo, actuando para unir las células moribundas que exponen PS, los desechos y las micropartículas a los fagocitos y, por lo tanto, desencadenar la eferocitosis. Además, las proteínas de fusión terapéuticas de la presente descripción tienen una capacidad de desarrollo mejorada, en particular una pegajosidad reducida y una solubilidad mejorada en comparación con la proteína MFG-E8 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1), o con MFG-E8 recombinante y MFG-E8 truncada en C2 (EGF_C1). Además, estas proteínas de fusión terapéuticas tienen una exposición plasmática más prolongada y tienen un mayor rendimiento cuando se expresan en sistemas de expresión celular en comparación con la proteína MFG-E8 de tipo salvaje. Las proteínas de fusión terapéuticas de acuerdo con la invención tienen una

actividad selectiva de macrófagos aumentada (potenciación de la eferocitosis). Además, las proteínas de fusión terapéuticas de acuerdo con la invención tienen una seguridad mejorada en comparación con MFG-E8 de tipo salvaje de longitud completa u otras variantes funcionales de longitud completa.

En el presente documento se proporcionan proteínas de fusión terapéuticas para potenciar la eferocitosis que comprenden un dominio de unión a integrina, un dominio de unión a fosfatidilserina (PS) y un dominio de solubilización, en donde el dominio de unión a PS es una variante truncada de al menos un dominio de unión a PS enumerado en la Tabla 2.

En algunas modalidades, la proteína de fusión terapéutica comprende el C-terminal de un dominio de unión a integrina unido al N-terminal de un dominio de solubilización, y el C-terminal del dominio de solubilización unido a un dominio de unión a PS. En algunas modalidades, la proteína de fusión terapéutica comprende la estructura general EGF-S-C en donde EGF representa el dominio de unión a integrina, por ejemplo dominio similar a EGF de MFG-E8, de EDIL3 o de cualquier otra proteína que comprenda un dominio de unión a integrina como se enumera en la Tabla 1; S representa un dominio de solubilización; y C representa un dominio de unión a PS truncado, por ejemplo una variante truncada del dominio de unión a PS que se encuentra en MFG-E8, EDIL3 o en cualquier otra proteína que comprenda cualquiera de C1 y/o C2 de un dominio de unión a PS como se enumera en la Tabla 2. Ejemplos de proteínas que comprenden tanto un dominio de unión a integrina como un dominio de unión a PS, por ejemplo, MFG-E8 (SEQ ID NO: 1) y EDIL3 (SEQ ID NO: 11), se enumeran en la Tabla 3.

En algunas modalidades, el dominio de unión a PS comprende uno de los dos subdominios de discoidina C1-C2, o una variante funcional del mismo. Por ejemplo, el dominio de unión a PS de MFG-E8 humano que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 3 o un aminoácido de al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad de secuencia con la misma, o sus variantes truncadas. En una modalidad, el dominio de unión a PS truncado comprende un dominio de unión a PS truncado de MFG-E8 humano o una variante funcional del mismo que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco, hasta 10 modificaciones de aminoácidos. En una modalidad, el dominio de unión a PS comprende un dominio de unión a PS truncado de EDIL3 humana o su variante funcional que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco, hasta 10 modificaciones de aminoácidos.

En ciertos aspectos, se proporciona en este documento una proteína de fusión que comprende un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF), un dominio de solubilización, un dominio C1, pero que carece de un dominio C2 funcional. En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende un dominio similar al factor de crecimiento

epidérmico (EGF), un dominio de solubilización, un dominio C1, pero que carece de un polipéptido medio o un fragmento del mismo.

En algunas modalidades, el dominio de solubilización de la proteína de fusión está unido al dominio de unión a integrina. En algunas modalidades, el dominio de solubilización está unido al dominio de unión a PS. En algunas modalidades, el dominio de solubilización está unido tanto al dominio de unión a integrina como al dominio de unión a PS, es decir, está ubicado entre el dominio de unión a integrina y el dominio de unión a PS. En algunas modalidades, el dominio solubilizante se inserta dentro del dominio de unión a integrina o se inserta dentro del dominio de unión a PS. En una modalidad, la proteína de fusión terapéutica tiene la estructura de N– a C–terminal: dominio de unión a integrina–dominio de solubilización–dominio de unión a PS.

En algunas modalidades, el dominio de unión a integrina de la proteína de fusión terapéutica comprende un motivo de unión de arginina–glicina–ácido aspártico (RGD) y se une a la(s) integrina(s) $\alpha v \beta 3$ y/o $\alpha v \beta 5$ o $\alpha 8 \beta 1$.

En algunas modalidades, el dominio de solubilización de la proteína de fusión terapéutica se une directamente al dominio de unión a integrina y/o se une al dominio de unión a PS, es decir, se inserta entre dichos dominios. En una modalidad alternativa, el dominio de solubilización se une indirectamente al dominio de unión a integrina y/o al dominio de unión a PS mediante un ligador, tal como un ligador externo. En algunas modalidades, el dominio de solubilización comprende albúmina de suero humano (HSA), el dominio 3 de HSA (HSA D3) o la región Fc de una IgG (Fc–IgG), o una variante funcional de la misma.

En algunas modalidades, el dominio de unión a integrina es un dominio similar a EGF, por ejemplo, que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 2 o un aminoácido de al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la misma, o sus variantes truncadas. En una modalidad, el dominio similar a EGF comprende el dominio similar a EGF de MFG–E8 humano o su variante funcional que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco, hasta 10 modificaciones de aminoácidos. En una modalidad, el dominio similar a EGF comprende el dominio similar a EGF de EDIL3 humana o su variante funcional que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco, hasta 10 modificaciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el dominio de solubilización es HSA o su variante funcional, por ejemplo, que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4 o un aminoácido de al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la misma, o sus variantes truncadas. En una modalidad, la HSA comprende la sustitución de aminoácidos C34S que funciona para reducir la propensión de la proteína a la agregación, y tiene la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, el

dominio de solubilización comprende albúmina de suero humano. (HSA) o una variante funcional del mismo que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco, hasta 10 modificaciones de aminoácidos, por ejemplo, HSA C34S, o una variante truncada de HSA, por ejemplo, dominio 3 de HSA (HSA D3) o una variante funcional del mismo. En una modalidad preferida, el dominio de solubilización es HSA C34S.

En una modalidad alternativa, el dominio de solubilización comprende la región Fc de una IgG (Fc-IgG), por ejemplo la región Fc de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana o una variante funcional de las mismas. En una modalidad, el dominio de solubilización comprende la región Fc de una Fc-IgG1 humana que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 7 o un aminoácido de al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con el mismo, o variantes truncadas del mismo. En una modalidad, la Fc-IgG1 comprende las sustituciones de aminoácidos D265A y P329A para reducir la función efectora de Fc, y tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 8. En otra modalidad, la Fc-IgG1 comprende la sustitución de aminoácido T366W para crear un "botón" o puede comprender las sustituciones de aminoácidos T366S, L368A, Y407V para crear un "ojal". Además, el botón Fc-IgG1 puede comprender la sustitución de aminoácidos S354C y el ojal Fc-IgG1 puede comprender la sustitución de aminoácidos Y349C de modo que al emparejar se forma un puente de cisteína. Además de las modificaciones del botón en el ojal, Fc-IgG1 también puede comprender las sustituciones D265A y P329A para reducir la función efectora de Fc. En una modalidad, la Fc-IgG1 tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 9 o 10.

En una modalidad preferida, la proteína de fusión terapéutica comprende glóbulo de grasa de la leche-proteína factor 8 EGF (MFG-E8) y un dominio de solubilización, en donde MFG-E8 comprende un dominio similar a EGF de unión a integrina (SEQ ID NO: 2) y una variante funcional de los dominios C1-C2 de unión a fosfatidilserina (SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 76). MFG-E8 puede comprender MFG-E8 humano natural o de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) o MFGE-8 con SEQ ID NO: 75, o una variante funcional del mismo. En una modalidad, el dominio de solubilización está unido al N o C-terminal de MFG-E8. En una modalidad, el dominio de solubilización se inserta entre el dominio similar a EGF y el dominio C1 o entre el dominio similar a EGF y el dominio C2. En una modalidad preferida, el dominio de solubilización se une al C-terminal del dominio similar a EGF y se une al N-terminal del dominio C1. El dominio de solubilización puede unirse directa o indirectamente al C-terminal del dominio similar a EGF y unirse directa o indirectamente al N-terminal del dominio C1. En algunas modalidades, el enlace indirecto es por medio de un ligador

externo, por ejemplo, un ligador basado en glicina–serina.

En algunas modalidades, y como se describe en la sección de Ejemplos, las proteínas de fusión terapéuticas de la presente descripción funcionan para promover la eferocitosis por las células endoteliales en un ensayo de eferocitosis célula endotelial humana–célula Jurkat y restaurar la eferocitosis basal deteriorada y aumentada por macrófagos en un ensayo de eferocitosis de macrófagos y neutrófilos humanos; las proteínas de fusión funcionan para reducir el número de micropartículas plasmáticas mediante la depuración en un ensayo de eferocitosis de micropartículas endoteliales humanas; y/o las proteínas de fusión proporcionan protección contra la lesión de múltiples órganos en un modelo de isquemia renal aguda.

También se describen en el presente documento métodos, usos, reactivos de diagnóstico, composiciones farmacéuticas y kits que utilizan o comprenden estas proteínas de fusión terapéuticas. También se proporcionan en el presente documento ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión descritas, vectores de clonación y expresión que comprenden dichos ácidos nucleicos, células huésped que comprenden dichos ácidos nucleicos y procesos para producir las proteínas de fusión descritas cultivando dichas células huésped.

Breve Descripción de las Figuras

La **Figura 1** muestra una representación esquemática de ejemplos de proteínas de fusión terapéuticas de la presente descripción. Se unió un dominio de solubilización (etiquetado como "SD") en el extremo C–terminal, el N–terminal o entre los dominios EGF, C1 o C2 de MFG–E8.

La **Figura 2** muestra varios geles de proteínas SDS–PAGE de las proteínas de fusión expresadas en células HEK. La Fig. 2A: proteína EGF–HSA–C1–C2 (FP330; SEQ ID NO: 42); Fig. 2B: EGF–HSA–C1–C2 de la proteína EDIL3 (FP050; SEQ ID NO: 12); Fig 2C: proteína EGF–Fc (KiH) C1–C2 no reducida y reducida (esta proteína es un heterodímero de FP071 (EGF–Fc (botón)–C1–C2; SEQ ID NO: 18) con ojal Fc–IgG1 (SEQ ID NO: 10)); Fig. 2D: proteína EGF–HSA–C1 (FP260; SEQ ID NO: 34). Para cada una de las Fig. 2A, 2C y 2D, la primera columna muestra un marcador de patrones sin teñir de proteína Precision Plus y la segunda columna muestra la proteína de fusión respectiva. Para la Fig 2B, la primera columna muestra la proteína de fusión y la segunda columna muestra un marcador de estándares sin teñir de proteína Precision Plus. La Figura 2E muestra proteínas recombinantes adicionales que se han producido y purificado.

La **Figura 3** ejemplifica el efecto de la pérdida de MFG–E8 de tipo salvaje (wt) frente a la proteína de fusión FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44) durante la manipulación práctica. La figura 3A muestra una pérdida de eficacia para wtMFG–E8 en el ensayo de competición de L– α –fosfatidilserina cuando se hicieron diluciones de proteínas en placas de

polipropileno (símbolo: □) en comparación con diluciones hechas en placas sin unión (símbolo: ●). Por el contrario, la figura 3B prácticamente no muestra pérdida de eficacia para la proteína de fusión FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44) en el ensayo de competición de PS cuando se hicieron diluciones de proteínas en placas de polipropileno (símbolo: □) versus placas no vinculantes (símbolo: ●).

La **Figura 4** muestra la unión de proteínas de fusión a L– α –fosfatidilserina. La figura 4A muestra la unión de FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44) a L– α –fosfatidilserina inmovilizada y en un grado más débil a la cardiolipina fosfolípida, de una manera dependiente de la concentración. La figura 4B muestra la unión de wtMFG–E8 humano y varias proteínas de fusión terapéuticas: FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44), FP250 (EGF–HSA; SEQ ID NO: 32), FP260 (EGF–HSA–C1; SEQ ID NO: 34) y FP270 (EGF–HSA–C2; SEQ ID NO: 36), a L– α –fosfatidilserina inmovilizada de una manera dependiente de la concentración en un formato de ensayo de competición (competición contra la unión de wtMFG–E8 de ratón biotinilado a L– α –fosfatidilserina).

La **Figura 5** muestra la adhesión celular dependiente de la integrina α v a proteínas de fusión. La Fig. 5A muestra que la adhesión celular a FP330 (EGF–HSA–C1–C2; SEQ ID NO: 42) está completamente bloqueada por el inhibidor de la integrina α v cilengitide o EDTA 10 mM. Una mutación de un solo punto en el motivo de unión a integrina RGD (RGD> RGE) del dominio similar a EGF (FP280; SEQ ID NO: 38) da como resultado la anulación completa de la adhesión celular como se muestra en la Fig. 5B. La Fig. 5C muestra que la proteína EGF–HSA inmovilizada (FP250; SEQ ID NO: 32) no apoya o sólo apoya moderadamente la adhesión de células BW5147.G.1.4 a pesar de un dominio similar a EGF. Como se muestra en la Fig. 5D, una proteína de fusión de esta descripción (FP330; SEQ ID NO: 42) promueve la adhesión celular dependiente de la integrina α v similar a wtMFG–E8 cuando se expresa en células CHO o en células HEK.

La **Figura 6** muestra el efecto de la proteína de fusión terapéutica FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44) sobre la promoción de la eferocitosis de neutrófilos moribundos por macrófagos humanos. La concentración de la proteína de fusión se muestra en el eje x y la eferocitosis [%] se muestra en el eje y.

La **Figura 7** muestra que la proteína de fusión terapéutica FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44) puede rescatar la eferocitosis alterada por endotoxina (lipopolisacárido) de neutrófilos moribundos por macrófagos humanos. La figura 7A muestra el deterioro de la eferocitosis de macrófagos de neutrófilos humanos moribundos por 100 pg/mL de lipopolisacárido (LPS) en tres donantes humanos. El panel de la izquierda muestra la respuesta del donante individual, el panel de la derecha muestra el deterioro medio de la eferocitosis (%) de los tres

donantes. La figura 7B muestra el rescate de esta endotoxina (LPS)– eferocitosis alterada de neutrófilos moribundos por macrófagos humanos en presencia de la proteína de fusión terapéutica FP278. Los índices de eferocitosis de 3 donantes de macrófagos humanos diferentes se normalizaron y se representaron como eferocitosis (%).

La **Figura 8** muestra el rescate de la alteración de la eferocitosis inducida por partículas de *S. aureus* de neutrófilos moribundos por macrófagos humanos con la proteína de fusión terapéutica FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44). La figura 8A muestra el efecto de una concentración de 100 nM de FP278 en la promoción de la eferocitosis sobre el nivel base (línea de puntos; parte izquierda de la figura) así como el efecto de 100 nM de FP278 en el rescate del deterioro de la eferocitosis causado por la administración de *S. aureus* (parte derecha de la figura). La Figura 8B muestra el efecto de concentraciones crecientes de la proteína de fusión FP278 (EC_{50} 8 nM) sobre el rescate de la eferocitosis alterada causada por la administración de *S. aureus*, y sobre la promoción de la eferocitosis una vez que se alcanzaron los niveles básicos de eferocitosis.

La **Figura 9** muestra el efecto de la proteína de fusión terapéutica FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44) sobre la promoción de la eferocitosis de células Jurkat moribundas por células endoteliales humanas (HUVEC). La eficiencia de la proteína de fusión en el ensayo de eferocitosis de células endoteliales depende de la presencia de un dominio en tándem C1–C2 o C1–C1 dado que, como se ilustra en la Figura 9, una proteína de fusión de estructura EGF–HSA–C2 (FP270; SEQ ID NO: 36) es ineficaz en este ensayo.

La **Figura 10** muestra que la ubicación de un dominio HSA en la proteína de fusión terapéutica, es decir, en la posición N–o C–terminal (FP220 (HSA–EGF–C1–C2; SEQ ID NO: 30) o FP110 (EGF–C1–C2–HSA; SEQ ID NO: 28), respectivamente), confiere la función de bloqueo de la eferocitosis a la proteína de fusión MFG–E8 HSA en el ensayo de eferocitosis de macrófagos. La concentración de proteína de fusión se muestra en el eje x, la eferocitosis [%] se muestra en el eje y.

La **Figura 11** muestra una comparación de la promoción de la eferocitosis mediante varios formatos de proteínas de fusión terapéuticas que comprenden un resto HSA o Fc. La concentración de la proteína de fusión se muestra en el eje x (nM), la eferocitosis [MFI] se muestra en el eje y. La Figura 11A muestra una comparación de proteínas de fusión que comprenden HSA con la HSA colocada en el C–terminal o N–terminal o entre los dominios de tipo EGF y C1; FP110 (EGF–C1–C2–HSA; SEQ ID NO: 28), FP220 (HSA–EGF–C1–C2; SEQ ID NO: 30) y FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–de His; SEQ ID NO: 44), respectivamente. La figura 11B muestra una comparación de proteínas de fusión que comprenden un resto Fc con el Fc posicionado en el C–terminal (FP060 (EGF–C1–C2–Fc [S354C, T366W]; SEQ ID NO: 14) y FP080 (EGF–C1–C2–Fc; SEQ ID NO: 22))

o entre los dominios tipo EGF y C1 (FP070 (EGF–Fc–C1–C2; SEQ ID NO: 16)) en comparación con MFG–EG de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1). Se muestran dos formatos de resto Fc: Fc de tipo salvaje (FP080; SEQ ID NO: 22) y un resto Fc con las modificaciones S354C y T366W (numeración EU; FP060; SEQ ID NO: 14). La Figura 11C muestra una comparación de tres lotes de la proteína de fusión FP090 (Fc–EGF–C1–C2; SEQ ID NO: 24) que comprende un resto Fc posicionado en el N–terminal, a tres concentraciones diferentes (0,72; 7,2 y 72 nM), en comparación con el control wt–MFG–E8. La Fig. 11D muestra la promoción de la eferocitosis por un constructo de proteína de fusión FP050 que comprende una HSA insertada entre el dominio similar a EGF y el dominio C1–C2 de EDIL3 (EGF–HSA–C1–C2 basado en EDIL3; SEQ ID NO: 12). La Figura 11E muestra ejemplos adicionales de proteínas de fusión de la descripción, por ejemplo variantes quiméricas (FP114 o FP260; SEQ ID NO: 34, FP147 o FP1777; SEQ ID NO: 71, FP1149, FP1150, FP145; SEQ ID NO: 80, FP1145; SEQ ID NO: 103, FP146; SEQ ID NO : 82, FP1146) y combinaciones de dominios de unión a integrina de MFGE8 o EDIL3 y dominios de unión a PS tales como el dominio V de IgSF de TIM4 o el dominio GLA de la proteína puente GAS6 (FP1147 y FP1148).

La **Figura 12** muestra la promoción de la eferocitosis por células HUVEC de la proteína de fusión terapéutica FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44) ensayada a 3 concentraciones diferentes hasta 30 nM. La promoción de la eferocitosis dependía de la concentración y la eferocitosis aumentaba a medida que aumentaba la concentración de la proteína de fusión FP278.

La **Figura 13** muestra que las proteínas de fusión terapéuticas FP330 (EGF–HSA–C1–C2; SEQ ID NO: 42; Fig 13A), FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44; Fig 13B) y FP776 (EGF–HSA–C1–C2; SEQ ID NO: 48; Fig 13C) pueden rescatar la eferocitosis alterada por endotoxina (lipopolisacárido) de neutrófilos moribundos por macrófagos humanos. La concentración de proteína de fusión se muestra en el eje x, la eferocitosis [%] se muestra en el eje y.

La **Figura 14** muestra el efecto de las proteínas de fusión FP330 (EGF–HSA–C1–C2; SEQ ID NO: 42; Fig 14A), FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44; Fig 14B) y FP776 (EGF–HSA–C1–C2; SEQ ID NO: 48; Fig 14C) sobre la promoción de la eferocitosis de células Jurkat moribundas por células endoteliales humanas (HUVEC). La concentración de proteína de fusión se muestra en el eje x, la eferocitosis [%] se muestra en el eje y.

La **Figura 15** muestra que una dosis única de las proteínas de fusión terapéuticas FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44), FP330 (EGF–HSA–C1–C2; SEQ ID NO: 42) o FP776 (EGF–HSA–C1–C2; SEQ ID NO: 48) protege la función renal en un modelo de lesión renal aguda (AKI) inducida por lesión por isquemia–reperfusión. La Figura 15A muestra que un aumento

en la creatinina sérica (sCr) (mg/dL; eje y) se reduce mediante la administración intraperitoneal (i.p.) de 0,16 mg/kg o 0,5 mg/kg de FP278 (SEQ ID NO: 44) (eje x). Como se muestra en la Fig. 15B, la administración intravenosa (i.v.) de 0,5 mg/kg o 1,5 mg/kg de la proteína de fusión FP330 (SEQ ID NO: 42) redujo significativamente los niveles de creatinina sérica. La Figura 15C muestra que la administración i.v. de la proteína de fusión FP776 (SEQ ID NO: 48) redujo la creatinina sérica de una manera dependiente de la dosis.

La **Figura 16** muestra que una dosis única de la proteína de fusión terapéutica FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44) de 0,16 mg/kg o 0,5 mg/kg, redujo los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN) en un modelo murino de lesión renal aguda.

La **Figura 17** muestra que una dosis única de la proteína de fusión terapéutica FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44) protege órganos distantes de la respuesta de fase aguda provocada por la IKA inducida por isquemia reperusión, basada en la expresión génica de marcadores de lesión. La Figura 17A ejemplifica tal respuesta inducida por AKI de proteína amiloide sérica (SAA) en el corazón murino y la Figura 17B ejemplifica tal respuesta inducida por AKI (SAA) en el pulmón murino, las cuales se bloquearon de forma potente después de una sola inyección i.p. de la proteína de fusión FP278 (SEQ ID NO: 44) derivada de MFGE–8 a 0,16 mg/kg o 0,5 mg/kg/i.p.

La **Figura 18** muestra la captación del agente de contraste de óxido de hierro superparamagnético (SPIO) (Endorem®) por el hígado a lo largo del tiempo. Endorem® se inyectó por vía intravenosa como un bolo durante 1,2 s en animales con AKI (24 h después de la inducción de la enfermedad) o después de la operación simulada (animales después de 24 h de nefrectomía). Los animales con AKI mostraron una absorción significativamente reducida del agente de contraste por el hígado (objetivo = células de Kupffer) en comparación con los animales simulados. Tratamiento con la proteína de fusión FP776 (EGF–HSA–C1–C2; SEQ ID NO: 48) se dosifica profilácticamente –30 min antes de la inducción de AKI, o se dosifica terapéuticamente +5 h después de la inducción de lesión por reperusión isquemia, se protege de la pérdida de acumulación de agente de contraste en el hígado de ratones con AKI.

Figura 19 Las proteínas de fusión terapéuticas FP114, también denominadas en el presente documento FP260, (EGF–HSA–C1 SEQ ID NO: 34) se ensayaron en el modelo AKI como se describe en los Ejemplos a 1,5 mg/kg/i.v. Para este estudio, se administró FP114 30 min horas antes del inicio de la lesión por reperusión por isquemia. Se evaluaron los marcadores séricos y el peso de los riñones 24 h después de la inducción de la enfermedad. La creatinina sérica y el BUN reducidos, así como el peso normal del riñón, sugieren protección de AKI en este modelo.

Figura 20 La proteína de fusión terapéutica FP135, también denominada en el presente

documento FP261, (EGF–HSA–C1 SEQ ID NO: 73) se ensayó en el modelo de fibrosis CCL4 a 0,8 mg/kg/i.p. El tratamiento se inició después de 4 semanas de inducción de fibrosis (con CCL4) (un total de 11 dosis) o después de 5 semanas de inducción de fibrosis con CCL4 (un total de 8 dosis) administrando 3 dosis semanales. El tercer grupo de animales se dosificó después de 6 semanas en la detención de la inducción de la enfermedad con CCL4 (total de 4 dosis). En todos los grupos, FP135 se dosificó una vez al día durante los últimos 3 días. La rigidez del hígado se evaluó el día de la línea base (al comienzo del experimento) al cesar CCL4 y 3 días después de cesar CCL4. Los datos sugieren que en los animales que fueron tratados con FP135 (comienzo después de la semana 4 y 5 de CCL4) se logró una resolución acelerada significativa de la rigidez hepática inducida por CCL4.

Figura 21. Fig. 21A Se ensayó la proteína de fusión terapéutica FP135 (EGF–HSA–C1 SEQ ID NO: 73) en el modelo de fibrosis CCL4 a 0,8 mg/kg/i.p. El tratamiento se inició después de 4 semanas de inducción de fibrosis (con CCL4) (un total de 11 dosis) o después de 5 semanas de inducción de fibrosis con CCL4 (un total de 8 dosis) con 3 dosis semanales administradas o después de 6 semanas en la interrupción de la inducción de la enfermedad con CCL4 (total de 4 dosis). En todos los grupos, FP135 se dosificó una vez al día durante los últimos 3 días. La reducción de la ALT sérica sugiere que el tratamiento con FP135 ayudó a acelerar la resolución del daño hepático causado por CCL4 en los grupos en los que se inició el tratamiento en la semana 4 y 5 de CCL4.

Figura 21B La proteína de fusión terapéutica FP135 (EGF–HSA–C1 SEQ ID NO: 73) se probó en el modelo de fibrosis CCL4 a 0,8 mg/kg/i.p. como se describe para la Fig. 21A. El contenido de colágeno en hígados de animales sacrificados se cuantificó mediante ensayo de hidroxiprolina. La reducción observada en animales con dosis de 8 y 11 veces sugiere que el tratamiento con FP135 ayudó a acelerar la resolución de la fibrosis hepática causada por CCL4

Figura 21C La proteína de fusión terapéutica FP135 (EGF–HSA–C1 SEQ ID NO: 73) se probó en el modelo de fibrosis CCL4 a 0,8 mg/kg/i.p. como se describe para la Fig21A. La expresión de colágeno en hígados de animales sacrificados se cuantificó mediante ensayo de hidroxiprolina. La reducción observada en animales dosificados 8 y 11 veces sugiere que el tratamiento con FP135 ayudó a acelerar la resolución de la fibrosis hepática causada por CCL4.

La **Figura 22** muestra los datos de adhesión de integrina para la sección de proteínas truncadas FP137, FP135 y FP147.

La **Figura 23** muestra la dispersión de luz dinámica (DLS) de MFG-E8 truncado en C2 (EGF-C1; SEQ ID NO: 115) y fusión HSA (EGF-HSA-C1; SEQ ID NO: 73).

Descripción Detallada

En el presente documento se describen proteínas de fusión terapéuticas que comprenden un dominio de unión a integrina, un dominio de unión a PS y un dominio de solubilización. También se describen en el presente documento métodos de tratamiento que utilizan las proteínas de fusión de la descripción, así como ensayos, tales como un ensayo de eferocitosis, útiles para la caracterización de las proteínas de fusión.

Definiciones

Para que la presente descripción pueda entenderse más fácilmente, ciertos términos se definen específicamente a lo largo de la descripción detallada. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece esta descripción.

En todos los casos en los que el término "comprender", "comprende", "que comprende" o similares se utilizan en referencia a una secuencia (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos), se entenderá que dicha secuencia también puede estar limitada por el término 'consistir', 'consiste', 'que consiste' o similares. Como se utiliza en este documento, la frase "que consiste esencialmente en" se refiere a los géneros o especies de agentes farmacéuticos activos incluidos en un método o composición, así como a cualquier excipiente inactivo para el propósito pretendido de los métodos o composiciones. En algunos aspectos, la frase "que consiste esencialmente en" excluye expresamente la inclusión de uno o más agentes activos adicionales distintos de una molécula de unión multiespecífica de la presente descripción. En algunos aspectos, la frase "que consiste esencialmente en" excluye expresamente la inclusión de uno o más agentes activos adicionales distintos de una molécula de unión multiespecífica de la presente descripción y un segundo agente co-administrado.

El término 'eferocitosis' como se utiliza en este documento se refiere a un proceso en biología celular, en donde las células moribundas o muertas, tales como las células apoptóticas o necróticas o envejecidas o las células altamente activadas o las vesículas celulares extracelulares (micropartículas) o los desechos celulares, llamados colectivamente "presa", se eliminan mediante fagocitosis, es decir se absorben por una célula fagocítica y digeridos. Durante la eferocitosis, las células fagocíticas sujetan y absorben activamente a la presa, generando vesículas intracelulares grandes llenas de líquido que contienen la presa llamada eferosoma, lo que da como resultado un compartimento lisosómico donde se inicia la degradación de la presa. Durante la apoptosis, la

eferocitosis asegura que las células moribundas se eliminen antes de que la integridad de su membrana se vea comprometida y su contenido pueda filtrarse a los tejidos circundantes, evitando la exposición de los tejidos circundantes a DAMP como enzimas tóxicas, oxidantes y otros componentes intracelulares como ADN, histonas y proteasas. Las células fagocíticas profesionales incluyen células de origen mieloide tales como macrófagos y células dendríticas, pero otras, por ejemplo las células del estroma, también pueden realizar eferocitosis como células epiteliales y endoteliales y fibroblastos. La eferocitosis deteriorada se ha relacionado con enfermedades autoinmunes y daño tisular y se ha demostrado en enfermedades como fibrosis quística, bronquiectasia, EPOC, asma, fibrosis pulmonar idiopática, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis y aterosclerosis (Vandivier RW *et al* (2006) *Chest*, 129(6): 1673–82). Ninguna terapia que promueva específicamente la eferocitosis ha ingresado a las clínicas hasta la fecha.

El término "ensayo de eferocitosis" como se utiliza en este documento y como se describe en los ejemplos se refiere a un sistema de ensayo desarrollado para el perfil de proteínas de fusión, que utiliza macrófagos humanos o células endoteliales humanas (HUVEC) como células fagocíticas. Aquí se ejemplifica un ensayo de eferocitosis de macrófagos–neutrófilos, un ensayo de eferocitosis de células endoteliales–células Jurkat o un ensayo de eferocitosis de micropartículas de células endoteliales. Estos ensayos, como se describen con más detalle en los Ejemplos, se pueden utilizar para demostrar que los bioterapéuticos derivados de MFG–E8, tales como las proteínas de fusión de la presente descripción, promueven eficazmente la eferocitosis de células y micropartículas moribundas por macrófagos o células endoteliales. Además, el ensayo de macrófagos–neutrófilos descrito es adecuado para demostrar que tales compuestos de esta invención pueden incluso rescatar la eferocitosis alterada por LPS o *S. aureus* de células moribundas.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Las frases también se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímero de aminoácidos de origen no natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia polipeptídica particular también incluye implícitamente variantes modificadas de forma conservadora de la misma.

El término "pegajosidad" como se utiliza en este documento en relación con las proteínas de la presente descripción se refiere a un resultado del plegamiento incorrecto de proteínas que

promueve la aglutinación o agregación de proteínas. Estos efectos no deseados y no funcionales son el resultado de interacciones hidrofóbicas superficiales.

Como se utiliza en este documento, "C-terminal" se refiere al aminoácido carboxilo terminal de una cadena polipeptídica que tiene un grupo carboxilo libre ($-\text{COOH}$). Como se utiliza en este documento, "N-terminal" se refiere al aminoácido amino terminal de una cadena polipeptídica que tiene un grupo amina libre ($-\text{NH}_2$).

Como se utiliza en este documento, el término "proteína de fusión" se refiere a una proteína que comprende varios dominios, que pueden no constituir una proteína completa natural o de tipo salvaje, pero pueden estar limitados a un dominio activo de la proteína completa responsable de unirse a un correspondiente receptor en la superficie de una célula. Las proteínas de fusión se pueden generar utilizando un diseño de proteína recombinante, donde el término "proteína recombinante" se refiere a una proteína que se ha preparado, expresado, creado o aislado por medios de tecnología de ADN recombinante. La fusión en tándem, por ejemplo, se refiere a una técnica mediante la cual las proteínas o dominios de proteínas de interés se conectan simplemente de un extremo a otro mediante la fusión de los terminales N o C entre las proteínas. Esto proporciona una estructura de puente flexible que permite suficiente espacio entre los compañeros de fusión para garantizar un plegado adecuado. Sin embargo, los extremos N o C del péptido son a menudo componentes cruciales para obtener el patrón de plegamiento deseado para la proteína recombinante, con el efecto de que la simple unión de los dominios de un extremo a otro puede ser ineficaz. Alternativamente, el proceso de inserción de dominios implica la fusión de dominios proteicos consecutivos codificando estructuras deseadas en una única cadena polipeptídica y, a veces, la inserción de un dominio dentro de otro dominio. En los dos procesos mencionados anteriormente, los dominios están "directamente unidos" o "unidos directamente". La inserción del dominio es a menudo más difícil de realizar que la fusión en tándem debido a la dificultad de encontrar un sitio de ligadura apropiado en el gen de interés.

Además de las técnicas de fusión de enlace directo mencionadas anteriormente, se puede utilizar un ligador externo para mantener la funcionalidad de los dominios proteicos en la proteína de fusión. Dicho ligador se refiere a un tramo de aminoácidos que conecta un dominio de proteína con otro dominio de proteína y se denomina en el presente documento "ligador indirecto". Como tales, los dominios están "unidos indirectamente" o "unidos indirectamente". Por ejemplo, los expertos en la técnica apreciarán que un polipéptido cuya estructura incluye dos o más dominios funcionales u organizativos a menudo incluye un tramo de aminoácidos entre dichos dominios que los une entre sí. El ligador permite interacciones de dominio, refuerza la estabilidad y puede reducir el impedimento estérico, lo que a menudo los hace preferidos para su uso en el diseño de proteínas

manipuladas incluso cuando los extremos N y C pueden fusionarse. En algunas modalidades, un ligador se caracteriza porque tiende a no adoptar una estructura tridimensional rígida sino que más bien proporciona flexibilidad al polipéptido. Se han utilizado varios tipos de ligadores de origen natural en proteínas manipuladas, por ejemplo, la región bisagra de inmunoglobulina, que funciona como un ligador en muchas proteínas terapéuticas recombinantes, particularmente en constructos de anticuerpos diseñados (Pack P *et al.*, (1995) J. Mol. Biol., 246: 28–34). Además de los ligadores naturales, se han ideado una multitud de ligadores artificiales, que pueden subdividirse en tres categorías: ligadores flexibles, rígidos y escindibles *in vivo*. (Yu K *et al.*, (2015) Biotech. Advances, 33(1): 155–64; Chen X *et al.*, (2013) Ad. Drug Delivery Reviews, 65(10): 1357–69). Las secuencias ligadoras flexibles más utilizadas son (Gly)*n* (Sabourin *et al.*, (2007) Yeast, 24: 39–45) y (Gly₄Ser)*n* (SEQ ID NO: 64) (Huston *et al.*, 1988, 85: 5879–83) donde la longitud del ligador se puede ajustar mediante el número de copia "n". En algunas modalidades, un polipéptido que comprende un elemento ligador tiene una estructura general de la forma general D1–ligador–D2, en donde D1 y D2 pueden ser iguales o diferentes y representan dos dominios asociados entre sí por el ligador. En algunas modalidades, un ligador polipeptídico es al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más aminoácidos en longitud.

Una 'modificación' o 'mutación' de un residuo/posición de aminoácido, como se utiliza en este documento, se refiere a un cambio de una secuencia de aminoácidos primaria en comparación con una secuencia de aminoácidos inicial, en donde el cambio resulta de una alteración de secuencia que involucra a dicho residuo/posiciones de aminoácido. Por ejemplo, las modificaciones típicas incluyen la sustitución del residuo (o en dicha posición) con otro aminoácido (por ejemplo, una sustitución conservadora o no conservadora), la inserción de uno o más aminoácidos adyacentes a dicho residuo/posición y la eliminación de dicho residuo/posición. Una "sustitución" de aminoácidos o variación del mismo se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido existente en una secuencia de aminoácidos predeterminada (inicial) con un residuo de aminoácido diferente. Generalmente y de modo preferente, la modificación da como resultado la alteración en al menos una actividad fisicoquímica del polipéptido variante en comparación con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de partida (o "tipo salvaje").

El término "variante modificada de forma conservadora" se aplica tanto a las secuencias de aminoácidos como a las de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes modificadas de forma conservadora se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas.

Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por tanto, en cada posición en la que se especifica una alanina mediante un codón, el codón se puede alterar en cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de forma conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en este documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón de un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Para las secuencias de polipéptidos, las "variantes modificadas de forma conservadora" incluyen sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia de polipéptidos que dan como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Se conocen en la técnica tablas de sustitución conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Dichas variantes modificadas de manera conservadora se suman y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecies y alelos. Los ocho grupos siguientes contienen aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)). En algunas modalidades, la frase "modificaciones de secuencia conservadoras" se utiliza para referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión de los dominios de unión de las proteínas diseñadas de la presente divulgación.

Una 'variante de proteína' o 'variante de una proteína' como se hace referencia en este documento, se refiere a una proteína que comprende una variación en la que uno o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 aminoácidos se han modificado. Una "variante funcional" de una proteína como se menciona en este documento, se refiere a una variante de proteína que comprende una modificación que da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos pero no hay cambio en la propiedad general de la proteína o en su función. Una "variante truncada" de una proteína o de un dominio de una proteína, como se hace referencia en este documento, se refiere a una versión abreviada de una proteína o del dominio proteico, pero la versión abreviada

de la proteína conserva la función de la proteína original. Para determinar si una variante funcional o variante truncada no tiene ningún cambio en la propiedad o función general, estas proteínas variantes pueden probarse frente a una proteína principal de longitud completa o no modificada para determinar su efecto en varios ensayos como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, promover la eferocitosis por células endoteliales en un ensayo de eferocitosis de células endoteliales humanas—células Jurkat, restaurar la eferocitosis alterada por macrófagos en un ensayo de eferocitosis de macrófagos humanos—neutrófilos, reducir el número de micropartículas plasmáticas por depuración en un ensayo de eferocitosis de micropartículas endoteliales humanas, y/o proporcionar protección contra lesión de múltiples órganos en un modelo de isquemia renal aguda.

Los términos "porcentaje de identidad" o "porcentaje de identidad de secuencia" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Dos secuencias son 'sustancialmente idénticas' y muestran 'identidad de secuencia' si dos secuencias tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, al menos 60% de identidad, opcionalmente al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad en una región específica, o, cuando no se especifica, en toda la secuencia), cuando se compara y alinea para una máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o región designada, por ejemplo medido utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que tiene al menos aproximadamente 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o sobre una región que tiene de 100 a 500 o 1000, o 2000 o 3000 o más nucleótidos de longitud, o alternativamente, 30 a 200, 300, 500, 700, 800, 900 o 1000 o más aminoácidos de longitud.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en una computadora, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan parámetros del programa del algoritmo de secuencia. Se pueden utilizar parámetros de programa predeterminados o se pueden designar parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

El término "ventana de comparación", como se utiliza en este documento, incluye referencia a un segmento de cualquiera de las posiciones contiguas de ácido nucleico o

aminoácido seleccionadas del grupo que comprende de 20 a 600, generalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más generalmente de aproximadamente 100 hasta aproximadamente 150 en donde se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén alineadas de manera óptima. Se conocen en la técnica métodos de alineación de secuencias para comparación. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2: 482c, mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol., 48: 443, mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (1988) PNAS USA, 85: 2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Brent *et al.*, (2003) Current Protocols in Molecular Biology).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, (1977) Nuc. Acids Res., 25: 3389–3402; y Altschul *et al.*, (1990) J. Mol. Biol., 215: 403–410, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) PNAS. USA, 90: 5873–5877). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual se produciría una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menos de aproximadamente 0,2, de modo más preferente menos de aproximadamente 0,01 y lo más preferente menos de aproximadamente 0,001.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci. 4: 11–17 (1988)) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de brecha de 12 y una penalización de brecha de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman & Wunsch (*supra*) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando una matriz Blossom

62 o una matriz PAM250, y un peso de brecha de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Un polipéptido es típicamente de modo sustancial idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solo por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones rigurosas.

El término "ácido nucleico" se utiliza aquí de manera intercambiable con el término "polinucleótido" y se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos o enlaces de la estructura modificada, que son sintéticos, naturales y no naturales, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de una manera similar a la nucleótidos de referencia. Los ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, péptido-ácidos nucleicos (PNA).

A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también incluye implícitamente variantes modificadas de manera conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzner *et al.*, (1991) *Nucleic Acid Res.*, 19: 5081; Ohtsuka *et al.*, (1985) *J Biol Chem.*, 260: 2605–2608; and Rossolini *et al.*, (1994) *Mol Cell Probes*, 8: 91–98). Como se utiliza en este documento, el término "secuencia de nucleótidos optimizada" significa que la secuencia de nucleótidos se ha alterado para codificar una secuencia de aminoácidos utilizando codones que son preferidos en la célula de producción, por ejemplo una célula de ovario de hámster chino (CHO). La secuencia de nucleótidos optimizada está diseñada para retener por completo la secuencia de aminoácidos codificada originalmente por la secuencia de nucleótidos de partida, que también se conoce como secuencia "parental". En modalidades particulares, las secuencias optimizadas en este documento se han diseñado para tener codones que se prefieren en las células CHO de mamíferos.

Proteínas de Fusión Terapéuticas

Dominios de unión a integrina

Las integrinas son receptores transmembrana que facilitan la adhesión célula-matriz extracelular (ECM). Tras la unión del ligando, las integrinas activan las vías de transducción de

señales que median señales celulares como la regulación del ciclo celular, la organización del citoesqueleto intracelular y el movimiento de nuevos receptores a la membrana celular (Giancotti & Ruoslahti (1999) *Science*, 285 (5430): 1028–32). La presencia de integrinas permite respuestas rápidas y flexibles a eventos en la superficie celular. Existen varios tipos de integrinas y una célula puede tener múltiples tipos diferentes en su superficie. Las integrinas tienen dos subunidades: α (alfa) y β (beta), cada una de las cuales penetra la membrana plasmática y posee varios dominios citoplasmáticos (Nermut MV *et al* (1988). *EMBO J.*, 7 (13): 4093–9). Un aminoácido ácido se presenta en el sitio de interacción de la integrina de muchas proteínas ECM, por ejemplo, como parte de la secuencia de aminoácidos Arginina–Glicina–Ácido aspártico ("RGD" en el código de aminoácidos de una letra). El motivo RGD se ha encontrado en numerosas proteínas de la matriz como fibronectina, fibrinógeno, vitronectina y osteopontina y ayuda en la adhesión celular. El motivo RGD se encuentra en una serie de proteínas en un dominio proteico conservado conocido como dominio similar a EGF, que deriva su nombre del factor de crecimiento epidérmico donde se describió por primera vez. El dominio similar a EGF es uno de los dominios más comunes que se encuentran en proteínas extracelulares (Hidai C (2018) *Open Access J Trans Med Res.*, 2 (2): 67–71) y algunos ejemplos de dominios similares a EGF que contienen un motivo de unión a RGD se enumeran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1: Ejemplos de proteínas que comprenden proteínas de dominio similar a EGF que contienen un motivo de unión a integrina RGD

Abreviatura	UniProtKB	Nombre	Referencia
EDIL3	O43854	EGF como repetición y dominio discoidina 3	Schürpf T <i>et al.</i> , (2012)
MFG–E8	Q08431	Proteína de factor 8 de glóbulos de grasa de leche–EGF	Taylor MR <i>et al.</i> , (1997)
NRG1	Q02297	Neuregulina–1	Leguchi K <i>et al.</i> , (2010)
IGFBP–1	P08833	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1	Haywood NJ <i>et al.</i> , (2017)
P2Y2R	P41231	Receptor de nucleótidos P2Y2	Erb L <i>et al.</i> , (2001)

El término 'dominio de unión a integrina' como se utiliza en el presente documento se refiere a un tramo de aminoácidos, o dominio de proteína, que tiene la función de unirse a integrinas. En una modalidad de la presente descripción, 'dominio de unión a integrina' como se utiliza en este documento se refiere a un tramo de aminoácidos, o dominio proteico, que tiene la función de unirse a las integrinas y que comprende un motivo RGD. En una modalidad de la presente descripción,

el dominio de unión a integrina es un dominio similar a EGF de MFG–E8 humano que tiene la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 2. En una modalidad alternativa de la presente descripción, el dominio de unión a integrina es un dominio similar a EGF de EDIL3 humano (cualquiera de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, o SEQ ID NO: 101); por ejemplo, donde los dominios similares a EGF se pueden encontrar dentro del tramo de aminoácidos 1–132 de la SEQ ID NO: 11.

El término "se une a integrinas" como se utiliza en este documento se refiere a una actividad de unión a integrinas. La actividad de unión a integrina se puede determinar mediante métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se describe un ensayo de adhesión de integrina en los Ejemplos, sección 3.2, en donde se determinó la adhesión de células de linfoma que expresan integrina $\alpha\beta 3$ marcadas con fluorescencia a proteínas de fusión terapéuticas de la presente descripción. Se considera que un dominio de unión a integrina tiene actividad de unión a integrina si tiene al menos un 10%, como por ejemplo al menos el 25%, al menos el 50%, al menos el 75%, de modo más preferente al menos el 80%, tal como al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% de la actividad de unión a integrina como se observa para la proteína MFG–E8 humana (SEQ ID NO: 1) cuando se prueba mediante el mismo método de determinación de la actividad respectiva, de modo preferente cuando se prueba utilizando el ensayo descrito en los Ejemplos, sección 3.2.

Dominios de unión a fosfatidilserina

"Fosfatidilserina" (PS), como se utiliza en este documento, se refiere al fosfolípido, que es un componente de la membrana celular. La PS se limita principalmente a la valva interna de la membrana celular, mientras que la fosfatidilcolina y la esfingomielina se localizan en gran parte en la valva externa. La distribución asimétrica de los fosfolípidos se mantiene mediante la acción de las flipasas (P4–ATPasas como ATP11A y 11C) en la membrana plasmática para translocar activamente la PS desde la valva exterior a la valva interior. La exposición de la superficie celular de PS se observa no solo en células apoptóticas, sino también en linfocitos activados, plaquetas activadas, eritrocitos envejecidos y algunas células cancerosas y las micropartículas respectivas (Sakuragi *et al.*, (2019) PNAS USA, 116(8): 2907–12). La exposición a PS puede ser un biomarcador de un estado patológico protrombótico, inflamatorio o isquémico (Pasalic *et al.*, (2018) J Thromb Haemost., 16(6): 1198–2010; Ma *et al.*, (2017) *supra*; Zhao *et al.*, (2016) *supra*. PS tiene una función en una multitud de vías de señalización celular y como fosfolípido esencial en la coagulación donde puede actuar como potenciador en la formación de la tenasa (factores IXa,

VIIIa y X) y protrombina (factores Xa, Va y protrombina) complejos (Spronk et al., (2014) Thromb Res. 133 (Suppl 1): S54–6). Posiblemente la función más conocida de la PS externalizada sigue siendo el marcador “cóme-me” (*'eat-me'*) para células fagocíticas como los macrófagos para absorber células apoptóticas, restos celulares o células activadas que exponen PS. El término 'dominio de unión a fosfatidilserina' o 'dominio de unión a PS', como se usa en este documento, se refiere a un tramo de aminoácidos, o dominio de proteína, que tiene la función de unirse a PS. En la Tabla 2 a continuación se pueden encontrar ejemplos de proteínas endógenas con dominios de unión a PS.

Tabla 2: Ejemplos de receptores/proteínas con dominios de unión a fosfatidilserina

Abreviatura	UniProt	Nombre	Dominio de unión a PS putativo	Referencia
EDIL3	O43854	EGF como repeticiones y dominios de discoidina 3	Dominios de discoidina C1–C2	Dasgupta et al., (2012)
MFG–E8	Q08431	proteína de factor 8 de glóbulos de grasa de la leche, lactadherina	Dominios de discoidina C1–C2	Andersen et al., (2000)
BAI1	O14514	Inhibidor de la angiogénesis específico del cerebro 1	Repeticiones de trombospondina tipo 1	Park et al., (2007)
TIM1	Q96D42	Inmunoglobulina de células T y proteína que contiene dominio de mucina 1	Dominio IgSF–V	Kobayashi et al., (2007)
TIM3	Q8TDQ0	Inmunoglobulina de células T y proteína 3 que contiene dominio de mucina	Dominio IgSF–V	Cao et al., (2007)
TIM4	Q96H15	Inmunoglobulina de células T y proteína 4 que contiene dominio de mucina	Dominio IgSF–V	Kobayashi et al., (2007)
Stab1/Stab2	Q9NY15/ Q8WWQ8	Stabilina–1 y –2	Repeticiones de dominios similares a EGF (EGFrps) en la región extracelular	Park SY et al., (2009)
TLT2	Q5T2D2	Receptor de activación expresado en la proteína 2 similar a las células mieloides	Dominio IgSF	de Freitas et al., (2012)
TREM2	Q9NZC2	Receptor activador expresado en células mieloides 2	Dominio IgSF–V	Takahashi et al., (2005)

CD300a	Q9U6N4	Molécula CD300a	Dominio IgSF-V	Simhadri <i>et al.</i> , (2012)
RAGE	Q15109	Receptor para productos finales de glicación avanzada		He <i>et al.</i> , (2011)
AxV	P08758	Anexina V		Ravanat <i>et al.</i> , (1992)
PSR		Receptor de fosfatidilserina		Mo <i>et al.</i> , (2003)
CD36	P16671	Glicoproteína plaquetaria 4,		Banesh <i>et al.</i> , (2018)
CD68	P34810	Receptor depurador Clase D		Chistiakov <i>et al.</i> , (2017)

En una modalidad de la presente descripción, el dominio PS se deriva de MFG-E8 humano que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 3. En una modalidad alternativa de la presente descripción, el dominio de unión a la integrina es un dominio de unión a PS de EDIL3 humana (SEQ ID NO: 11), donde el dominio de unión a PS comprende los aminoácidos 135–453 de la SEQ ID NO: 11.

La actividad de unión a PS se puede determinar mediante métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se describe un ensayo de unión a PS en los Ejemplos, sección 3.1, en el que se evaluó la unión de proteínas de fusión de la presente descripción a PS recubiertas en placas de microtitulación compitiendo contra la unión de MFG-E8 murino biotinilado. De acuerdo con la presente descripción, se considera que un dominio de unión a PS tiene actividad de unión a PS si tiene al menos un 10%, tal como por ejemplo al menos 25%, al menos 50%, al menos 75%, al menos 80%, de modo preferente al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% de la actividad de unión a PS como se observa para la proteína MFG-E8 humana mostrada en la SEQ ID NO: 1 cuando se prueba mediante el mismo método de determinación de la actividad respectiva, de modo preferente cuando se prueba utilizando el ensayo descrito en los Ejemplos, sección 3.1.

Proteínas puente

Hay una serie de proteínas endógenas que comprenden tanto un dominio de unión a integrina como un dominio de unión a PS. En la Tabla 3 a continuación se muestran ejemplos de tales "proteínas puente".

Tabla 3: Proteínas puente que contienen dominios de unión tanto a integrina como a fosfatidilserina

Abreviatura	UniProt	Nombre	Dominio de unión a PS putativa	Receptor en fagocitos	Referencia
EDIL3 (DEL-1)	O43854	Repeticiones tipo EGF y dominios de discoidina 3	Dominios de discoidina C1-C2	Integrinas ($\alpha v-\beta 2$)	Dasgupta <i>et al.</i> , (2012)
MFG-E8	Q08431	proteína de factor 8 de glóbulos de grasa de la leche, lactadherina	Dominios de discoidina C1-C2	integrinas ($\alpha v\beta 3/b5 \alpha 8\beta 1$)	Andersen <i>et al.</i> , (2000)
Pros1	P07225	Proteína S	Dominio del ácido γ -carboxiglutámico (Gla)	Tyro3 y Mer "factor de anticoagulación"	Stitt <i>et al.</i> , (1995)
Gas6	Q14393	Proteína específica de detención del crecimiento 6	Dominio Gla	Tyro3, Mer y AXL	Stitt <i>et al.</i> , (1995)

Para que tenga valor terapéutico, es útil si la proteína puente comprende un dominio de unión a integrina que reconoce integrinas en fagocitos que normalmente no son sensibles a la escisión o desprendimiento proteolítico como se ha observado en miembros de la familia TAM u otros receptores de unión a PS. Se ha demostrado que una proteína con un dominio de unión a PS y un dominio de unión a integrina, por ejemplo, MFG-E8 o su parólogo EDIL3/DEL1, induce eferocitosis *in vitro* y, por lo tanto, podría tener valor terapéutico como inductores de eferocitosis en AOI. Por el contrario, la proteína GAS6, por ejemplo, puede no ser particularmente eficaz para promover la eferocitosis en las AOI porque su receptor en los fagocitos (MerTK) se escinde proteolíticamente durante la inflamación y la infección, como se describe anteriormente.

Un ejemplo de una proteína puente, como se enumera en la Tabla 3 anterior, es MFG-E8, que es una de las principales proteínas que se encuentran en la membrana del glóbulo de grasa de la leche (MFGM). MFG-E8 se expresa y secreta por varios tipos diferentes de células (por ejemplo, células epiteliales mamarias, células vasculares, células epiteliales del epidídimo, células del músculo liso aórtico, macrófagos activados, endometrio estimulado y células dendríticas inmaduras) y tejidos (por ejemplo, corazón, pulmones, glándulas mamarias, bazo, intestinos, hígado, riñón, cerebro, sangre y endotelio). La proteína MFG-E8 también se conoce por varios nombres diferentes, como lactadherina, BP47, componentes 15/16, MFGM, MGP57/53, PAS-6/PAS-7 glicoproteína, proteína de la pared celular SED1, proteína de la superficie del espermatozoide.

SP47, antígeno del epitelio mamario BA46 y O-acetil GD3 gangliósido sintasa (AGS). El gen MFG-E8 se encuentra en el cromosoma 1 en ratas, el cromosoma 7 en ratones y el cromosoma 15 en humanos. El corte y empalme alternativo del pre-ARNm de MFG-E8 da como resultado tres isoformas de la proteína humana y dos formas de ARNm, las variantes largas y cortas se expresan en las glándulas mamarias de ratón. El gen humano MFG-E8 (UniProtKB – Q08431) codifica una proteína que tiene 387 residuos de largo que se procesa para formar múltiples productos proteicos. La secuencia de aminoácidos del MFG-E8 humano, que comprende el péptido señal (residuos 1–23; subrayado), dominio similar a EGF (residuos 24–67; en cursiva), dominio C1 (residuos 70–225; negrita) y dominio C2 (residuos 230–387; negrita y subrayado), se proporciona a continuación:

MPRPRLAAL CGALLCAPSL LVALDICKN PCHNGGLCEE ISQEVGRDVF PSYTCTCLKG
YAGNHCEKTC *VEPLGLENGN IANSQIAASS VRVTFGLQLH WPELARLNR AGMVNAWTPS*
SNDDNPWIVQ NLLRRMWVTG VVTQGASRLA SHEYLKAFKV AYSLNGHEFD FIHDVNKKHK
EFVGNWNKNA VHVNLFETPV EAQYVRLYPT SHTACTLRF ELLGCELNGC ANPLGLKNNS
IPDKQITASS SYKTWGLHLF SWNPSYARLD KQGNFNAWVA GSYGNDQWLQ VDLGSSKEVT
GIITQGARNF GSVQFVASYK VAYSNDSANW TEYQDPRTGS SKIFPGNWDN
HSKKNLFTET PILARYVRIL PVAWHNRIL RLELLGC (SEQ ID NO: 1).

MFG-E8 carece de la función transmembrana que tiene MFGM y, por lo tanto, sirve como proteína de membrana periférica. El MFG-E8 humano consta de un dominio similar al EGF N-terminal (SEQ ID NO: 2) que se une a las integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$ expresadas en fagocitos y un dominio de unión a PS (SEQ ID NO: 3) que comprende dos F5/8-discoidina subdominios (C1 y C2) que se unen con alta afinidad a los fosfolípidos aniónicos. La unión a la integrina es el resultado del motivo RGD localizado en los residuos 46–48 de MFG-E8 humano (SEQ ID NO: 1). Las células apoptóticas, los restos celulares, las células hiperactivadas y la mayoría de las micropartículas (MP) exponen PS y son objetivo de MFG-E8 que, actuando como molécula puente, opsoniza estas células y micropartículas y las une a las integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$ en los fagocitos. Esta acción puente desencadena un programa de absorción eficiente que conduce a la internalización de las células, los desechos y las micropartículas. Las proteínas que se encuentran en MFGM están altamente conservadas en todas las especies. La estructura de la proteína MFG-E8 varía según la especie; todas las especies actualmente conocidas contienen dos dominios C pero difieren en el número de dominios similares a EGF. Por ejemplo, la proteína MFG-E8 humana contiene un dominio similar a EGF, mientras que la MFG-E8 bovina y la MFG-E8 murina (SEQ ID NO: 68) tienen dos dominios similares a EGF, y el pollo, la rana y el pez cebra tienen tres dominios similares a EGF. Los dominios de MFG-E8, se han propuesto previamente como constituyentes de la terapéutica, en particular los dominios de unión a PS (Kooijmans *et al.*, (2018) *Nanoscale*, 10 (5): 2413–2426)

y los fragmentos de MFG–E8 se han descrito para actuar en modelos de fibrosis (solicitud de patente estadounidense US2018/0334486).

La captación no flogística de células moribundas, restos y micropartículas por fagocitos profesionales y no profesionales juega un papel crítico en la homeostasis después de una lesión tisular (Greenlee - Wacker (2016) *supra*). La importancia de la depuración apropiada se hizo más evidente en modelos genéticos en los que los ratones knockout MFG–E8 mostraron, por ejemplo, un mayor número de células moribundas (no depuradas) en los tejidos, una respuesta inflamatoria exagerada en modelos de enfermedades como la sepsis neonatal, la autoinmunidad, la angiogénesis deficiente y la alteración curación de heridas (Hanayama *et al.*, (2004) *Science*, 204(5474): 1147–50; Das *et al.*, (2016) *J Immunol.*, 196(12): 5089–5100; Hansen *et al.*, (2017) *J Pediatr Surg.*, 52(9): 1520–7).

Además, se ha demostrado que MFG–E8 genera un entorno tolerogénico mediante la supresión de la activación y proliferación de células T, la inhibición de las subpoblaciones Th1, Th2 y Th17 al tiempo que aumenta los subconjuntos de células T reguladoras (Tregs). Curiosamente, las Treg contribuyen a la resolución de la inflamación al inducir eferocitosis por macrófagos (Proto *et al.*, (2018) *Immunity*, 49 (4): 666–77). Se ha descrito que MFG–E8 promueve el injerto alogénico de tejidos derivados de células madre embrionarias a través de la barrera MHC (Tan *et al.*, (2015) *Stem Cell Reports*, 5 (5): 741–752). MFG–E8 también tiene múltiples usos nutricionales, que ayudan a promover el desarrollo de tejidos y la protección contra agentes infecciosos. Las glicoproteínas como MFG–E8 son nutraceuticos potenciales que mejoran la salud para aplicaciones alimentarias y farmacéuticas. MFG–E8 también se puede combinar con otros nutrientes (por ejemplo, probióticos, micelas de proteína de suero, ácido alfa–hidroxisocaproico, citrulina y ácidos grasos de cadena ramificada).

Dominio de solubilización

Como se describe en el presente documento, las proteínas de fusión terapéuticas de la presente descripción comprenden un dominio de unión a integrina y un dominio de unión a PS. Además, las proteínas de fusión también comprenden un dominio adicional que confiere una serie de propiedades deseables a la proteína de fusión. Este dominio adicional, que se ha denominado "dominio de solubilización" para los fines de esta solicitud, confiere propiedades biológicas mejoradas, tales como mayor solubilidad, menor agregación y mayor bioactividad. Como resultado, la proteína de fusión muestra perfiles farmacocinéticos deseables. Además, la presencia de un dominio de solubilización mejora la estabilidad de la proteína de fusión terapéutica y da como resultado una expresión mejorada de la proteína de fusión en comparación con la proteína de tipo

salvaje en sistemas de expresión celular, como se muestra por un aumento en el rendimiento después de la purificación.

La presencia de un dominio de solubilización también puede conferir una vida media prolongada a la proteína de fusión terapéutica. Por ejemplo, muchos fármacos proteicos están unidos al polietilenglicol (PEG), reCODE PEG, andamio de anticuerpos, ácido polisálico (PSA), hidroxietil almidón (HES) y proteínas séricas, tales como albúmina, IgG y FcRn, para extender su vida media plasmática y para lograr efectos terapéuticos mejorados (Kim *et al.*, (2010) J Pharmacol Exp Ther., 334: 682–92; Weimer *et al.*, (2008) Thromb Haemost. 99: 659–67; Dumont *et al.*, (2006) BioDrugs, 20: 151–60; Schellenberger *et al.*, (2009) Nat Biotechnol., 27: 1186–90).

En algunas modalidades, el dominio de solubilización es una proteína de albúmina tal como albúmina de suero humano (HSA; SEQ ID NO: 4) o variantes de la misma. Por ejemplo, HSA que comprende la sustitución de aminoácidos C34S para disminuir la propensión a la agregación (SEQ ID NO: 5), o dominios de HSA tales como HSA D3; (SEQ ID NO: 6). La HSA tiene una vida media sérica muy larga debido a varios factores, incluido su tamaño relativamente grande que reduce la filtración renal y su característica de unión al receptor de Fc neonatal (FcRn), evitando así la degradación intracelular. También se ha propuesto el uso de fragmentos N-terminales de HSA para fusiones con polipéptidos (por ejemplo, solicitud de patente EP399666). Por consiguiente, la fusión o conjugación genética o química de moléculas con albúmina puede estabilizar o extender la vida útil y/o retener la actividad de una molécula durante períodos prolongados de tiempo en solución, *in vitro* y/o *in vivo*. Se pueden encontrar métodos adicionales relacionados con fusiones de HSA, por ejemplo, en las solicitudes de patente internacional WO2001/077137 y WO2003/060071.

En algunas modalidades, el dominio de solubilización comprende un dominio Fc de anticuerpo tal como Fc-inmunoglobulina G1 humana (Fc-IgG1; SEQ ID NO: 7). El dominio Fc también puede modificarse, por ejemplo, utilizando modificaciones basadas en el botón en el ojal (KiH) para mejorar la heterodimerización de Fc mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos complementarios en el dominio CH3 del Fc. Por ejemplo, la sustitución T366W para crear un 'botón' en un dominio CH3 y las sustituciones T366S, L368A e Y407V para crear un 'ojal' en el otro dominio CH3 (Merchant *et al* (1998) Nat. Biotechnol., 16 (7): 677–81; numeración EU IgG1). Las modificaciones adicionales que se pueden incluir en el dominio Fc solas o combinadas con modificaciones para mejorar la heterodimerización pueden comprender, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos en cisteína para crear un enlace cisteína adicional, por ejemplo S354C y/o Y349C, y sustituciones de aminoácidos para reducir o eliminar la unión a los receptores Fcγ y complementar la proteína C1q, para "silenciar" la función efectora inmunitaria. La

denominada doble mutación "LALA" (L234A junto con L235A; numeración EU) da como resultado funciones efectoras disminuidas (Lund *et al.*, (1992) Mol Immunol., 29: 53–9). Alternativamente, la doble mutación "DAPA" (D265A junto con P329A; numeración de la EU) da como resultado funciones efectoras disminuidas. En una modalidad de la presente descripción, el dominio Fc puede comprender las sustituciones de aminoácidos D265A, P329A para el silenciamiento de Fc y/o las sustituciones de aminoácidos KiH T366W (botón) o T366S, L368A e Y407V (ojal). En una modalidad, el dominio Fc se deriva de IgG1 humana y comprende las sustituciones de aminoácidos D265A, P329A (SEQ ID NO: 8). En otra modalidad, el dominio Fc se deriva de IgG1 humana y comprende las sustituciones de aminoácidos D265A, P329A, S354C y la sustitución de aminoácidos T366W (Fc–IgG1–botón; SEQ ID NO: 9). En otra modalidad, el dominio Fc se deriva de IgG1 humana y comprende las sustituciones de aminoácidos D265A, P329A, Y349C y las sustituciones de aminoácidos T366S, L368A e Y407V (Fc–IgG1–ojal; SEQ ID NO: 10).

En algunas modalidades, el dominio de solubilización comprende un dominio Fc de anticuerpo derivado de IgA, IgD, IgE o IgM humanas.

En algunas modalidades, el dominio de solubilización comprende SUMO (Modificador de tipo ubiquitina pequeño), ubiquitina, GST (glutación S–transferasa) o variantes de los mismos.

Unión y Orientación de Dominios de Proteínas de Fusión Terapéuticas

El dominio de unión a integrina, el dominio de unión a PS y el dominio de solubilización de las proteínas de fusión de la presente descripción están unidos. Como se utiliza en este documento, el término "unido" o "que une" se refiere a un dominio de la proteína de fusión que se une, directa o indirectamente, a otro dominio de la proteína de fusión. La unión directa es una forma de enlace y se denomina en el presente documento "fusionado" o "fusión". Utilizando una molécula que tiene la forma A–B–C como ejemplo: el dominio A está unido directamente al dominio B y unido directamente al dominio C. Como tal, el dominio A también puede describirse como fusionado al dominio B que está fusionado al dominio C. Como otro ejemplo, el dominio A está unido directamente al dominio B e indirectamente unido al dominio C. Como tal, el dominio A también puede describirse como fusionado al dominio B, que está unido indirectamente por un ligador interno al dominio C.

En algunas modalidades, el enlace es un enlace directo y, por tanto, los dominios están fusionados entre sí. En algunas modalidades, un dominio de unión a integrina se fusiona con un dominio de unión a PS que se fusiona con un dominio de solubilización. Específicamente, el dominio de unión a PS (por ejemplo, subdominios de discoidina C1–C2) se fusiona con el extremo C–terminal del dominio de unión a integrina (por ejemplo, un dominio similar a EGF) y se fusiona

con el extremo N-terminal del dominio de solubilización (por ejemplo, HSA). En algunas modalidades, un dominio de solubilización se fusiona con un dominio de unión a integrina que se fusiona con un dominio de unión a PS. Específicamente, el dominio de unión a integrina (por ejemplo, un dominio similar a EGF) se fusiona con el extremo C-terminal del dominio de solubilización (por ejemplo, HSA) y se fusiona con el extremo N-terminal del dominio de unión a PS (por ejemplo, subdominios de discoidina C1–C2). En algunas modalidades, un dominio de unión a integrina se fusiona con un dominio de unión a PS que comprende subdominios de discoidina C1–C2 y se inserta un dominio de solubilización entre el subdominio de discoidina C1–C2. Específicamente, el término C del dominio de unión a la integrina (por ejemplo, un dominio similar a EGF) se fusiona con el término N del subdominio de discoidina C1 y el término C del subdominio de discoidina C1 se fusiona con el término N del dominio de solubilización (por ejemplo, HSA) y el C-terminal del dominio de solubilización se fusiona con el N-terminal del subdominio de discoidina C2. En otra modalidad, un dominio de unión a integrina se fusiona con un dominio de solubilización que se fusiona con un dominio de unión a PS. Específicamente, el dominio de solubilización (por ejemplo, HSA) se fusiona al C-terminal del dominio de unión a integrina (por ejemplo, dominio similar a EGF) y al N-terminal del dominio de unión a PS (por ejemplo, subdominios de discoidina C1–C2). En una modalidad, HSA se fusiona con el C-terminal de un dominio similar a EGF y se fusiona con el N-terminal del dominio de discoidina C1.

En algunas modalidades, el dominio de solubilización (por ejemplo, HSA) se fusiona entre un dominio de unión a integrina y un dominio de unión a PS. En algunas modalidades, el dominio de unión a integrina se localiza en el N-terminal de la proteína de fusión y el dominio de unión a PS se ubica en el C-terminal de la proteína de fusión.

En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende una primera región que contiene un dominio de unión a integrina, por ejemplo dominio similar a EGF, una segunda región que contiene un dominio de solubilización (por ejemplo, HSA o Fc) y una tercera región que contiene el dominio de unión a PS, por ejemplo dominio de discoidina C1 y/o C2. En algunas modalidades, el dominio de unión a integrina se localiza en el N-terminal de la proteína de fusión y el dominio de unión a PS se ubica en el C-terminal de la proteína de fusión.

En algunas modalidades, el dominio de solubilización (por ejemplo, HSA o Fc) es HSA.

En algunas modalidades, el dominio de solubilización es HSA, o su variante funcional.

En algunas modalidades, el dominio de solubilización es el anticuerpo Fc–inmunoglobulina G1 (Fc–IgG1; SEQ ID NO: 7).

En una modalidad preferida, HSA que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 5 se fusiona con el C-terminal del dominio similar a EGF de MFG–E8

y se fusiona con el N-terminal del dominio de unión a PS de MFG-E8. En una modalidad, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 46 (FP068). En una modalidad, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 48 (FP776).

En una modalidad alternativa, HSA que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la EC. ID. NO: 5 se fusiona con el C-terminal del dominio similar a EGF de EDIL3 y se fusiona con el N-terminal del dominio de unión a PS de EDIL3. En una modalidad, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 70 (FP1068). En una modalidad, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 69 (FP1776).

En algunas modalidades, el enlace se realiza mediante un ligador polipeptídico y un ligador polipeptídico que, por ejemplo, une un dominio de solubilización a un dominio de unión a PS en una proteína de fusión de la presente descripción se denomina "ligador externo". Estos ligadores externos comprenden típicamente glicina (G) y/o serina (S) y también pueden comprender glicina y leucina (GL) o glicina y valina (GL). En algunas modalidades, el ligador comprende múltiplos de residuos G y S, por ejemplo, G_2S y múltiplos del mismo como $(G_2S)_4$ como se establece en la SEQ ID NO: 62, $(GS)_4$ como se indica en la SEQ ID NO: 63, G_4S como se establece en la SEQ ID NO: 64 o $(G_4S)_2$ como se indica en la SEQ ID NO: 65.

En algunas modalidades, un ligador externo se fusiona entre el C-terminal de un dominio de unión a integrina y el N-terminal de un dominio de solubilización. Específicamente, un ligador externo se fusiona con el C-terminal de un dominio similar a EGF y el N-terminal de HSA. En algunas modalidades, un ligador externo se fusiona entre el C-terminal de un dominio de solubilización y el N-terminal de un dominio de unión a PS. Específicamente, un ligador externo se fusiona con el C-terminal de HSA y el N-terminal del dominio de unión a PS. En algunas modalidades, un ligador externo se fusiona entre el C-terminal de un dominio de unión a integrina y el N-terminal de un dominio de solubilización, y un ligador externo adicional se fusiona entre el C-terminal del dominio de solubilización y el N-terminal de un dominio de unión a PS. Específicamente, un ligador externo se fusiona con el C-terminal de un dominio similar a EGF y el N-terminal de HSA, y un ligador externo adicional se fusiona con el C-terminal de HSA y el N-terminal de un dominio de unión a PS.

En algunas modalidades, un ligador externo que comprende GS se fusiona al C-terminal de un dominio de unión a integrina y al N-terminal de un dominio de solubilización. En algunas modalidades, un ligador externo que comprende GL se fusiona al C-terminal de un dominio de solubilización y al N-terminal de un dominio de unión a PS. En algunas modalidades, un ligador

externo que comprende $(G_2S)_4$ (SEQ ID NO: 62) se fusiona al C-terminal de un dominio de solubilización y al N-terminal de un dominio de unión a PS. En algunas modalidades, un ligador externo que comprende G_4S (SEQ ID NO: 64) se fusiona al C-terminal de un dominio de solubilización y al N-terminal de un dominio de unión a PS. En algunas modalidades, un ligador externo que comprende $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO: 65) se fusiona al C-terminal de un dominio de solubilización y al N-terminal de un dominio de unión a PS.

En una modalidad, un ligador externo que comprende GS se fusiona al C-terminal de un dominio similar a EGF y al N-terminal de HSA. Una proteína de fusión de la presente descripción que comprende esta estructura tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 42 (FP330).

En una modalidad, un ligador externo que comprende GS se fusiona al C-terminal de un dominio similar a EGF y al N-terminal de HSA, y se fusiona un ligador externo adicional que comprende $(GS)_4$ (SEQ ID NO: 63) al C-terminal de HSA y al N-terminal de un dominio de unión a PS.

En una modalidad, un ligador externo que comprende GS se fusiona al C-terminal de un dominio similar a EGF y al N-terminal de HSA, y se fusiona un ligador externo adicional que comprende $(G_2S)_4$ (SEQ ID NO: 62) al C-terminal de HSA y al N-terminal de un dominio de unión a PS. Una proteína de fusión de la presente descripción que comprende esta estructura tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 42 (FP330).

En una modalidad, un ligador externo que comprende GS se fusiona al C-terminal de un dominio similar a EGF y al N-terminal de HSA. El C-terminal de HSA se fusiona directamente con el N-terminal de un dominio de unión a PS.

En una modalidad, un ligador externo que comprende GS se fusiona al C-terminal de un dominio similar a EGF y al N-terminal de HSA, y un ligador externo adicional que comprende G_4S (SEQ ID NO: 64) se fusiona al C-terminal de HSA y al N-terminal de un dominio de unión a PS. Una proteína de fusión de la presente descripción que comprende esta estructura tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 54 (FP811).

En una modalidad, un ligador externo que comprende GS se fusiona al C-terminal de un dominio similar a EGF y al N-terminal de HSA, y se fusiona un ligador externo adicional que comprende $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO: 65) al C-terminal de HSA y al N-terminal de un dominio de unión a PS. Una proteína de fusión de la presente descripción que comprende esta estructura tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 56 (FP010).

En algunas modalidades, una etiqueta His se fusiona con un ligador externo que comprende GS ($GS-6xHis$; SEQ ID NO: 66) que se fusiona con el C-terminal de un dominio de

unión a PS. En una modalidad, una proteína de fusión de la presente descripción que comprende una etiqueta His tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 44 (FP278) o SEQ ID NO: 60 (FP114 o FP260).

Propiedades Funcionales de las Proteínas de Fusión Terapéuticas

La presente descripción proporciona proteínas de fusión derivadas de MFG-E8 humano y que son eficaces para promover la eferocitosis y, por lo tanto, son activas para eliminar los impulsores clave de la inflamación sistémica y la patología microvascular. Como se establece en los Ejemplos, se ha demostrado que las proteínas de fusión que tienen la estructura general EGF-HSA-C1-C2 son eficaces en varios ensayos de eferocitosis. Por ejemplo, las proteínas de fusión han demostrado ser eficaces para restaurar la eferocitosis de macrófagos alterada por lipopolisacáridos (LPS) o *S. aureus* y potenciando la eferocitosis de micropartículas y células moribundas por las células endoteliales. Las proteínas de fusión también han demostrado ser eficaces para proteger la función renal y proteger contra la pérdida de peso corporal en un modelo de ratón de lesión renal aguda.

Secuencias de Proteínas Ejemplares

Las secuencias de aminoácidos de la Tabla 4 incluyen ejemplos de proteínas de fusión terapéuticas de la presente descripción, así como porciones de las mismas.

En todo el texto de esta solicitud, si hubiera una discrepancia entre el texto de la memoria descriptiva (por ejemplo, la Tabla 4) y la lista de secuencias, prevalecerá el texto de la memoria descriptiva.

Tabla 4. Secuencias de Proteínas Ejemplares

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
1	MFG-E8 Humano	MPRPRLAALCGALLCAPSLLVALDICKNPCHNGGLCEEISQEVRGDVFPSTCTCLKGYAGNHCETKCVEPLGLENGNIANSQIAASSVRVTFLGLQHWVPELARLN RAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVA YSLNGHEFDIHDVNNKKHKEFVGNWNKNNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTA CTRFELLGCELNGCANPLGLKNNIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLD KQGNFNAWWAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAY SNDSANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHSKKNLFETPILARYVRILPVAWHNR IALRLELLGC
2	Dominio similar a EGF de MFG-E8	LDICKNPCHNGGLCEEISQEV RGDV FPSYCTCTCLKGYAGNHCETK

3	Dominio de unión a PS de MFG-E8 (C1-C2 sub-dominios)	CVEPLGLENGNIANSQIAASSVRVTFGLQHWVPELARLN RAGMVNAWTPSSND DNPWIQVNLLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDHVDNK KHKEFVGNWNKNVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCA NPLGLKNN SIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYG NDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSND SANWTEYQDPR TGSSKIFPGNWDNHSKKNLFETPILARYVRILPVAWHNRIALRLELLGC
4	HSA de tipo salvaje	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCFEDHVKL VNEVTEFAKTCVA DESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQH KDD NPNLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKA AFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVA RLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSIS SKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFL GMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVE EPQNL IKQNC ELFELGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKA VMDDFAAFVEKCKCKADDKETCFAEEGKKLVAAASQAAL
5	HSA (C34S)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVA DESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQH KDD NPNLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKA AFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVA RLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSIS SKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFL GMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVE EPQNL IKQNC ELFELGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKA VMDDFAAFVEKCKCKADDKETCFAEEGKKLVAAASQAAL
6	HSA D3	LVEEPQNL IKQNC ELFELGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCCKHPEAKRMPCAEDCLSVFLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCF SALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQL KAVMDDFAAFVEKCKCKADDKETCFAEEGKKLVAAASQAALGL
7	Fc-IgG1 de tipo salvaje	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
8	Fc-IgG1 silente	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
9	Fc-IgG1 Botón	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
10	Fc-IgG1 Ojal	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
11	EDIL3 Humano	DICDPNPCENG GICLPLGADGSFSCECPDGFTDPNCSSVVEVASDEEEPT SAGP CTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQH NINECEVEPCKNG GICTDLVANYSCECPGEF MGRNCQYKCSGPLGIEGGIISNQQITASSTHRALFGL

		QKWYPYYARLNKKGLINAWTAAENDRWPWIQINLQRKMRVTGVITQGAKRIGSP EYIKSYKIAYSNDGKTWAMYKVKGNTNEDMVFRGNIDNNTPYANSFTPPIKAQYVR LYPQVCRRHCTLRMELLGCELSGCSEPLGMKSGHIQDYQITASSIFRTLNMDF TWEPRKARLDKQGVNAWTSQHNDQSQWLQVDLLVPTKVTGIITQGAKDFGHV QFVGSYKLAYSNDGEHWTVYQDEKQRKDKVFQGNFDNDTHRKNVIDPPIYARHI RILPWSWYGRITLRSELLGCTEEE
12	FP050 EDIL3 EGF- HSA-C1-C2	DICDPNPCENGIGICLPLADGSFSCPCPDGFTDPNCSSVVEVASDEEEPTSGAP CTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQHINECEVEPCKNG GICTDLVANYSCECPGEFMRNCQYKGSADAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI FAQYLQQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEET FLKKYLEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTGCCQAADKAACLLPKLDELDE GKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT TECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDE MPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAK TYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNA LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEYDLSVVLNQL CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICT LSEKERQIKKQATLVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF EGKKLVAASQAALGLGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGG GLQKWYPYYARLNKKGLINAWTAAENDRWPWIQINLQRKMRVTGVITQGAKRIG SPEYIKSYKIAYSNDGKTWAMYKVKGNTNEDMVFRGNIDNNTPYANSFTPPIKAQY VRLYPQVCRRHCTLRMELLGCELSGCSEPLGMKSGHIQDYQITASSIFRTLNM MFTWEPKARLDKQGVNAWTSQHNDQSQWLQVDLLVPTKVTGIITQGAKDFG HVQFVGSYKLAYSNDGEHWTVYQDEKQRKDKVFQGNFDNDTHRKNVIDPPIYA RHIRILPWSWYGRITLRSELLGC
84	EDIL3 Dominio similar a EGF 1[EDIL3]-HSA- C1-C2[EDIL3]	DICDPNPCENGIGICLPLADGSFSCPCPDGFTDPNCSSVVEVASDEEEPTGSDA HKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADE SAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNP NLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAA TECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARL SQRFPKAEFAEVSKLVTDLT TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDE MPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEE PQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKC CKHPEAKRMPCAEYDLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATLVELVKHKPKATKEQLKAV MDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAALGLGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGG GPLGIEGGIISNQITASSTHRALFGLQKWYPYYARLNKKGLINAWTAAENDRWP WIQINLQRKMRVTGVITQGAKRIGSPEYIKSYKIAYSNDGKTWAMYKVKGNTNEDM VFRGNIDNNTPYANSFTPPIKAQYVRLYPQVCRRHCTLRMELLGCELSGCSEPL GMKSGHIQDYQITASSIFRTLNMDFMFTWEPKARLDKQGVNAWTSQHNDQSQ WLQVDLLVPTKVTGIITQGAKDFGHVQFVGSYKLAYSNDGEHWTVYQDEKQRK DKVFQGNFDNDTHRKNVIDPPIYARHIRILPWSWYGRITLRSELLGC
85	EDIL3 Dominio similar a EGF 2[EDIL3]-HSA- C1-C2[EDIL3]	SAGPCTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQHGSADAHKSEV AHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLRLV RPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTGCCQA ADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPK AEFAEVSKLVTDLT TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDE MPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEE PQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAK RMPCAEYDLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATLVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAF VEKCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAALGLGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGG GPLGIEGGIISNQITASSTHRALFGLQKWYPYYARLNKKGLINAWTAAENDRWP WIQINLQRKMRVTGVITQGAKRIGSPEYIKSYKIAYSNDGKTWAMYKVKGNTNEDM VFRGNIDNNTPYANSFTPPIKAQYVRLYPQVCRRHCTLRMELLGCELSGCSEPL GMKSGHIQDYQITASSIFRTLNMDFMFTWEPKARLDKQGVNAWTSQHNDQSQ WLQVDLLVPTKVTGIITQGAKDFGHVQFVGSYKLAYSNDGEHWTVYQDEKQRK DKVFQGNFDNDTHRKNVIDPPIYARHIRILPWSWYGRITLRSELLGC

		IISNQQTASSTHRALFGLQKWYPYYARLNKKGLINAWTAAENDRWPWIIQINLQR KMRVTGVITQGAKRIGSPEYIKSYKIAYSNDGKTWAMYKVKGTTNEDMVFRGNID NNTPYANSFTPIKAQYVRLYPQVCRRHCTLRMELLGCELSGCSEPLGMKSGHI QDYQITASSIFRTLNDMDFTWEPRKARLDKQGKVNAWTSQHNDQSQWLQVDLL VPTKVTGIITQGAKDFGHVQFVGSYKLAYSNDGEHWTVYQDEKQRKDKVFQGN FDNDTHRKNVIDPPIYARHIRILPWSWYGRITLRSELLGC
86	EDIL3 Dominio similar a EGF 3[EDIL3]–HSA– C1–C2[EDIL3]	NINECEVEPCKNGGICTDLVANYSCCEPGEFMGRNCQYKGSDAHKSEVAHRFK DLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLH TLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKKDDNPPLRVRPEV DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCECCQAADKA ACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFA EVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLL EKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRH PDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNC LFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMP CAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKE FNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEK CCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSGGSGGSGGSGGSCGPLGIEGGIISN QQITASSTHRALFGLQKWYPYYARLNKKGLINAWTAAENDRWPWIIQINLQRKMR VTGVITQGAKRIGSPEYIKSYKIAYSNDGKTWAMYKVKGTTNEDMVFRGNIDNNT YANSFTPIKAQYVRLYPQVCRRHCTLRMELLGCELSGCSEPLGMKSGHIQDYQ ITASSIFRTLNDMDFTWEPRKARLDKQGKVNAWTSQHNDQSQWLQVDLLVPTK VTGIITQGAKDFGHVQFVGSYKLAYSNDGEHWTVYQDEKQRKDKVFQGNFDND THRKNVIDPPIYARHIRILPWSWYGRITLRSELLGC
87	EDIL3 Dominio similar a EGF 1– 2[EDIL3]–HSA– C1–C2[EDIL3]	DICDPNPCENGIGICLPLGADGSFSCECPDGFTDPNCSSVVEVASDEEEPTSAGP CTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQHGSDAHKSEVAHRF KDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSL HTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKKDDNPPLRVRPE VDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCECCQAADK AACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARR HPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNC ELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRM PCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSGGSGGSGGSGGSCGPLGIEGGIIS NQQTASSTHRALFGLQKWYPYYARLNKKGLINAWTAAENDRWPWIIQINLQRKM RVTGVITQGAKRIGSPEYIKSYKIAYSNDGKTWAMYKVKGTTNEDMVFRGNIDNNT PYANSFTPIKAQYVRLYPQVCRRHCTLRMELLGCELSGCSEPLGMKSGHIQDY QITASSIFRTLNDMDFTWEPRKARLDKQGKVNAWTSQHNDQSQWLQVDLLVPT KVTGIITQGAKDFGHVQFVGSYKLAYSNDGEHWTVYQDEKQRKDKVFQGNFDN DTHRKNVIDPPIYARHIRILPWSWYGRITLRSELLGC
88	EDIL3 Dominio similar a EGF 2– 3[EDIL3]–HSA– C1–C2[EDIL3]	SAGPCTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQHININECEVEP CKNGGICTDLVANYSCCEPGEFMGRNCQYKGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKA LVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKKDDNPPLRVRPEVDVMCTAFHD NEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVE NDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLRL LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKF QNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVL NQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHA DICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKET CFAEEGKKLVAASQAALGLGGSGGSGGSGGSGGSCGPLGIEGGIISNQQTASSTH

		RALFGLQKWYPYYARLNKKGLINAWTAAENDRWPWIQINLQRKMRVTGVITQGA KRIGSPEYIKSYKIAYSNDGKTWAMYKVKGTNEDMVFRGNIDNNTPYANSFTPI KAQYVRLYPQVCRRHCTLRMELLGCELSGCSEPLGMKSGHIQDYQITASSIFRTL NMDMFTWEPRKARLDKQGVNAWTS GHNDQS QWLQVDLLVPTKVTGIITQGAK DFGHVQFVGSYKLAYSNDGEHWT VYQDEKQRKDKVFQGNFDNDTHRKNVIDP PIYARHIRILPWSWYGRITLRSELLGC
89	EDIL3 Dominio similar a EGF 1– 3[EDIL3]–HSA– C1–C2[EDIL3]	DICDPNPCENGGICLPLADGSFSCECPDGFTDPNCSSVVEVASDEEEPTNINE CEVEPCKNGGICTDLVANYSCCEPGEFMGRNCQYKGS DAHKSEVAHRFKDLGE ENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFG DKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQH KDDNP NLPRLVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKLYE IARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFECCQAADKAACLLP KLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKL VTDLTKVHTECCHGDLLE CADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCI AEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVV LLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLG EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYL SVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADD KETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGSGSGSGSGSGGSIISNQITAS STHRALFGLQKWYPYYARLNKKGLINAWTAAENDRWPWIQINLQRKMRVTGVIT QGAKRIGSPEYIKSYKIAYSNDGKTWAMYKVKGTNEDMVFRGNIDNNTPYANSF TPIKAQYVRLYPQVCRRHCTLRMELLGCELSGCSEPLGMKSGHIQDYQITASSI FRTL NMDMFTWEPRKARLDKQGVNAWTS GHNDQS QWLQVDLLVPTKVTGIIT QGAKDFGHVQFVGSYKLAYSNDGEHWT VYQDEKQRKDKVFQGNFDNDTHRKN VIDPPIYARHIRILPWSWYGRITLRSELLGC
13	FP050 Ácido nucleico	gacatctgcgaccccaatccttgcgagaatggcggcatttgcctgctggactggccgatggcagcttctctgtga atgccccgatggcttcacagaccccaattgcagctctgtggtggaagtggccagcgacgaggaagaacctaca agcgtggccctgcacaccaatccatgtcataatggcggaacctgcgagatcagcgaggcctacagaggcg ataccttcacgtgctacgtgtgcaagtggccagaggctcaatggcatccactgccagcacaacatcaacgagt gcgaggtggaacctatgaagaacggcgcatctgtaccgacctggtggccaattactctgcgagtgccctggc gagttcatgggcagaaactgccagtacaagggatccgacgctcacaagtctgaggtggccacagattcaagg acctggggaagagaactcaaggccctggtgctgatcgcttcgctcagtatctgcagcagagcccttcgagg accacgtgaagctggtcaacgaagtgaccgagttcgccaagacctgtgtggccgatgagagcgccgagaactg tgacaagagcctgcacacactgttcggcgacaagctgtgtaccgtggccacactgagagaaacctacggcgag atggccgactgctgtgccaagcaagagcccagagaaacagagtgttcttcgcagcacaaggacgacaacccc aacctgcctagactcgtgcgacccgaagtggatgtgatgtgcaccgaccttcacgacaacgaggaaaccttctg aagaagtacctgtacgagatcgccagacggcaccctacttttatgccctgagctgctgttcttcgccaagcggtg taaggccgcttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggctgctgtctgctgctaagtggacgagctgag agatgagggcaaagccagctctgccaagcagagactgaagtgcgccaagcctgcagaagttcggcgagagag ctttaaggcctgggcccgttgccagactgagccagagatttcctaaggccgagtttgccgaggtgtccaagctcgtg accgatctgacaaaggtgcacaccgagtgctgtcacggcgatctgtggaatgtgccaagcagatagagccgacct ggccaagtatatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaagagtgtctgcgagaagcccctgct ggaaaagtctcactgtatcgccgaggtcgagaacgacgagatgcctgtgatctgcctagcctggccgcccgtt cgtggaaagcaaggatgtgtgaagaactacgcccaggccaaagatgtgttctgggcatgttctgtatgagtac gcccgcagacaccccactattctgtgttctgtgctgctgctggccaagacatacagagacaacccctggaaaa atgctgcgcccgtgcgactctcagagtggtatgccaaggtgttcgacgagttcaagccactggtggaagaacc ccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctgggagagtacaaagttccagaatgcccgtgctg tgcggtacaccaagaaagtcctcaggtgtccacacctacactggtgaggtgtcccgaatctgggcaaagtg gcagcaagtgttgcaagcaccctgaggccaagagaatgccttgccgagaggattacctgagcgtggtgctgaat cagctgtgctgtgcacgagaaaacccctgtgtccgacagagtgaccaagtgtgtaccgagagcctcgtgaa cagaaggcctgtcttagcgccttggaagtggacgagacatacgtgccc aaagagttcaacgccgagacattca cctccacgccgatatctgcacctgtccgagaaagagcggcagatcaagaagcagacagccctggtcagct ggtaagcacaagcccaaggccaccaaagaacagctgaaggccgtgatggacgacttcggcgcctttgtcag aagtgtgcaaggccgacgacaaagagacatgttcgccaagagggaagaaactggtggtgctcctcag gctgctcggacttgagggaagcggaggtatggcggttcggaggaagttgttgcctcttggcatcgaag gcggcatcatcagcaatcagcagatcaccgcccagcagcaccacagagcactgttggactgcagaatggtgta

		tcctactacgccccggtgaacaagaaggcgctgattaacgcctggacagccgaggaatgacagatggccc tggattcagatcaacctgcagcggaagatgagagtaccggcggtatcacacagggcgccaaaagaatcggc agccccgagtacatcaagagctacaagatcgctacagcaacgacggcaagacctgggcatgtacaagtg aagggcaccaacgaggacatggtgtccggggcaacatcgacaacaacaccccttacgccaacagctcacc cctcctatcaagggccagtagctgcgggtgtaccctcaagtgtgcagaaggcactgtaccctgagaatggaactg ctgggtgcgaactgtctggtgttctgagccactgggcatgaagtcggccacatccaggattaccagatcaca gcctccagcatcttcagaaccctgaacatggatatgttcacctgggagccccggaaggccagactggataagca gggaaaagtgaatgctggaccagcgccacaacgaccagctcctaatggctgcaagtggacctgctggtgcc accaaagtgaccggaatcattactcaggcgcaaaggacttcggccacgtgcagtttggggctcctacaagctg gcctactccaacgatggcgagactggacagtgtagcaggagcagaagcagcgcaaggataaggtgtccag ggaaacttcgataacgataccaccgggaagaacgtgatcgacccctcaatctacgccagacacatcagaatcct gccttggcttggtagcggcagaatcacctgagatccgagctgctgggatgc
90	Ácido nucleico de SEQ ID NO: 84	gacatctgcgaccccaacccctgcgagaacggcggcacatgcctgcccggcctggccgacggcagcttcagct gcgagtgcggcgacggcttcaccgaccccaactgcagcagcgtggtggagggtggccagcgacgaggaggag cccaccggcagcgacgcccacaagagcgagggtggccaccgggtcaaggacctggcgaggagaactcaa ggccctggtgctgatcgcttcgcccagtagctgcagcagaccccttcgaggaccacgtgaagtgtgtaacg aggtgaccgagttcgcaagacctgcgtggccgacgagagcgccgagaactgcgacaagagcctgcacacc ctgttcggcgacaagctgtgcaccgtggccaccctgcgggagacctacggcgagatggccgactgtcgcgca agcaggagcccagcggaacgagtgcttcctgcagcacaaggacgacaaccccaacctgccccggctggtg cggcccaggtggacgtgatgtgcaccgcctccacgacaacgaggagacctcctgaagaagtacctgtacg agatgcggcgccggcaccctacttctacgcccccgagctgctgttctcgccaagcggtataaaggccgcttca ccgagtgctgcaggccgcccagacaaggccgctgctgctgcccagctggacgagctgcgggacgagggc aaggccagcagcgccaagcagcggtgaagtgcgcccagcctgcagaagttcgcgagcgggccttaaggc ctgggcccgtggccggctgagccagcggttcccaaggccgagttcgccgaggtgagcaagctggtgaccgac ctgaccaaggtgcacaccgagtgctgcccagcgacctgctggagtgcgcccagcaccgggcccagctggcc aagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaggagtgtcgcgagaagcccctgctggag aagagccactgcatcgccgaggtggagaacgacgagatgcccggcagctgcccagcctggccgcccagcttc gtggagagcaaggacgtgtcaagaactacgcccagggccaaggacgtgttctggcatgttctgtacgagta cgccggcgccaccccagctacagcgtggtgctgctgctgcccgtggccaagacctacgagaccacctggag aagtgtcgcgcccggcggcagccccacgagtgctacgccaaggtgttcgacgagttcaagcccctggtggagg agccccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgacgagctggcgagtagaagttccagaacgcct gctggtgctgacccaagaaggtgccccaggtgagcaccctggtggaggtgagccggaacctggg caaggtggcagcaagtgtgcaagcaccggaggccaagcggtgacctgcccggaggactacctgagcgt ggtgctgaaccagctgtgctgctgcacgagaagacccccgtgagcgaccgggtgaccaagtgtgcaccga gagcctggtgaaccggcgccctgcttcagcgccctggaggtggacgagacctacgtgcccaggagttcaac gccgagaccttcaccttcacgcccagacatctgcacctgagcgagaaggagcggcagatcaagaagcagacc gccctggtggagctggtgaagcacaagcccaaggccaccaaggagcagctgaaggccgtgatggacgacttc gccgcttcgtggagaagtgtgcaaggccgacgacaaggagacctgcttcggcaggaggggcaagaagctg gtggccgcccagccagggccctggcctggcgccgagcgccgagcgccgagcgccgagctgca gcggccccctgggcatcagggcgccatcagcaaccagcagatcaccggcagcagcaccacggggcc ctgttcggctgcagaagtgttaccctactacgcccggctgaacaagaagggctgatcaacgctggaccgc cgccgagaacgaccggtggccctggatccagatcaacctgcagcggaagatggggtgaccggcgctgatcac ccagggcgccaagcggtatcgccagccccgagtagcatcaagagctacaagatcgctacagcaacgacggca agacctgggcatgtacaaggtgaaggggcaccacgagagcatggtgttcggggcaacatcgacaacaaca ccccctacgccaacagcttcacccccccatcaaggccagtagctgcggtgtacccccagggtgtgcccggcg cactgcaccctgcggtatggagctgctgggctgcgagctgagcggtgcagcgagccccctgggcatgaagagc ggccacatccaggactaccagatcaccgcccagcagcatcttcggaccctgaacatggacatgttaccctggga gccccggaaggccggctggacaagcaggggcaaggtgaacgcctggaccagcgccacaacgaccagag ccagtggtgcaggtggacctgctggtgccaccaaggtgaccggcatcatcaccagggcgccaaggacttc ggccacgtgcagttctgggagctacaagctggcctacagcaacgacggcgagcactggaccgtgtaccag gacgagaagcagcggaaggacaaggtgtccagggcaacttcgacaacgacaccaccggaagaacgtgat cgaccccccatctacgcccggcacatccggatcctgcctggagctggtacggccggatcacctcgggagc gagctgctgggctgc

91	Ácido nucleico de SEQ ID NO: 85	agcgccggccctgcaccccaacccctgccacaacggcgccacctgcgagatcagcgaggcctaccgggg cgacaccttcacggtctacgtgtgaagtgcacccggggttcaacggcatccactgccagcacggcagcgacg cccacaagagcgaggtggcccaccgggtcaaggacctggcgaggagaacttcaaggccctgggtgatcg ccttcgcccagtagctgcagcagagcccttcgaggaccacgtgaagtggtaacgaggtgaccgagttcgcc aagacctgcgtggccgacgagagcgccgagaactgcgacaagagcctgcacacccctgttcggcgacaagctg tgcaccgtggccaccctgcgggagacctacggcgagatggccgactgctgcgccaagcaggagcccgagcg gaacgagtgcttcctgcagcacaaggacgacaaccccaacctgccccggctgggtgcggcccgaggtggacgt gatgtgcaccgccttcacgacaacgaggagaccttcctgaagaagtacctgtacgagatcgcccgcgccac ccctacttcacgccccgagctgctgttcttcgccaagcggtacaaggccgcttcaccgagtgctgccaggccg ccgacaaggccgctgctgctgcccaagtggacgagctgcgggacgaggggcaaggccagcagcgccaa gcagcggctgaagtgcgccagcctgcagaagtgcggcgagcgggcttcaaggccctggggcgtggccggctg agccagcgggtccccaaggccgagttcgccgaggtgagcaagctggtagccgacctgaccaaggtgcacacc gagtgctgccacggcgacctgctggagtgcccgacgacggggccgacctggccaagtacatctgcgagaac caggacagcatcagcagcaagtgaaggagtgctgcgagaagccccctgctggagaagagccactgcatcgc cgaggtggagaacgacgagatgcccggcgacctgcccagcctggccggcgacttcgtggagagcaaggacgt gtgcaagaactacgcccaggccaaggacgtgttctgggcatgttctgtacgagtagcggcgccgaccccg actacagcgtgggtgctgctgctgcggctggccaagacctacgagaccacctggagaagtgtgcgcccggc cgacccccacgagtgctacgccaaggtgttcgacgagttcaagccccctgtggagagccccagaacctgatc aagcagaactgcgagctgttcgacgagctggcgagtagacaagttcagaacgcctgtggtgcggtacacca agaaggtgccccaggtgagcaccaccctgggtggagtgagcgggaacctggggcaaggtggggcacaag tgctgcaagcaccggagggccaagcggtgacccctgcggcgaggactacctgagcgtgggtgtaaccagctgt gcgtgctgcacgagaagacccccgtgagcgaccgggtgaccaagtctgcaccgagagcctgtgtaaccggc ggccctgcttcagcgccctggaggtggacgagacctacgtgcccaaggagttcaacgccgagaccttcaccttc cacggcgacatctgcaccctgagcgagaaggagcgcgagatcaagaagcagaccgcccgtggtagctggt gaagcacaagcccaaggccaccaaggagcagctgaaggccgtgatggacgacttcggcgcccttcgtggaga agtgtgcaaggccgacgacaaggagacctgttcgcccaggaggggcaagaagctggtggccgacccag gccgcccgtgggctgggcccagcgccgcccagcgccgcccagctgcagcgcccccctgggca tcgaggcgccgcatcatcagaaccagcagatcacggccagcagcaccaccgggcccgttccgctgcaga agtgttaccctactacgcccggctgaacaagaaggccctgatcaacgcctggaccgcccggagaacgacc ggtggcccctgatccagatcaacctgcagcggaagatgcgggtgaccggcgtgatcacccaggggcgcaagc ggatcggcagccccgagtagcatcaagagctacaagatgcctacagcaacgacggcaagacctgggcatgt acaaggtgaaggccaccaacgaggacatggtgtccggggcaacatcgacaacaacccccctacgccaac agcttcaccccccatcaaggcccagtagctgcgggtgtacccccagggtgtgccggcgccactgcacctgcg gatggagctgtgggtgcgagctgagcggtgcagcgagcccctgggcatgaagagcgggccacatccagga ctaccagatcacggccagcagcatcttcggaccctgaacatggacatgttacctgggagccccggaaggccc ggctggacaagcaggggcaagggtgaacgctggaccagcgccacacgaccagagccagtggtgcaggt ggacctgctggtgccaccaaggtagccggcatcatcacccaggggcgccaaggacttcggccacgtgcagttc gtgggcagctacaagctggcctacagcaacgacggcgagcactggaccgtgtaccaggacgagaagcagcg gaaggacaaggtgttcagggaacttcgacaacgacacccaccggaagaacgtgatcgaccccccatcta cgccggcacatccggatcctgcccgtgagctggtacggccgatcacctgcggagcgagctgctgggctgc
92	Ácido nucleico de SEQ ID NO: 86	aacatcaacgagtgcgaggtggagccctgcaagaacggcgccatctgcaccgacctggtggccaactacagc tgcgagtgccccggcgagttcatgggcccgaactgccagtagaaggcgagcagccacaagagcgaggt ggcccaccgggtcaaggacctggcgaggagaacttcaaggccctgggtgatcgcttcgcccagtagctgc agcagagcccttcgaggaccacgtgaagtggtaacgaggtgaccgagttcgaagacctgcgtggccg acgagagcggcagaaactgcgacaagagcctgcacacccctgttcggcgacaagctgtgcaccgtggccacc tgcgggagacctacggcgagatggccgactgctgcgccaagcaggagcccagcggaacgagtgcttctgc agcacaaggacgacaaccccaacctgccccggctggtgcggcccaggtggacgtgatgtgcaccgccttc acgacaacgaggagaccttctgaagaagtacctgtacgagatcgcccggcgccacccctacttctacgcccc gagctgctgttcttcgccaagcggtacaaggccgcttcaccgagtgctgccaggccggcgacaaggccgctg cctgctgccaaagtggacgagctgcgggacgagggcaaggccagcagcgccaagcagcggtgaagtgc gccagcctgcagaagttcggcgagcgggcttcaaggcctgggcccgtgagccagcggttcccca aggccgagttcggcaggtgagcaagctggtgaccgacctgaccaaggtgcacaccgagtgctgccaggcg acctgctggagtgccgacgacccggcgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagca gcaagctgaaggagtgctgcgagaagccccctgtggagaagagccactgcatcgccgaggtggagaacgac gagatgcccgccgacctgcccagcctggccggcgacttcgtggagagcaaggacgtgtgcaagaactacgcc

		gaggccaaggacgtgttctctgggcatgttctgtacgagtagcggcgccggcagcccgactacagcgtgggtgctg ctgtgctgggtggccaagacctacgagaccacccctggagaagtgtgctgcccggccgaccccccacgagtgct acgccaaggtgttcgacgagttcaagccctggaggagagcccgagaacctgatcaagcagaactgagagct gttcgagcagctgggagagtagacaagtccagaacgcccctgctgggtgctgacccaagaaggtgccccaggtg agcaccccccacccctggagggtgagccggaacctgggcaaggtgggagcaagtgctgaagcaccgga ggccaagcggatgccctgcccggaggactacctgagcgtgggtgtaaccagctgtgctgtgacgagaag accccccgtgagcagccgggtgaccaagtgtgcaccgagagcctggtgaaccggcgccctgttcagcgccc tggaggtggacgagacctacgtgccaaggagttcaacgcccagaccttcacctccacgcccacatctgcacc ctgagcgagaaggagcggcagatcaagaagcagaccgcccctggaggagctggtgaagcacaagcccaagg ccaccaaggagcagctgaaggccgtgatggacgacttcgccccttcgtggagaagtgtgcaaggccgacg acaaggagacctgttcgcccaggagggaagaagtgtgggcccagccagggcccccctgggctgggc ggcagcggcgccagcggcgccagcggcgccagctgcagcggccccctgggcatcgaggggggcatcatca gcaaccagcagatcacggccagcagcaccacccgggcccctgttcggcctgcagaagtgggtaccctactacgc ccggctgaacaagaaggcctgatcaacgctggaccgcccggagaaacgaccggtggccctggatccagat caacctgcagcgggaagatgcgggtgaccggcgtgatccacaggggcgcaagcggatcgccagccccaggt acatcaagagctacaagatcgctacagcaacgagcggcaagacctgggcatgtacaaggtgaagggcacc aacgaggacatggtgtccggggcaacatcgacaacaacacccctacgccaacagcttcacccccccatca aggcccagtagctgctgggtgtacccccaggtgtgcccggcactgcacccctgaggatggagctgtgggtgc gagctgagcggctgcagcagagccccctgggcatgaagagcggccacatccaggatccagatccacggcag cagcatcttcggaccctgaacatggacatgttcacctgggagcccggaaggccggctggaagaagcgggc aaggtgaacgcccctggaccagcggccacaacgaccagagccagtggtgctgaggtggactgtgtggcccacc aaggtgaccggcatcatcacccaggcgcccaaggacctcgccacgtgcagttcgtgggagctacaagctgg cctacagcaacgacggcgagcactggaccgtgtaccaggacgagaagcagcgggaaggacaaggtgttcag ggcaacttcgacaacgacacccacgggaagaacgtgatcagccccccatctacgcccggcacatccggatc ctgcccctggagctggtacggccggatcacctcgtggagcagctgctgggctgc
93	Ácido nucleico de SEQ ID NO: 87	gacatctgcgaccccaacccctgcgagaacggcgccatctgcctgcccggcctggccgacggcagctcagct gcgagtgccccgacggcttcaccgaccccaactgcagcagcgtgggtggagggtggccagcagcagggaggag cccaccagcggcgcccctgcaccccaacccctgccacaacggcgccacctgcgagatcagcagggccta ccggggcgacaccttcacgtgctacgtgtcaagtgcggcgccggtcctcaacggcatccactgcagcagggca gcgacgcccacaagagcaggtggtggccaccgggttaaggacctgggagaggaactcaaggccctggtg ctgatcgcttcgcccagtagctgcagcagagccccctgcaggaccacgtgaagctggtgaacgaggtgaccga gttcgccaagacctgcgtggccgacgagagcggcgaactgcgacaagagctgcacacccctgttcggcga caagctgtgacccgtggccaccctgcgggagacctaaggcgagatggccgactgctgcgccaagcagggacc cgagcggaaacgagtgcttctgcagcacaaggacgacaaccccaacctgcccgggctggtgctggcccaggt ggacgtgatgtgcaccgccttcacgacaacgaggagaccttctgaagaagtacctgtacgagatcgcccggc ggcaccctacttctacgccccgagctgctgttcttcgccaagcgggtacaaggccgcttcaccgagtgctgcca ggccgcccgaaggccgctgctgctgccaagctggacgagctgcgggacgaggggaaggccagcagc gccaagcagcgggtgaagtgcgccagcctgcagaagttcggcgagcgggcttcaaggcctgggcccgtggcc cggctgagccagcgggtccccaaggccgagttcggcggaggtgagcaagctggtgaccgacctgaccaaggtgc acaccgagtgctgccacggcagctgctggagtgccgacgaccgggcccagctggccaagtacatctgcg agaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaggagtgctgcgagaagcccctgtggagaagagccactgc atcgccgaggtggagaacgacgagatgcccgccagctgccagcctggccgcccagcttctgtgagagcaag gacgtgtgcaagaactacgcccagggccaaggacgtgttctgggcatgttctgtacgagtagcggcgccgga ccccgactacagcgtggtgctgctgctgcggctggccaagacctacgagaccacccctggagaagtgtgctgccc gcccggacccccacgagtgctacgccaaggtgttcgacgagttcaagccccctggaggagagcccaaac ctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctggcgagtagtaagttccagaacgcccctgctggtgcggtg caccaagaaggtgcccaggtgagcaccacccctggtggagggtgagccggaacctgggcaaggtgggca gcaagtgtgcaagcaccgagggccaagcggatgccctgcccggaggaactacctgagcgtggtgctgaacc agctgtgctgctgcagcagaagacccccgtgagcagccgggtgaccaagtgtgcaccgagagcctgggtga accggcgccctgcttcagcgccctggaggtggacgagacctacgtgcccaaggagttcaacgcccagacctt caccttcacgcccacatctgcacctgagcgaagaaggagcggcagatcaagaagcagaccgcccctggtgga gctggtgaagcacaagcccaaggccaccaaggagcagctgaaggccgtgatggacgacttcgccccttcgt ggagaagtgtgcaaggccgacgacaaggagacctgttcgcccaggaagggaagaagctggtggccgcca gccaggccgcccctgggctgggcccagcggcgccgagcggcgccgagcggcgagctgcagcggccccct gggcatcgagggcgccatcatcagaaccagcagatcacccgacgagcaccacccgggcccctgttcggcct

		gcagaagtgggtaccctactacgcccggctgaacaagaagggcctgatcaacgcctggaccgcccgcgagaa cgaccgggtggccctggatccagatcaacctgcagcggaagatcggggtgaccggcgtgatccccagggcgc caagcggatcggcagccccgagtacatcaagagctacaagatcgctacagcaacgacggcaagacctggg ccatgtacaagggtgaaggcaccacgaggacatggtgtccggggcaacatcgacaacaacacccctacg ccaacagcttcacccccccatcaaggccagtagctgctggtgtaccccgagtgctggcgccgactgcacc ctgcggatggagctgctgggctgagctgagcggctgcagcgagccctgggcatgaagagcggccacatc caggactaccagatcaccgcccagcagcatctccggaccctgaacatggacatgttcacctgggagccccgga aggcccggtggacaagcagggcaagggtgaacgcctggaccagcggccacaacgaccagagccagtggct gcaggtggacctgctggtgcccaccaagggtgaccggcatcatcaccagggcgccaaggacttcggccacgtg cagttcgtgggcagctacaagctggcctacagcaacgacggcgagcactggaccgtgtaccaggacgagaag cagcgggaaggacaagggtgtccagggcaacttcgacaacgacacccaccggaagaacgtgatcgaccccc catctacgcccggcacatccggtatcctgacctggagctggtacggccggatcacctcgaggagcagctgctg gctgc
94	Ácido nucleico de SEQ ID NO: 88	agcgccggcccctgcaccccccaaccctgccacaacggcggcacctgcgagatcagcgaggcctaccgggg cgacacctcatcggtacgtgtgaagtgcctccggggcttcaacggcatccactgccagcacaacatcaacg agtgcgaggtggagccctgaagaacggcggcatctgcaccgacctggtggccaactacagctgcgagtgccc cggcgagttcatgggcccgaactgccagtagaagggcagcgacggccacaagagcgaggtggccaccggt tcaaggacctgggagaggagaacttcaaggccctggtgctgatcgcttcgcccagtagctgcagcagagcccc ttcaggaccagctgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgccaagacctgcgtggccgacgagagcgcc gagaactgcgacaagagcctgcacacctgttcggcgacaagctgtgcaccgtggccacctgcgggagacct acggcgagatggccgactgctgcgccaagcaggagcccagcggaacgagtgcttctgcagcacaaggac gacaacccccaacctgccccggctggtgctggcccgagggtggacgtgatgtgcaccgccttcacgacaacgag gagaccttctgaagaagtacgtgtacgagatcgcccggcgccacccctacttctacgcccccgagctgctgttct cgccaagcgggtacaaggccgcttcaccgagtgctgccaggccgcccagacaaggccgctgctgctgccaa gctggacgagctgcgggacgagggcaaggccagcagcgccaagcagcggtgaagtgcgccagcctgcag aagttcggcgagcgggcttcaaggcctgggctggccggctgagccagcggttcccaaggccgagttcg ccgaggtgagcaagctggtgaccgacctgaccaaggtgcacaccgagtgctgccacggcgacctgtggagt gcgccgacgacgggcccagctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaag gagtgctgcgagaagcccctgctggagaagagccactgcacgagggtggagaacgacgagatgcccgc cgacctgcccagcctggccgcccacttcgtggagagcaaggacgtgtgaagaactacgcccaggccaagga cgtgttctggcatgttctgtacgagtagcggcgccgcccagaccccgagtggtgtgctgctgctgctgctg gccaagacctacgagaccacctggagaagtgctgcggcgccgcccagaccccgagtgctacgccaaggtg ttcgacgagttcaagcccctggtggaggagcccagaacctgaagcagaactgcgagctgttcgagcagct ggcgagtagacaagttccagaacgcctgctggtgctgctacccaagaaggtgcccaggtgagcacccccac cctggtggaggtgagccggaacctgggcaagggtgggagcaagtgctgcaagcaccggagggccaagcgga tgccctgcggcaggactacgtgagcgtggtgctgaaccagctgtgctgctgcacgagaagacccccgtgagc gaccgggtgaccaagtgtgcaccgagagcctggtgaaccggcggccctgcttcagcgccctggaggtggacg agacctacgtgccaaggagttcaacgcccagaccttcaccttcacgcccagacatctgcacctgagcgagaa ggagcggcagatcaagaagcagaccgcccctggtggagctggtgaagcacaagcccaaggccaccaaggag cagctgaaggccgtgatggacgacttcggccttcgtggagaagtgctgcaaggccgacgacaaggagacct gcttcggcaggagggcaagaagctggtggccgcccagccagggccgctgggctgggcccagcggcgcc agcggcggcagcggcggcagctgcagcggccccctgggcatcgagggcgccatcatcagcaaccagcagat caccgcccagcagcaccacccgggcccctgttcggcctgcagaagtggtacccctactacgcccggctgaacaag aaggccctgatcaacgcctggaccgcccggagaaacgaccggtggccctggatccagatcaacctgcagcgg aagatcggggtgaccggcgtgatcaccagggcgccaagcggtatcggcagccccgagtagcatcaagagcta caagatcgctacagcaacgacggcaagacctgggcatgtacaagggtgaaggccaccaacgaggacatgg tgttccggggcaacatcgacaacaacacccctacgccaacagcttcacccccccatcaaggcccagtagct gcggctgtacccccaggtgtccggcgccgactgcacctgcggatggagctgctgggctgcgagctgagcggct gcagcgagcccctgggcatgaagagcggccacatccaggactaccagatcaccgccagcagcatcttcggga ccctgaacatggacatgttcacctgggagccccggaaggccccgctggacaagcagggcaagggtgaacgct ggaccagcggccacaacgaccagagccagtggtgaggtgacctgctggtgccaccaagggtgaccggc atcatcaccaggggccaaggacttcggccacgtgcagttcgtgggagctacaagctggcctacagcaacg acggcgagcactggaccgtgtaccaggacgagaagcagcgggaaggacaaggtgttcagggcaacttcgac aacgacacccaccggaagaacgtgatcagccccccatctacgcccggcacatccggtatcctgacctggagct ggtacggccggatcacctgcggagcagctgctgggctgc

95	Ácido nucleico de SEQ ID NO: 89	gacatctgcgaccccaacccctgcgagaacggcgcatctgcctgccggcctggccgacggcagcttcagct gcgagtccccgacggcttcaccgaccccaactgcagcagcgtggtggaggtggccagcgacgaggaggag cccaccaacatcaacgagtgcgaggtggagccctgcaagaacggcgcatctgcaccgacctggtggccaac tacagctgagtgccccggcgagttcatggccggaactgccagtacaagggcagcgacgcccacaagagc gaggtggcccaccggttcaaggacctggcgagggagaactcaaggccctggtgctgatcgcttcgccagta cctgcagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgaagacctgcgtg gccgacgagagcgccgagaactgcaagaagagcctgcacaccctgttcggcgacaagctgtgcaccgtggcc accctgcgggagacctacggcgagatggccgactgctgcgccaagcaggagcccagcggaacgagtgcttc ctgcagcacaaggacgacaaccccaacctgccccggctggtgctggccgaggtggacgtgatgtgcaccgcc ttccacgacaacgaggagaccttcctgaagaagtacctgtacgagatcgccggcgccacccctacttctacgc ccccgagctgctgttcttcccaagcgggtacaaggccgcttcaccgagtgctgccaggccgcccagacaaggccg cctgcctgctgcccaagctggacgagctgccccgacgagggcaaggccagcagcgccaagcagcggtgaag tgccgacgctgcagaagttcggcgagcgggcttcaaggcctggccggtggccgggtgagccagcggttcc ccaaggccgagttcggcgaggtgagcaagctggtgaccgacctgaccaaggtgcacaccgagtgctgccacg gcgacctgctggagtgccgacgacggggccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatca gcagcaagctgaaggagtgctgcgagaagccctgctggagaagagccactgcacgaggtggagaac gacgagatgcccggcagctgcccagcctggccgagcttcgtggagagcaaggacgtgtgaagaactac gccgagggccaaggacgtgttctgggcatgttctgtacgagtagcccgccgaccccgactacagcgtgtg gtgctgctgctggcgtggccaagacctacgagaccacccctggagaagtgctgcggccgcccagccccacga gtgctacgccaagggtgtcgcagagtgacaagcttcaagccctggtggagagcccagaacctgatcaagcagaactgc gagctgttcgagcagctggcgagtgacaagttccagaacgcccctgctggtgctgacccaagaagggtgccc aggtgagcacccccaccctggtggaggtgagccggaacctgggcaaggtggcgagcaagtgtgcaagcac cccagggccaagcggatgccctgcccagggactacctgagcgtggtgctgaaccagctgtgctgtgcacg agaagaccccgtgagcgacggggtgaccaagtgtgcaccgagagcctggtgaaccggcgccctgcttca gcgccctggaggtggacgagacctacgtgcccaaggagttcaacgcccagaccttcacctccacgcccacat ctgcaccctgagcgagaaggagcggcagatcaagaagcagaccgcccctggtggagctggtgaagcacaagc ccaaggccaccaaggagcagctgaaggccgtgatggacgacttcgccccttcgtggagaagtgtgcaagg ccgacgacaaggagacctgttcgcccagggagggcaagaagctggtggccgagccaggccgcccctgggc ctggggcgagcggcgagcggcgagcggcgagcggcgagcgtgcagcgcccccctgggcatcagggcgggca tcacagcaaccagcagatcaccgcccagcagcaccacgggcccctgttcggcctgcagaagtgtgacccta ctacgcccgtgaacaagaaggccctgatcaacgcctggaccgcccggagaaagcagccggtggccctggat ccagatcaacctgcagcgaagatgcgggtgaccggcgtgatcaccagggcgccaagcggatcggcagcc ccgagtacatcaagagctacaagatcgccctacagcaacgacggcaagacctgggcatgtacaagggtgaagg gcaccaacgaggacatggtgttcgggggaacatcgacaacaacaccccctacgccaacagcttcaccccc ccatcaaggcccagtagctgcggctgtacccccagggtgtgccggcgccactgcacccctgcggatggagctgctg ggctgcgagctgagcggctgcagcagccccctgggcatgaagagcgccacatccaggactaccagatcacc gccagcagcatcttcggaccctgaacatggacatgttcacctgggagccccggaaggccggctggacaagc agggcaaggtgaacgctggaccagcggccacaacgaccagagccagtggtgcaggtggacctgctggtg cccaccaaggtgaccggcatcatcaccagggcgccaaggacttcggccacgtgcagttcgtgggcagctaca agctggcctacagcaacgacggcgagcactggaccgtgtaccagagcagagaagcagcgaaggacaaggt gttcagggcaacttcgacaacgacaccacgggaagaacgtgatcgaccccccatctacgcccggcacatc cggatcctgccctggagctggtacggccggatcacctgaggagcagctgctgggctgc
14	FP060 EGF-C1-C2-Fc [S354C, T366W]	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVVRGDFVPSYTCTCLKGYAGNHCEKTCVEPLGME NGNIANSQIAASSVRVTFLLGLQHWVPELARLNRAGMVNAWTPSSNDDNPWIQV NLLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDIHVDVNNKKHKEFVG NWNKNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKN NSIPDKQITASSYKRWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQV DLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSNDSANWTEYQDPRTGSSKIFP GNWDNHSKKNLFFETPILARYVRILPVAWHNRILRLLELLGCGGGGTDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK

15	FP060 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaaccctgccacaacggcgccctgtgcgaagagatcagccaggaagtgcgggg cgacgtgtccccagctacacctgtacctgctgaagggctacgccggcaaccactgcgagactaagtgcgtgg aaccctgggcatggaacacggcaatattgccaacagccagatcgccggcagctccgtgcgctgacctttctg ggactgcagcactgggtgccgagctggccagactgaacagagccggcatggtgaacgctggacccccagc agcaacgacgacaacccttgatccaggtgaacctgctgcggcgatgtgggtgacaggcgtggtgacacagg gcgccagcagactggccagccacgagtacctgaaggccttaaggtggcctacagcctgaacggccacgagt cgacttcacccacgacgtgaacaagaaacacaagaattgtgggcaactggaacaagaacccgtgcacgtg aacctgttcgagacaccgtggaagcccagctacgtgcggctgtacccaccagctgccacaccgcctgcaccct gagattcgagctgctgggctgcgagctgaacggctgcgccaacccctgggcctgaagaacaacagcatccc gacaagcagatcaccgcctccagcagctacaagacctggggcctgcacctgttcagctggaacccagctacg ccgggtggaagaagcagggcaacttaacgcctgggtggccggcagctacggcaacgaccagtggtgcagg tgacactgggagcagcagcaagaagtgaacggcatcatcaccagggggccagaaacttcggcagcgtgcagt tcgtggcagctacaaagtggcctactccaacgacagcgccaactggaccgagtaccaggacccccggaccg gcagctccaagatcttccccggcaactgggacaaccacagccacaagaagaatctgttcgaaacccccatcct ggccagatacgtgcggatcctgcccgtggcctggcacaaccggatcgccctgagactggaactgtgggatgtg ggggaggcggtaccgacaagaccacacctgccccctgcccagccccagagctgtggtgggacccctcc gtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatcagcaggacccccgaggtgacctgcgtggtggtg gacgtgagccacgaggacccagaggtgaagttaactgttacgtggacggcgtgaggtgcacaacgccaa gaccaagcccagagaggagcagtaacacgacacactaggggtgtgctgctgacagcgtgacagcgtgca ctggctgaacggcaaggaatacaagtgaaggctccaacaaggccctgcagccccctggaagacat cagcaaggccaagggccagccacgggagccccaggtgtacaccctgccccctgcccgggagagatgacc aagaaccaggtgtccctgtgtgtctgtgtaagggtcttaccacagcgacatcgccgtggagtgggagagcaa cggccagcccagagaacaactacaagaccacccccccagtgctggacagcgacggcagcttcttctgtacagc aagctgaccgtggacaagtccaggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcagaggccctgc acaaccactacaccagaagagcctgagcctgtccccgggaag
16	FP070 EGF-Fc-C1-C2	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVGRDVFPSYTCTCLKGYAGNH CETKGS DKTH TC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGKGGSGGSGGSGGSCVEPLGMENGN IANSQIAASSVRVTFGLQHWVPE LARLN RAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLK AFKVAYSLNGHEFD FIDV NKKHKEFVG NWNKN AVHVNLFETPVEAQYVRLYPT SCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLK NNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPS YARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVAS YKVAYSND SANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDN HSHKKNLFETPILARYVRILPVA WHNRIALRLELLGCGSHHHHHH
17	FP070 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaatccttgccacaacggcgccctgtgcgaagagatttcaagaagtgcggggcga cgttttcccagctacacctgtacatgtctgaagggctacgccggcaaccactgcgagacaaaaggatccgaca agaccacacctgccccctgcccagccccagagctgctgggaggacctgcgtggtggtgacgtgagccacgaggacc cagaggtgaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggag cagtacaacagcacctacaggtgtgtcgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaggaat acaagtgaaggtctccaacaaggccctgccagccccatcgaagaccatcagaaggccaagggccag ccacgggagccccaggtgtacaccctgccccctccgggaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacct gtctggtgaagggcttaccacccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcccagaaacaact acaagaccacccccccagtgctggacagcgacggcagcttcttctgtacagcaagctgacctggacaagtc caggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcagaggccctgcacaaccactacaccagaa gagcctgagcctgtcccccggaagggagggaagcggaggatctggcggttccggaggctctgtgtgaaccc ctcggcatggaacacggcaatatcgccaatagccagattgccgcagcagcgtcagagtgcatttctgggact gcagcactgggtgccgagctggctagactgaatagacggcgtggtgaacgcctggacaccagcagcaa cgacgataacccttgattcaagtgaacctgtgcggcgatgtgggtcacagggtgtgttacacagggcgctcta gactggccagccacgagtatctgaaggccttaaggtggcctacagcctgaacggccacgagttcgacttcac acgacgtgaacaagaagcacaagagttgtcggcaactggaacaagaacggcgtgcacgtgaacctgttcg agacacctgtggaagcccagctacgtgcgggtgtacctacaagctgtcacaccgctgactctgagattcgaac tgctgggatgcgagctgaacggctgtgctaactcttgggcctgaagaacaacagcatccccgataagcagatc

		accgccagctccagctataagacatggggcctgcacctgttcagctggaacccttctacgccagactggacaag cagggcaacttcaatgcttgggtggccggcagctacggcaatgatcagtggtgcaagtggacctgggcagcag caaagaagtgcagggcatcatcaccagggcgccagaaatttcggcagcgtgcagttgtggccagctacaaa gtggcctactccaacgacagcgccaactggaccgagtatcaggaccctagaaccggcagctccaagatcttcc ccggcaattgggacaaccacagccacaagaagaatctgttcgaaaccctatcctggccagatatgtgcgattc tgcccggtggcctggcacaacagaattgccctgagactggaactgctcggtgtggctctcaccaccaccatcacc at
18	FP071 EGF– Fc(botón)–C1– C2	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVRGDVFPSTCTCLKGYAGNHCECTKGSDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGGSGGSGGSGGSCVEPLGMENGNANSQIAASSVRVTFGLQHWVP ELARLNRAAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLRLRMWVTGVVTQGASRLASHEYL KAFKVAISLNGHEFDIHDVNKKHKEFVGNWNKNVHVNLFETPVEAQYVRLYP TSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNNIPDKQITASSYKTWGLHLFSWNP SYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVA SYKVAYSND SANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHSHKKNLFETPILARYVRILPV AWHNRIALRLELLGCGSHHHHHH
19	FP071 Ácido nucleico.	ctggacatctgcagcaagaatccttgcacaacggcggtgtgcgaagagatttcaagaagtgcggg gagacgttttcccagctacacctgtacatgtctgaagggctacggcggaaccactgcgagacaaaagg atccgacaagacccacacctgccccctgcccagcccagagctgctggcggaacctccgtgttctgt tccccccaagcccaaggacacctgatgatcagcaggacccccgaggtgacctgcgtggtgtggacgt gagccacgaggaccagaggtgaagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcacaacgccaaga ccaagcccagagaggagcagtaaacagcacctacaggggtggtgtccgtgtgacctgtgcaccagg actggctgaacggcaaggaataacaagtgaaggtctcaacaaggccctgcagcccccatcgaaaag accatcagcaaggccaagggccagccacgggagccccaggtgtacacctgccccctgcccggagg agatgaccaagaaccaggtgtccctgtgtgtgtggaagggcttctacccagcgacatcgccgtggagt gggagagcaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccccagtgctggacagcgacggca gcttcttctgtacagcaagctgacctgtggacaagtccaggtggcagcagggcaacctgttcagctgcagc gtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagagcctgagcctgtccccggcaagggagg aagcggaggatctggcggttccggaggctcttgtgtgaacccctcgcatggaacggcaatatcgcc aatagccagattgccgccagcagctcagagtacatttctgggactgcagcactgggtgccgagctggc tagactgaatagagccgcatggtcaacgctggacaccagcagcaacgacgataaccttggattcaa gtgaacctgtcggcgctatgtgggtcacaggtgtgttacacagggcgctctagactggccagccacgag tatctgaaggccttaaggtggcctacagcctgaacggccacgagttcagctcatccacgacgtgaacaag aagcacaagagttgtcggcaactggaacaagaacggcgtgcacgtgaacctgttcgagacacctgtgg aagcccagtagctgcgggtgtaccctacaagctgtcacaccgctgactctgagattcgaactgtgggat gcgagctgaacggctgtgtaacctcttggcctgaagaacaacagcatccccgataagcagatcacgcg cagctccagctataagacatggggcctgcacctgttcagctggaacccttctacgccagactggacaagc agggcaacttcaatgcttgggtggccggcagctacggcaatgatcagtggtgcaagtggacctgggcag cagcaaagaagtgcagggcatcatcaccagggcgccagaaatttcggcagcgtgcagttgtggccagc taciaaagtggcctactccaacgacagcgccaactggaccgagtatcaggaccctagaaccggcagctcc aagatcttccccggcaattgggacaaccacagccacaagaagaatctgttcgaaaccctatcctggcca gatatgtgcgattctgcccgtggcctggcacaacagaattgccctgagactggaactgctcggtgtggctc tcaccaccaccatcacat
20	FP072 EGF–Fc(ojal)– C1–C2	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVRGDVFPSTCTCLKGYAGNHCECTKGSDKT HTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA

		VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGSGGSGGSCVEPLGMENGNIANSQIAAS SVRVTFGLQLHWWPELARLNLRAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLLRRMWVT GVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDIHDVNKKHKEFVGNWNKNA VHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNN SIP DKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQV DLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSND SANWTEYQDPRTGSSKI FPGNWDNHSKKLNFETPILARYVRILPVAWHNRALRLELLGCGSHHHHHH
21	FP072 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaatcctgccacaacggcgccctgtgcgaagagatttctcaagaagtgcggg gcgacgtttccccagctacacctgtacatgtctgaagggtctacgccggaaccactgcgagacaaaagg atccgacaagaccacacctgccccctgccagccccagagctgtctggcggaacctcctgttctgt tccccccaagccaaggacacctgatgatcagcaggacccccaggtgacctgcgtggtggtggacgt gagccacgaggaccagaggtgaagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcacaacgccaaga ccaagccagagaggagcagtacaacagcacctacagggtggtgtccgtgctgacctgctgcaccagg actggtgaacggcaaggaatacaagtgaaggtctccaacaaggccctgccagccccatcgaaaag accatcagcaaggccaagggccagccagggagccccaggtgtgcacctgccccctccggggagg agatgaccaagaaccaggtgtccctgtcctgtgcggtgaagggtcttaccacagcgacatcgccgtggag tgaggagagcaacggccagccgagaaactacaagaccacccccccagtgctggacagcgacggca gcttctcctggtcagcaagctgacctgggacaagtccaggtggcagcagggcaacctgttcagctgcagc gtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagagcctgagcctgtccccggcaagggagg aagcggaggatctggcgttccggaggctcttgtgtgaacccctcgcatgaaaacggcaatatcgcc aatagccagattgccgccagcagctcagagtacatttctgggactgcagcactgggtgccgagctggc tagactgaatagagccggcatggtcaacgcctggacaccagcagcaacgacgataaccttggattcaa gtgaacctgctcgggcgtatgtgggtcacaggtgtgttacagggcgctctagactggccagccacgag tatctgaaggccttaagggtggcctacagcctgaacggccacgagttcagctcatccacgacgtgaacaag aagcacaagagttgtcggcaactggaacaagaacgccgtgcagtgaaacctgttcgagacacctgtgg aagcccagtagctgcggctgtacctacaagctgtcacaccgctgactctgagattcgaactgtgggat gcgagctgaacggctgtgtaacctcttggcctgaagaacaacagcatccccgataagcagatcacccg cagctccagctataagacatggggcctgcacctgttcagctggaaccttctacgccagactggacaagc agggcaacttcaatgcttgggtggccggcagctacggcaatgatcagtggtgcaagtggacctgggcag cagcaaagaagtgcagggcatcatcaccaggggcgccagaaatttcggcagcgtgcagttgtggccagc tacaagtggtcctactccaacgacagcgccaactggaccgagtatcaggacctagaaccggcagctcc aagatcttccccggcaattgggacaaccacagccacaagaagaatctgttcgaaaccttatctggcca gatattgtgcgattctgccgtggcctggcacaacagaattgccctgagactggaactgctcggctgtggctc tcaccaccaccatcaccat
22	FP080 EGF-C1-C2-Fc	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVVRGDVFPSTCTCLKGYAGNH CETKCVEPLGME NGNIANSQIAASSVRVTFGLQLHWWPELARLNLRAGMVNAWTPSSNDDNPWIQV NLLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDIHDVNKKHKEFVG NWNKNVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKN NSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQV DLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSND SANWTEYQDPRTGSSKIFP GNWDNHSKKLNFETPILARYVRILPVAWHNRALRLELLGCGGGGTDKHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
23	FP080 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaacctgccacaacggcgccctgtgcgaagagatcagccaggaagtgcgggg cgacgtgtccccagctacacctgtacctgctgaagggtctacgccggaaccactgcgagactaagtgcgtgg aaccttgggcatggaacggcaatatcgccaacagccagatcgccgagctcctgctgcgtgaccttctg

		ggactgcagcactgggtgcccgagctggccagactgaacagagccggcatggtgaacgctggacccccagc agcaacgacgacaacccttgatccaggtgaacctgctgcggcgatgtgggtgacaggcgtgggtgacacagg gcgccagcagactggccagccacgagtacctaaggccttaaggtggcctacagcctgaacggccacgagtt cgacttcacacgacgtgaacaagaaacacaaagaatttggggcaactggaacaagaacgccgtgcacgtg aacctgttcgagacacccgtggaagcccagctacgtgcggctgtacccaccagctgccacaccgctgcaccct gagattcgagctgctgggtgctgagctgaacggctgcgccaacccctgggcctgaagaacaacagcatcccc gacaagcagatcacccgctccagcagctacaagacctggggcctgcacctgttcagctggaacccagctacg cccggtggacaagcagggcaactcaacgcctgggtggcggcagctacggcaacgaccagtggtgcagg tggacctgggcagcagcaagaagtgaacggcatcatcaccagggggccagaaactcggcagcgtgcagt tcgtggccagctacaaagtggcctactccaacgacagcggcaactggaccgagtaccaggacccccggaccg gcagctccaagatcttccccggcaactgggacaaccacagccacaagaagaatctgttcgaaacccccatcct ggccagatacgtgcggatcctgccgtggcctggcacaaccggatcgccctgagactggaactgtgggatgtg ggggaggcgggtaccgacaagaccacacctgccccccctgccagccccagagctgtggggcgaccctcc gtgttctgttccccccaagcccaaggacacctgatgatcagcaggacccccgaggtgacctgcgtggtggtg gacgtgagccacgaggacccagaggtgaagttaactggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaa gaccaagcccagagaggagcagtacaacagcacctacaggggtgtcctgtgtgaccgtgtgcaccagga ctggctgaacggcaaggaatacaagtgaaggtctccaacaaggccctgccagccccatcgaaaagaccat cagcaaggccaagggccagccacgggagccccaggtgtacacctgccccctccccgggaggagatgacca agaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaac ggccagcccagagaacaactacaagaccacccccccagtgctggacagcgacggcagcttctcctgtacagca agctgaccgtggacaagtccaggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgca caaccactacaccagaagagcctgagcctgtcccccggaag
24	FP090 Fc-EGF-C1-C2	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPGKGSLEVLFGQPGSSLDICSKNPCHNGGLCEEISQEVGRDVFPSY TCTCLKGYAGNHCETKCEPLGMENGNANSQIAASSVRVTFGLQLQHWPELAR LNRAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFK VAYSLNGHEFDIFIHDVNKKHKEFVGNWNKNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCH TACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYAR LDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKV AYSNDSANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHSKKNLFETPILARYVRILPVAWH NRIALRLELLGC
25	FP090 Ácido nucleico	gacaagaccacacctgtccccctgcctgtcctgagctgctgggaggaccagcgtgttctgttcccccca agcccaaggacacctgatgatcagcggacccccgaagtgaacctgcgtggtggtgacgtgtcccacgagga ccctgaagtgaagttcaattgtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagccccgggagga acagtacaacagcacctaccgggtggtgtcctgtgacctgctgcaccaggactggctgaacggcaaagaa tacaagtgaaggtgtccaacaaggccctgctgccccatcgagaaaaccatcagcaaggccaagggccag cccagagaaccccaggtgtacacactcccaccaagccgggaggaaatgaccaagaaccaggtgtccctgac ctgcctggtgaagggcttctacccagcgacattgccgtggagtgaggagcaacggccagcctgagaacaac tacaagaccacccctccagtcctcgattctgatggtatcttcttctgtactccaagctgacctggacaagagccg gtggcagcagggaaacgtcttttctgttccgtcatgcatgaggtctccacaatcactacaccagaagtccctga gcctgagccccggcaagggatccctcgaggtgctgtttcagggaccaggcagcagcctggacatctgcagaa gaacccctgccacaacggcggcctgtgcgaagagatcagccagggaagtgcggggcgacgtgttcccagcta cacctgtacctgctgaagggtacgccggcaaccactgcgagactaagtgcgtggaacccctgggaatggaa aacggcaatatcgccaacagccagatcgccgcccagctccgtcagagtgaaccttctgggactccagcactgggt gcccagctggccagactgaatagagccggcatggtcaacgcctggacccccagcagcaacgacgacaacc cctggattcaagtgaacctgctgcggcgatgtgggtcaccggcgtcgtgacacagggcgtagcagactggcc agccacgagtacctgaaggccttaaggtggcctacagcctgaacggccacgagttcgacttcacacgacgtg aacaagaacacaaagaatttgggcaactggaacaagaacgccgtgcagctgaacctgttcgagacaccc gtggaagcccagctacgtgcggctgtaccctaccagctgtcacaccgctgcacctaaagattcgagctgtgggt

		gcgagctgaacggctgcgctaatacctctgggcctgaagaacaacagcatccccgacaagcagatcacgcctc cagcagctacaagacctggggactgcacctgttcagctggaaccctagctacgccggctggacaagcagggc aactcaatgcttgggtggccggcagctacggcaacgaccagtggtccaggtggacctggcagcagcaaag aagtgaccggcatcatcacccagggggccagaaactcggcagcgtgcagttcgtggcctctacaaagtggcc tactccaacgacagcgccaactggaccgagtagaccaggaccctagaaccggcagctccaagatttccccggca actgggataaccacagccacaagaagaatctgttcgaaacccccatcctggcccgtacgtgcgcattctaccg gtcgctggcacaaccggatcgccctgagactggaactgctgggatgc
26	FP100 EGF-C2-C2	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVRGDVFPSTCTCLKGYAGNHCETKGCANP LGLKNNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYG NDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSNDSANWTEYQD PRTGSSKIFPGNWDNHSKKLNFETPILARYVRILPVAWHNRILRLLELLGCG CANPLGLKNNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVA GSYGNQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSNDSANW TEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHSKKLNFETPILARYVRILPVAWHNRILRL LLGC
27	FP100 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaaccctgccacaacggcggtctgtcgaagagatcagccaggaagtgcg ggcgacgtgtccccagctacacctgtacctgcctgaagggctacgccggcaaccactgcgagacaaag ggctgcgccaacccctgggcctgaagaacaacagcatccccgacaagcagatcacgccagcagca gctacaagacctggggcctgcacctgttcagctggaacccagctacgccggctggacaagcagggca actcaacgcctgggtggccggcagctacggcaacgaccagtggtgcaggtggacctggcagcagca aagaagtgaccggcatcatcacccagggcgccagaaactcggcagcgtgcagttcgtggccagctaca aggtggcctacagcaacgacagcgccaactggaccgagtagaccaggacccccggaccggcagctcaa gatcttccccggcaactgggacaaccacagccacaagaagaacctgttcgagacacccatcctggccag atacgtgcggatcctgccgtggcctggcacaaccggatcgccctgagactggaactgctgggtgcggct gtgcaatcctctgggactgaaaaacaattccatccctgataagcagattacagctccagctcctataaga catgggggctgcatctgtttcttgaacccctctacgtagactggataagcagggaaatttcaatgcttg gtggccgggtcctatgaaatgatcagtggtgcaggtggacctgggactcctcaaagaagtgcagggat tattacacaggggctcggaaacttggctctgtgcagtttgggtcctacaaagtggcttactccaacgattcc gccaattggacagaatatcaggatcccagaaccggctccagcaagatcttctggaaattgggataatca ctcccacaagaaaaatctgtttgaaacccctattctggctcgctatgtgcgcattctgcctgtggcttggcataat agaatcgctctgcggctggaactgctgggatgc
28	FP110 EGF-C1-C2- HSA	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVRGDVFPSTCTCLKGYAGNHCETKCVPLGME NGNIANSQIAASSVRVTFGLGLQHWVPELARLNRAGMVNAWTPSSNDDNPWIQV NLLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDIHVDNKKHKEFVG NWNKNAVHVNLFPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKN NSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNQWLQV DLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSNDSANWTEYQDPRTGSSKIFP GNWDNHSKKLNFETPILARYVRILPVAWHNRILRLLELLGCGSGSGSGSGS DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLNVNEVEFAKTCVA DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDD NPNLPRVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEARRHPYFYAPELFFAKRYKA AFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVA RLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTkvHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSIS SKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFL GMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVE EPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKA VMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLHHHHH

29	FP110 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaaccctgccacaacggcgccctgtgcgaagagatcagccaggaagtgcgggg cgacgtgttccccagctacacctgtacctgctgaagggctacgccggaaccactgcgagactaagtgcgtgg aaccctgggcatggaaaacggcaatatcgccaacagccagatcgccgagctccgtgcgctgacctttctg ggactgcagcactgggtgccgagctggccagactgaacagagccggcatggtgaacgcctggacccccagc agcaacgacgacaacccttgatccaggtgaacctgctgcgcgccggtgtgggtgacaggcgtggtgacacagg gcgccagcagactggccagccacgagctacctaaggccttaaggtggcctacagcctgaacggccacgagtt cgactcatccacgacgtgaacaagaaacacaaagaatttgtgggcaactggaacaagaacccgtgcacgtg aacctgttcgagacaccctggaagccagctacgtgcggtgtacccaccagctgccacaccgcctgcaccct gagattcgagctgctgggtgcgagctgaacggctgcgccaacccctgggctgaagaacaacagcatcccc gacaagcagatcaccgctccagcagctacaagacctggggcctgcacctgttcagctggaacccagctacg ccggctggacaagcagggcaactcaacgcctgggtggcggcagctacggcaacgaccagtggtgcagg tggacctgggcagcagcaagaagtaccggcatcatcaccagggggccagaaactcggcagcgtgcagt tcgtggcagctacaaagtggcctactccaacgacagcgccaactggaccgagctaccaggacccccggaccg gcagctccaagatcttccccggcaactgggacaaccacagccacaagaagaatctgttcgaaacccccatcct ggccagatacgtgcggatcctgccgtggcctggcacaaccggatcgccctgagactggaactgtgggatgtg gaggaagcggaggatctggcggtccggaggctctgacgcccacaagagcgaggtggccaccgggtcaagg acctgggcgaggaataactcaaggccctggtgtgatcgcttcgccagctacgtgcagcagagcccttcgaa gatcacgtaaaagttagtcaacgaggttacggaattcgaaagacatgcgttgctgacgaatccgctgagaattgtg acaagagtttgacactttattcgagataagttgtgtactgtactttgagagagacttacggtgaaatggctg actgtgtgcaaaacaggaaccagaacgtaacgaatgttcttcagcataaggatgataaccctaaccctccaa ggctgttaggccagaagtgcagctgatgtgcaccgccttccatgataatgaagagacttttctaaaaagttacctat acgagattgcaaggcgtcatcataattttacgcccagagctgtgttttcgaaagagatacaaaagctgcattac tgagtgttgcaagctgccgacaaggccgtgtgttgctaccaaagttggacgaattgagagacgagggtaaggc atcatctgccaagcagagattaaaatgtgatctttgcaaaaatttgagagagagcttttaaggcatgggtgttg cccgaactaagccaaagattcccaaaagccgaatttgctgaagtatccaagctggtgactgatttgactaaagtaca tacagaatgttgccatggcgaccttttagaatgtgctgatgacagagcagatttggttaagtatatctgcgaaaatca agattcaatcagctctaagctgaaggaatgttcgagaaaccactgttagaaaaatcgattgtattgtgaagttg aaaatgatgagatgcctgtgactgtccttcttgcgctgattttgttgagtcgaaggatgtctgtaagaattatgctg aagctaaagacgttttctgggtatgttcttatatgagtacgcaagacgtcaccagattactgtgtgttctgactg agattggctaaaacatacagagacaacgctggagaagtgtgtgctgcgctgacccctcatgagtgtatgcaaa ggttttgatgaattcaaacattggtgaagagcctcaaaacttgataaagcagaactgtgagctgttgagcaatt gggtgagtataagttccaaaatgccctgttggtgagatatacaaaaaaggtaccccaagtttcaacgccacttta gttgaagtgccagaaatcttggtaaagtgggtagcaaatgttgcaagcatccagaagccaagcgaatgccctgt gctgaggattatctgtccgtcgtgtgaaccaattgtgcgtattacagcaaaaaacccagctctctgatagagtcacc aaatgttgactgagtcactagttatagaaggcctgttttccgcttgggaagttgatgaaacctacgtgcctaagg aatttaacgctgagacctttaccttcacgctgacattgtactttgagtgaaaaagagcgtcaaatcaaaaagcaa accgctctgttgattgtgaaacacaagcctaaggctacgaaggagcagctaaagccgtcatggacgatttc gccgcatgttgtaaaaatgctgtaagctgatgacaaggaaacatgttctgctgaagaggggaaagaaattggtg cggccagtcaggccgacttggttgcaccatcatcaccatcac
30	FP220 HSA-EGF-C1- C2	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVA DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDD NPNLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKA AFTECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVA RLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTkVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSIS SKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFL GMFLYFYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVE EPQNLKQNCLEFELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKA VMDDFAAFVEKCKADDKETCFEEGKKLVAASQAGSGSGSGSGSLDICKS NPCHNGGLCEEISQEVGRDVFPSTCTCLKGYAGNHCEKTCVEPLGMENGNIA NSQIAASSVRVTFGLQHWVPELARLNLRAGMVNAWTPSSNDNPWIQVNLRR

		MWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDIHDVNKKHKEFVGNWNK NAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNNIPD KQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGS SKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSNDSANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWD NHSHKKNLFETPILARYVRILPVAWHNRIALRELLGCGSHHHHHH
31	FP220 Ácido nucleico	gacgcccacaagagcgaggtggccaccgggtcaaggacctgggagaggaaaactcaaggccctggtgctg atcgccctcgcccagtagctgcagcagagcccctcgaagatcacgtaaagtagtcaacgaggttacggaattc gcaaagacatgctgtgacgaatccgctgagaattgtgacaagagttgcacactttattcgagataagttgtg actgtagctactttgagagagacttacggtgaaatggctgactgctgtgcaaacaggaaccagaacgtaacga atgtttccttcagcataaggatgataaccctaacctccaaggctgttaggccagaagtcgacgtgatgtgcaccg ccttccatgataatgaagagacttttctaaaaagtacatatagagattgcaaggcgtcatccatattttacgccc agagctgtgttttcgcaaagagatacaaagctgcattactgagtggtgccaagctgccgacaaggccgctgttt gctaccaaagttggacgaattgagagacgagggtaaggcatcatctgccaagcagagattaaaaatgtgcatctt gcaaaaatttggagagagagctttaaggcatgggctgtgcccactaagccaaagattccaaaagccgaatt tgctgaagtatccaagctggtgactgatttgactaaagtacatacagaatgttgccatggcgacctttagaatgtgct gatgacagagcagatttggctaagtatatctgcgaaaatcaagattcaatcagctctaagctgaaggaaatgtgctg agaaaccactgttagaaaaatcgattgtattgctgaagttgaaaatgatgagatgctgctgactgtccttctctgc cgctgattttgtgagtcgaaggatgtctgtaagaattatgtgaagctaaagacgttttctgggtatgttcttatatga gtacgcaagacgtcacccagattactctgtggttctgctactgagattggctaaaacatacagagacaacgctggag aagtgtgtgctgcccgtgaccctcatgagtgctatgcaaaggtttttagtaattcaaacattggttgaagagcct caaaactgataaagcagaactgtgagctgtttgagcaattgggtgagtataagttccaaaatgccctgttggtgag atatacaaaaaaggtacccaagttcaacgccactttagttgaagtgccagaaatcttggtaaagtgggtgagc aatgttgcaagcatccagaagccaagcgaatgccctgtgctgaggattatctgctcgctgttgtaaccaattgtg cgtattacagaaaaaacccagctctgatagagtcaccaaatgttgactgagtcactagtaatagaaggcctt gttttccgctttggaagttgatgaaacctacgtgcctaaggaatttaacgctgagacctttacctttacgctgacatt gtactttgagtgaaaaagagcgtcaaatcaaaaagcaaaccgctctgttgaaattggtgaaacacaagcctaagg ctacgaaggagcagcttaaagccgctatggacgatttcgcccattgttgaaaaatgctgtaaagctgatgacaa ggaaacatgtttcgtgaagagggaaagaaattggtgcccagtcaggccggaggaagcggaggatctgg cgggtccggaggtctctagacatctgcagcaagaaccctgccacaacggcggcctgtgcaagagatcagc caggaagtgcggggcgacgtgtcccagctacacctgtacctgctgaagggctacgccggcaaccactgcg agactaagtgcgtggaaccctgggcatggaaaacggcaatatcgccaacagccagatcgccgccagctccgt gcgctgacctttctgggactgcagcactgggtgccgagctggccagactgaacagagccggcatggtgaac gcctggacccccagcagcaacgacgacaacccttgatccaggtgaacctgctgcggcggtatgtgggtgacag gcgtggtgacacagggcgccagcagactggccagccacgagtagctgaaggccttaagggtggcctacagcct gaacggccacgagttcgacttcatccacgacgtgaacaagaaacacaaagaatttgggcaactggaacaa gaacggcgtgcacgtgaacctgttcgagacaccgtggaagcccagtagctgcggctgtacccaccagctgc cacaccgctgcaccctgagattcgagctgtggtgctgcagctgaacggctgcgccaacccttggtgctgaa gaacaacagcatcccgcagaagcagatcacgcctccagcagctacaagacctggggcctgcacctgttcagc tggaacccagctacgcccggctggacaagcagggcaactcaacgcctgggtggccggcagctacggcaac gaccagtggctgcaggtggacctgggcagcagcaaagaagtaccggcatcatcaccagggggccagaaa cttcggcagcgtgcagttcgtggccagctacaaagtggcctactccaacgacagcgccaactggaccgagtagc aggacccccggaccggcagctccaagatctccccggcaactgggacaaccacagccacaagaagaatctgt tcgaaacccccatcctggccagatacgtgcggatcctgcccgtggcctggcacaaccggatcgccctgagactg gaactgctgggatgtggtctcaccaccaccatcaccat
32	FP250 EGF-HSA	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVVRGDVFPSTCTCLKGYAGNH CETKGS DAH KSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVA DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNL PRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFA KRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGER AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADL AKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK

		DVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAAD PHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQ VSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTP VSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEG KKLVAASQAALGLGSHHHHHH
33	FP250 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaatccttgccacaacggcgccctgtgcgaagagatttctcaagaagtgcggg gcgacgtttccccagctacacctgtacatgtctgaagggctacgcccgaaccactgcgagacaaaagg atccgatgtcacaagagcgaggtggccacagattcaaggatctggggaagagaacttcaaggccct ggtgctgatcgcttcgctcagtatctccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagt gaccgagttcgccaagacctgtgtggccgatgagagcgccgagaactgtgataagagcctgcacaccctg ttcggcgacaagctgtgtacagtggccacactgagagaaacctacggcgagatggccgactgctgtcca agcaagagcccagagagaaacgagtgtctcctgcagcacaaggacgacaaccccaacctgcttagactc gtgcgacccgaagtggatgtgtgtgcaccgccttcacgacaacgaggaaccttctgaagaagtacct gtacgagatcgccagacggcaccctacttttatgccctgagctgtgttcttcgcaagcgggtataaggcc gccttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggctgcctgtctgtcctaagctggacgagctgagagat gagggcaaagccagctctgccaagcagagactgaagtgcgccagcctgcagaagttcggcgagagag ctttaaggcctgggccgttgccagactgagccagagatttctaaggccgagtttgcgaggtgtccaagct cgtgaccgatctgacaaagggtcacaccgagtgctgtcacggcgatctgtggaatgtgccgacgataga gccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaagagtgctgcga gaagcccctgctggaaaagtctcactgtatcgccgaggtggaaaacgacgagatgcctgccgatctgccta gcctggctgccgatttcgtggaaagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgaggccaaggatgtgttctg ggcatgtttctgtatgagtacggcgagacaccccactattctgtgttctgtctgcggctggccaaaac ctacgagacaacctggaaaaatgtgcgcgctgcgcgacacctcacgagtggtatgccaagggtgttcgacg agttcaagcctctggtggaagaacccagaaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctggg cgagtacaagttccagaatgcctgtctgtgcggtacaccaagaaagtgcctcaggtgtccacacctacac tggttgaggtgtccggaatctgggcaaagtgggcagcaaggttgcaagcacctgaggccaagagaat gccttgccgagagattacctgagcgtggtgtgaatcagctgtgcgtgtgcacgagaaaacctgtgtc cgacagagtgaccaagtgtgtaccgagagcctcgtgaacagaaggcctgttagcgccctggaagtg gacgagacatacgtgccaaagagttcaacgccgagacattcaccttcacgccgacatctgtacctgag cgagaaagagcgccgagatcaagaagcagacagccctggtcagagctggttaagcacaagcccaaggcc accaaagaacagctgaaggccgtgatggacgactcgccgccttctgcgagaagtgtgcaaggccgacg acaaagagacatgcttcgccaagagggaagaaactggtggctgcctctcaggctgctctcgacttggc tctcaccaccaccatccat
34	FP260 EGF-HSA-C1	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVRGDVFPSTCTCLKGYAGNHCETKGSDAH KSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLNEVTEFAKTCVA DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVPRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEARRHPYFYAPELLFFA KRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELREDEGKASSAKQRLKASLQKFGER AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADL AKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK DVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAAD PHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQ VSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTP VSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEG KKLVAASQAALGLGGSGGSGGSGGSCVEPLGMENGNIANSQIAASSVRVTF LGLQHWVPELARLNLRAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLRRMWVTGVVTQ

		GASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDIFIHVDVNNKKHKEFVGNWNKNNAVHVNL FETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCGSHHHHHH
35	FP260 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaatccttgccacaacggcggcctgtgcgaagagatttctcaagaagtgcggg gcgacgtttccagctacacctgtacatgtctgaagggtacgcccggcaaccactgcgagacaaaagg atccgatgtcacaagagcgaggtggccacagattcaaggatctgggcgaagagaacttcaaggccct ggtgctgatcgcttcgctcagtatctccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagt gaccgagttcgccaagacctgtgtggccgatgagagcgccgagaactgtgataagagcctgcacacctg ttcggcgacaagctgtgtacagtggccacactgagagaaacctacggcgagatggccgactgctgtgcca agcaagagcccagagaaaacgagtgtcttcgagcacaaggacgacaaccccaacctgcctagactc gtgcgacccgaagtggatgtgatgtgcaccgcttcacgacaacgaggaaaccttcctgaagaagtacct gtacgagatcgccagacggcaccctactttatgccctgagctgtgttcttcgccaagcgggtataaggcc gccttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggctgctgtctgctgctaagctggacgagctgagagat gagggcaaagccagctctgccaagcagagactgaagtgcgccagcctgcagaagttcggcgagagag ctttaaggcctggccgttgccagactgagccagagatttctaaggccgagttgccgaggtgtccaagct cgtgaccgatctgacaaaggtgcacaccgagtgctgtcacggcgatctgtggaatgtgccgacgataga gccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaagagtgctgcga gaagccccctgtggaaggtctcactgtatcgccgaggtggaaaacgacgagatgcctgccgatctgccta gcctggctgccgatttctgtggaagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgaggccaaggatgtgttctg ggcatgtttctgtatgagtacgcccgagacaccccactattctgtgttctgtctgtcgcgctggccaaaac ctacgagacaacctggaaaaatgtgcgcgctgcccgcctcacagagtgatgccaaggtgttcgacg agttcaagcctctggtggaagaacccagaaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctggg cgagtacaagttccagaatgccctgctgtgcggtacaccaagaaagtgccctcaggtgtccacacctacac tggttgaggtgtcccgaatctgggcaaagtgggcagcaaggttgcaagcacctgaggccaagagaat gccttgccgagaggattacctgagcgtggtgctgaatcagctgtgcgtgctgcacgagaaaacctgtgtc cgacagagtgaccaagtgtgtaccgagagcctcgtaacagaaggcctgttttagcgccctggaagtg gacgagacatacgtgccaaagagttcaacgccgagacattcaccttcacgccgacatctgtaccctgag cgagaaagagcggcagatcaagaagcagacagccctggtcgagctggttaagcacaagcccaaggcc accaaagaacagctgaaggccgtgatggacgacttcgccgctttgtcgagaagtgtgcaaggccgacg acaaagagacatgcttcgccgaagagggcaagaaactggtggtgcctctcagggtgctctcgacttg aggaagcgggaggtatctggcggttcgggaggtcttgtgtggaacccctcgcatggaaaacggcaatac gccaatagccagattgccgccagcagcgtcagagtgacatttctgggactgcagcactgggtgcccagct ggctagactgaatagagccggcatggtcaacgcctggacaccagcagcaacgacgataaccttggtgatt caagtgaacctgctgcggcgtatgtgggtcacaggtgtgttacacagggcgcccttagactggccagccac gagtatctgaaggccttaaggtggcctacagcctgaacggccacgagttcgactcatccacgacgtgaac aagaagcacaagagttgtcggaactggaacaagaacgcggtgcacgtgaacctgttcgagacacct gtggaagcccagtagctgagggtgtaccctacaagctgtcacaccgctgcactctgagattcgaactgctg ggatgcggctctcaccaccaccatcaccat
36	FP270 EGF-HSA-C2	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVRGDVFPSTCTCLKGYAGNHCETKGSDAH KSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLNVNEVEFAKTCVA DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFA KRYKAAFTCECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKASLQKFGER AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADL AKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESK DVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAAD PHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQ NALLVRYTKKVPQ VSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTP VSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD ETVVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEG

		KKLVAASQAALGLGGSGGSGGSGGSCANPLGLKNNIPDKQITASSSYKTW GLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQ GARNFGSVQFVASYKVAYSNDSANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHSKK NLFETPILARYVRILPVAWHNRIALRLELLGCGSHHHHHH
37	FP270 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaatccttgccacaacggcgccctgtgcgaagagatttctcaagaagtgcggg gcgacgttttccccagctacacctgtacatgtctgaagggtacgccggcaaccactgagagacaaaagg atccgacgcccacaagagcgagggtggcccaccggttaaggacctgggagagaaaactcaaggccc tgggtctgatcgcttcgcccagctacgtgcagcagagccccttcgaagatcacgtaaagtagtcaacgagg ttacggaattcgcaaagacatgcgtgtgcgaatccgctgagaattgtgacaagagttgacactttatc ggagataagttgtactgtactgttagagagacttacggtgaaatggctgactgctgtgcaaaacagg aaccagaacgtaacgaatgttcttcagcataaggatgataaccctaacctccaaggctgttaggccag aagtcgacgtgatgtgcaccgccttcagataatgaagagacttttctaaaaagtacatacagagattgca aggcgtcatccatatttttacgcccagagctgtgtttttcgcaaagagatacaaaagctgcattactgagtgt gccaagctgccgacaaggccgctgtttgctaccaaagttggacgaattgagagacgagggtaaggcatc atctgccaagcagagattaaaatgtcatctttgcaaaaattggagagagagctttaaggcatgggctgtg cccgactaagccaaagattcccaaaagccgaatttgctgaagtatccaagctggtgactgattgactaaag tacatacagaatgttgccatggcgaccttttagaatgtgctgatgacagagcagattggctaagtatatctgc gaaaatcaagattcaatcagctctaagctgaaggatgttgcgagaaccactgttagaaaaatcgattgt attgctgaagttgaaaatgatgagatgcctgctgactgccttctctgccgctgattttgtgagtcgaaggatgt ctgtaagaattatgctgaagctaaagacgtttctctgggtatgttcttatatgagtacgcaagacgtcaccaga ttactctgtggttctgctactgagattggctaaacatacagagacaacgctggagaagtgtgtgtgctgccgctg accctcatgagtgtatgcaaagggttttgatgaattcaaacattgggtgaagagcctcaaaacttgataaag cagaactgtgagctgttgagcaattgggtgagtataagtccaaatgccctgttggtgagatatacaaaaa aggtaccccaagtttaacgcccactttagttgaagtgtccagaaatcttggttaaagtggttagcaaatgtgc aagcatccagaagccaagcgaatgccctgtgctgaggattatctgtccgctggttgaaccaattgtgcgtatt acacgaaaaaaccagctctctgatagagtcaccaaattgtgactgagtcactagttaatagaaggccttg ttttccgctttggaagtgtatgaaacctacgtgcctaaggaatttaacgctgagacctttacctttcacgctgac attgtactttgagtgaaaaagagcgtcaaatcaaaaagcaaaccgctctgttgtaattggtgaaacacaag cctaaggctacgaaggagcagctaaagccgctatggacgatttcgccgattgtgaaaaatgctgtaa gctgatgacaaggaaacatgttctgctgaagagggaaagaaattggttgcggccagtcaggccgcaacttg gtttgggaggaagcggaggatctggcggttccggaggctcttgcgccaacccccctgggctgaagaacaa cagcatccccgacaagcagatcaccgcctccagcagctacaagacctggggcctgcacctgttcagctgg aaccacagctacgcccggctggacaagcagggcaactcaacgcctgggtggccggcagctacggcaa cgaccagtggctgcaggtggacctgggcagcagcaagaagtaccggcatcatcaccagggggcca gaaactcggcagcgtgcagttcgtggccagctacaaagtggcctactccaacgacagcgccaactggac cgagtaccaggacccccggaccggcagctccaagatctccccggcaactgggacaaccacagccaca agaagaatctgttcgaaaccccatctggccagatacgtgcggatctgccgctggcctggcacaaccgg atcgccctgagactggaactgctgggatgtggctctcaccaccatcaccat
38	FP280 EGF(RGE)– HSA–C1–C2	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEV RGE VFPSYCTCLKGYAGNH CETKGSDAH KSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVA DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELFFA KRYKA AFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGER AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADL AKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESK DVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAAD PHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQ NALLVRYTKKVPQ VSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTP VSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVD ETVVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE

		RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCF AE EG KKLVAASQAALGLGGSGGSGGSGGSCVEPLGMENGNIANSQIAASSVRVTF LGLQHWVPELARLRNLRAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLRRMWVTGVVTQ GASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDIFIHDVNKKHKEFVGNWNKNNAVHVN FETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNN SIPDKQITA SSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSK EVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSNDSANWTEYQDPRTGSSKIFPGNW DNHSHKKNLFETPILARYVRILPVAWHNRIALRLELLGCGSHHHHHH
39	FP280 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaatcctgccacaacggcggcctgtgcgaagagatttctcaagaagtgcggg gcgagggtttccccagctacacctgtacatgtctgaagggtctacgcccgaaccactgcgagacaaaagg atccgatgtctacaagagcgagggtggccacagattcaaggatctgggcgaagagaacttcaaggccct ggtgctgatcgccctcgctcagtatctccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagt gaccgagttcgccaagacctgtgtggccgatgagagcgccgagaactgtgataagagcctgcacaccctg ttcggcgacaagctgtgtacagtggccacactgagagaaaacctacggcgagatggccgactgctgtgcca agcaagagcccagagaaaacgagtgcttctgcagcacaaggacgacaaccccaacctgcctagactc gtgcgaccgaagtggatgtgatgtgcaccgccttcacgacaacgaggaaaccttctgaagaagtacct gtacgagatcgccagacggcaccctactttatgccctgagctgctgttctcgccaagcgggtataaggcc gccttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggctgcctgtctgtcctaagctggacgagctgagagat gagggcaaagccagctctgccaagcagagactgaagtgcgccagcctgcagaagttcggcgagagag ctttaaggcctgggcccgttgccagactgagccagagatttctaaggccgagttgcccagggtgtccaagct cgtgaccgatctgacaaagggtgcacaccgagtgctgtcacggcgatctgtggaatgtgccgacgataga gccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaagagtgctgcga gaagcccctgctggaaggtctactgtatcgccgaggtggaacacgacgagatgcctgccgatctgccta gcctggctgccgatttctgtggaagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgaggccaaggatgtgttctg ggcatgtttctgtatgagtacgcccgagacaccccgcactattctgtgttctgtgctgcggctggccaaaac ctacgagacaaccttgaaaaatgctgcgcgctgccgatcctcacgagtggtatgccaagggttgcagc agttcaagcctctggtggaagaacccagaaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctggg cgagtacaagttccagaatgccctgctcgtgcggtacaccaagaagtgccctaggtgtccacacctacac tggtgaggtgtccggaatctgggcaaagtgggcagcaagtggtgaagcacctgaggccaagagaat gccttgccgagaggattacctgagcgtggtgtgaatcagctgtgcgtgctgcacgagaaaacctgtgtc cgacagagtgaccaagtgtgtaccgagagcctcgtgaacagaaggcctgttttagcgccctggaagtg gacgagacatacgtgcccaaagaggtcaacgccgagacattcaccttcacgccgacatctgtaccctgag cgagaaagagcggcgagatcaagaagcagacagccctggtcgagctggttaagcacaagcccaaggcc accaaagaacagctgaaggccgtgatggacgacttcgccgcctttgtcgagaagtgtgcaaggccgacg acaaagagacatgcttcgccgaagagggcaagaaactggtggtgcctctcagggtgtctcggacttg aggaagcgggaggtatctggcggttccggagggtcttctgtggaacccctggcatgaaaaacggcaatac gccaatagccagattgccgagcagcgtcagagtgcatttctgggactgcagcactgggtgcccagact ggctagactgaatagagccggcatggtcaacgcctggacaccagcagcaacgacgataaccttggtgatt caagtgaacctgctgcggcgatgtgggtcacagggtgtgttacacagggcgccctctagactggccagccac gagtatctgaaggccttaagggtggcctacagcctgaacggccacgagttcgacttcacacgacgtgaac aagaagcacaagagttgtcggcaactggaacaagaacgccgtgcacgtgaacctgttcgagacacct gtggaagcccagctacgtgcggctgtacctaagctgtcacaccgctgcactctgagattcgaactgtctg ggatgcgagctgaacggctgtgttaacctctgggctgaagaacaacagcatccccgataagcagatca ccgccagctccagctataagacatggggcctgcacctgttcagctggaacccttctacgccagactggaca agcagggcaactcaatgcttgggtggccggcagctacggcaatgatcagtggtgcaagtggacctggg cagcagcaaagaagtacagggcatcatcaccagggcgccagaaatttcggcagcgtgcagttgtggcc agctacaaagtggcctactccaacgacagcgccaactggaccgagtatcaggacctagaaccggcag ctccaagatctccccggcaattgggacaaccacagccacaagaagaatctgttcgaaacctatcctgg

		ccagatatgtgcgcattctgcccgtggcctggcacaacagaattgccctgagactggaactgctcggctgtg gctctcaccaccaccatcaccat
40	FP320 EGF-HSA D3- C1-C2-His	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVGRDVFPSTCTCLKGYAGNHCETKGS LVEEPQ NLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCK HPEAKRMPCAEDCLSVFLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEV DETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVM DDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSGGSGGSGGSCVEP LGMENGNANSQIAASSVRVTFGLQHWVPELARLNRAGMVNAWTPSSNDDNP WIQVNLLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDFIHDVNKKHK EFVGNWNKNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPL GLKNN SIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQ WLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSND SANWTEYQDPRTGS SKIFPGNWDNHSHKKNLFETPILARYVRILPVAWHNRIALRLELLGCGSHHHHHH
41	FP320 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaatccttgccacaacggcgccctgtgcgaagagatttcaagaagtgcggggcga cgttttcccagctacacctgtacatgtctgaagggctacgccggcaaccactgcgagacaaaaggatccctggt ggaagaaccccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctgggcgagtacaagtccagaat gccctgctcgtgcggtacaccaagaaagtcctcaggtgtccacacctacactggcgaggtgccagaaacctg ggcaaagtgggcagcaagtgcgtgaagcaccctgaggccaaaagaatgcctgcgcgaggattgcctgagc gtgttctgaatcagctgtgcgtgcgcagagaaaacctgtgtccgacagagtaccaagtgtgtaccgag agcctggtcaacggcagacctgtcttagcgccctggaagtggatgagacatactgccc aaagagtcaacgc cgagacattcacctccacgccgacatctgtaccctgagcgagaaagagcggcagatcaagaagcagacagc cctggtcgagctggtcaagcacaagcctaaggccaccaaagaacagctgaaggcctgatggacgacttcgc cgcttctgtgaaaagtgttgcaaggccgacgacaagagacatgcttcgccgaagagggcaagaaactggt ggctgcctctcaggctgtctcggacttgagggaagcggaggatctggcggttcggaggctctgtgtggaacc ctcggcatggaaaacggcaatatcgccaatagccagatcgccgcagcagctcagagtacatttctgggact gcagcactgggtgccagagctggctagactgaatagagcggcgatggtcaacgcctggacaccagcagcaa cgacgacaacccctggattcaagtgaacctgtgcggcgatgtggtcacaggtgtgttacacagggcgctct agactggccagccacgagtatctgaaggccttaagggtggcctacagcctgaacggccacgagttcgactcatc cacgacgtgaacaagaagcacaaagagttgtcggaactggaacaagaacgcgctgcacgtgaacctgttcg agacacctgtggaagcccagctacgtgcggctgtaccctacaagctgtcacaccgctgcacactgagattcgaa ctgctgggatgagctgaacggctgtgtaactctctgggctgaagaacaacagcatccccgataagcagat caccgcctccagcagctataagacatggggcctgcacgttcagctggaacctagctacgccagactggaca agcagggcaacttaatgcctgggtggcggcagctacggcaatgatcaatggctgaagtggacctgggcagc agcaaagaagtgaccggcatcattacccagggcgcaagaaatttcggcagcgtgcagttcgtggccagctaca aagtggcctactccaacgacagcgccaactggaccgagatcaggaccctagaaccggcagctccaagatctt ccccggcaattgggacaaccacagccacaagaagaatctgttcgaaaccctatcctggccagatatgtgcga ttctgccgtggcctggcacaacagaattgccctgagactggaactgctcggctgtggctctcaccaccaccatca ccat
42	FP330 EGF-HSA-C1- C2	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVGRDVFPSTCTCLKGYAGNHCETKGS DAHKSE VAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA KQEPERNECFLQHKDDNP NLPRL VRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT ECCCQ AADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFP KAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVK NYAEAKDVFLGMFLY EY ARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIK QNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEA KRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETY VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFA AFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSGGSGGSGGSCVEPLGM ENGNIANSQIAASSVRVTFGLQHWVPELARLNRAGMVNAWTPSSNDDNPW IQ

		VNLLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDIFIHDVNKKHKEFV GNWNKNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLK NNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQ VDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSNSDSANWTEYQDPRTGSSKIF PGNWDNHSKKNLFETPILARYVRILPVAWHNRIRLLELLGC
43	FP330 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaatccttgccacaacggcgccctgtgcaagagatttcaagaagtgcggggcga cgttttcccagctacacctgtacatgtctgaagggtacgcccgaaccactgagagacaaaaggatccgatgc tcacaagagcagaggtggccacagattcaaggatctgggcgaagagaacttcaaggccctggtgctgatcgct tcgctcagatctccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagtgcgaggttcgccaag acctgtgtggccgatgagagcgcgagaaactgtgataagagcctgcacacccgttcggcgacaagctgtgtac agtggccacactgagagaaaactacggcgagatggcgcactgtgtgccaagcaagagcccagagagaaacg agtgttctcgcagcacaaggacgacaaccccaacctgctagactcgtgcgaccgaagtggatgtgatgtgc accgctttcacgacaacgaggaacaccttctgaagaagtacgtgtacgagatcgccagacggcaccctacttt tatgcccctgagctgtgttcttcgccaagcgggtataaggccgcttcaccgaatgttgccagggcgtgataaggc tgctgtctgtgctaagctggacgagctgagagatgagggcaaagccagctctgccaagcagagactgaagt gcgcccagcctgcagaagttcggcgagagagctttaaaggcctgggcccgttgccagactgagccagagatttcta aggccgagtttgccgaggtgtccaagctcgtgaccgatctgacaaaaggtgcacaccgagtgctgtcacggcgat ctgtctggaatgtccgacgatagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagc aagctgaaagagtgtgcgagaagcccctgtggaagaaagctcactgtatcgccgaggtggaagaaacgacgag atgctgcccgatctgcctagcctggctgcccgaattcgtggaagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgagggc caaggatgtgttctgggcatgttctgtatgagtagcggcgagacaccccactattctgtgttctgtctgtcgg ctggccaaaacctacgagacaacccctggaagaaatgtcgcgcgctgcccgatcctcacgagtggtatgccaaggt gttcgacgagttcaagcctctggtggaagaaccccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagc tgggcgagtacaagttccagaatgccctgctcgtgcggtacaccaagaagtgccctagggtgtccacacctacac tggttgaggtgtcccgaatctgggcaaagtgggcagcaagtggtgcaagcaccctgaggccaagagaatgcct tgccgagaggattacctgagcgtggtgtgaatcagctgtgctgtgcacgagaaaacccctgttccgacaga gtgaccaagtgtgtaccgagagcctcgtgaacagaaggccttcttagcgcctggaagtggacgagacata cgtgccaaaagagttcaacgcccagacattcacctccacgcccagatctgtacctgagcgagaaagagcgg cagatcaagaagcagacagccctggtcgagctggttaagcacaagcccaaggccaccaagaacagctgaa ggccgtgatggacgacttcgccccttctgcgagaagtgtcgaaggccgacgacaaaagagacatgcttcgccg aagagggcaagaaactggtggctgctctcaggctgtctcggacttgagggaagcggaggatctggcggttcc ggaggctctgtgtggaacccctcgccatggaagcggcaatatcgccaatagccagattgccgcccagcagcgt cagagtgacatttctgggactgcagcactgggtgccgagctggctagactgaatagaccggcatggtcaacg cctggacacccagcagcaacgacgataaccctggattcaagtgaacctgtgcggtatgtgggtcacagggt gtgttacacagggcgccctctagactggccagccacgagtatctgaaggcctttaagggtggcctacagcctgaac ggccacgagttcgacttcatccacgagctgaacaagaagcacaagagttgttcggcaactggaacaagaacg ccgtgcacgtgaacctgttcgagacacctgtggaagcccagtagctgcggtgtaccctacaagctgtcacaccg cctgcactctgagattcgaactgtggtatgcgagctgaacggctgtgtaacctctgggcctgaagaacaaca gcatccccgataagcagatcaccgccagctccagctataagacatggggcctgcacctgttcagctggaacctt cttacgccagactggacaagcagggcaactcaatgcttgggtggccggcagctacggcaatgatcagtggtg caagtggacctgggcagcagcaagaagtgcagggcatcatcaccaggggcgccagaaattcggcagcgtg cagtttggccagctacaaagtggcctactccaacgacagcgccaactggaccgagatcaggaccctagaac cggcagctccaagatcttcccggcaattgggacaaccacagccacaagaagaatctgttgaaacccctatcc tgccagatatgtgcgcatctgcccgtggcctggcacaacagaattgccctgagactggaactgtcggctgt
44	FP278 Etiqueta EGF- HSA-C1-C2 His	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVVRGDVFPSTCTCLKGYAGNHCEETKGSDAHKSE VAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQKQEPERNECFLQHKDDNPPLRL VRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQ AADKAACLLPKLDELREDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFP KAFAEVSKLVTDLTkvHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDVFLGMFLYEY ARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIK

		QNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEA KRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETY VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFA AFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSGGSGGSGGSCVEPLGM ENGNIANSQIAASSVRVTFGLQHWVPELARLNAGMVNAWTPSSNDDNPWIQ VNLLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSINGHEFDIHDVNKKHKEFV GNWNKNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLK NNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQ VDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSNDSANWTEYQDPRTGSSKIF PGNWDNHNHSHKKNLFETPILARYVRILPVAWHNRIRLLELLGCGSHHHHHH
45	FP278 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaatcctgccacaacggcgccctgtgcgaagagatttcaagaagtgcggggcga cgtttccccagctacacctgtacatgtctgaagggctacgccggcaaccactgcgagacaaaaggatccgatgc tcacaagagcgaggtggccacagattcaaggatctggcggaagagaacttcaaggccctggtgctgatcgct tcgctcagtatctccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagtgcacaggttcgccaag acctgtgtggcctgatgagagcgccgagaactgtgataagagcctgcacacccgttcggcgacaagctgtgtac agtggccacactgagagaaaactacggcgagatggcgcactgtgtgccaagcaagagcccagagagaaacg agtgtctcctgcagcacaaggacgacaaccccaacctgcctagactcgtgcgacccgaagtggatgtgatgtgc accgctttcacgacaacgaggaaaccttcctaagaagtacgtgtacgagatgccagacggcaccctacttt tatgcccctgagctgtgttctcgccaagcgggtataaggccgcttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggc tgctgtctgtgcctaagctggacgagctgagagatgagggcaaagccagctctgccaagcagagactgaagt gcgccagcctgcagaagttcggcgagagagctttaaggcctgggcccgttgccagactgagccagagatttcta aggccgagtttgcgaggtgtccaagctcgtgaccgatctgacaaaggtgcacaccgagtgctgtcacggcgat ctgtggaatgtgcgacgatagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagc aagctgaaagagtgtgcgagaagccctgtggaaaagtctcactgtatcgccgaggtggaacacgacgag atgcctgccgatctgcctagcctggctgccgattcgtggaaagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgaggg caaggatgtttctgggcatgtttctgtatgtagtaccgcccagacaccccgactattctgtgttctgtctgtcgg ctggccaaaacctacgagacaaccttgaaaaatgtgcgcccgtgccgatcctcacgagtggttatgccaaggt gttcgacgagttcaagcctctggtggaagaaccccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagc tgggcgagtacaagttccagaatgccctgctgtgcggtacaccaagaaagtgcctcaggtgtccacacctacac tggttgaggtgtcccggaatctgggcaaagtgggcagcaagtggtgcaagcacctgaggccaagagaatgcct tgccgagaggattacctgagcgtggtgtgaatcagctgtgcgtgtgcacgagaaaacctgtgtccgacaga gtgaccaagtgtgtaccgagagcctcgtgaacagaaggcctgtcttagcgcctggaagtggacgagacata cgtgcccaaagagttcaacgccgagacattcaccttcacgccgacatctgtaccctgagcgagaaagagcgg cagatcaagaagcagacagccctggtcgagctggttaagcacaaagcccaaggccacaaagaacagctgaa ggccgtgatggacgacttcgcccctttgtcagaagtgtgcaaggccgacgacaaagagacatgcttcgccc aagagggcaagaactggtggctgcctctcaggctgtctcggacttgaggaagcggaggtatggcggttc ggaggctctgtgtggaacccctcggcatggaacacggcaatatcgccaatagccagattgccgcagcagcgt cagagtgacatttctgggactgcagcactgggtgccgagctggctagactgaatagagccggcatggtcaacg cctggacaccagcagcaacgacgataaccttgattcaagtgaacctgtgcggcgatgtgtgggtcacaggt gtgttacacagggcgctctagactggccagccacgagtatctgaaggccttaagggtggcctacagcctgaac ggccacgagttcgacttcacacgacgtgaacaagaagcacaagagttgtcggaactggaacaagaacg ccgtgcacgtgaacctgttcgagacacctgtggaagcccagtagctgcgggtgtacctacaagctgtcacaccg cctgactctgagattcgaactgctggatgcgagctgaacggctgtgtaacctctgggctgaagaacaaca gcatccccgataagcagatcaccgccagctccagctataagacatggggcctgcacctgttcagctggaacctt cttacgccagactggacaagcagggcaactcaatgcttgggtggccggcagctacggcaatgatcagtggtg caagtggacctgggcagcagcaagaagtgcagggcatcatcaccagggcgccagaaaatttcggcagcgtg cagttgtggccagctacaaagtggcctactccaacgacagcgcaactggaccgagtatcaggacctagaac cggcagctccaagatcttcccggcaattgggacaaccacagccacaagaagaatctgttcgaaacccctatcc tgccagatatgtgcgattctgcccgtggcctggcacaacagaattgcctgagactggaactgtcggctgtgg ctctcaccaccacatcacat
46	FP068	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVGRDVFPSYTCTCLKGYAGNHCETKDAHKSEVA HRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCD

		KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRPVR PEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAA DKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPA EFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK PILLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR RHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFEDEFKPLVEEPQNLIKQN CELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKR MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV EKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALCVEPLGMENGNIANSQIAASSVRVTF GLQHWVPELARLN RAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLRRMWVTGVVTQGASR LASHEYLKAFKVAYS LNHGHEFDIHDVNKKHKEFVGNWNKNAVHVNLFETPVEA QYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNNSIPDKQITASSSYKTWGL HLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNF GSVQFVASYKVAYS NDSANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHSHKKNLFETPILA RYVRILPVAWHNRIALRLELLGC
47	FP068 Ácido nucleico	ctggacatctgtagcaagaaccttgccacaacggcgccctgtgcgaagagatttcaagaagtgcggggcga cgttttccagctacacctgtacatgtctgaagggtacgccggcaacctgagagacaaggatgccaca agagcgaggtggccacagattcaaggatctggcggaagagaactcaaggccctggtgtgatcgcccttgc cagtatctccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagtaccgagttcgccaagacctg tgtggcgtgagagcgccgagaactgtgataagagcctgcacacctgttcggcgacaagctgtgtacagtgg ccacactgagagaaacctacggcgagatggccgactgtgtgccaagcaagagcccgagagaaacgagtgc ttctccagcacaaggacgacaaccccaacctgcctagactcgtgcgaccgaagtggatgtgtgacccgc cttcacgacaacgaggaaaccttctgaagaagtacgtgtacgagatcgccagacggcaccctactttatgcc cctgagctgtgttcttcgccaagcgtataaggccgcttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggctgcctg tctgtgcctaagctggacgagctgagagatgagggcaaacgagctgtgccaagcagagactgaaatgcgcc agcctccagaagtgcggcgagagagctttaaggcctgggcccgttgccagactgagccagagatttctaaggcc gagtttgcgaggtgtccaagctcgtgaccgatctgacaaagggtgcacaccgagtgctgtcacggcgatctgtg gaatgtgccgacgatagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctg aaagagtgctgcgagaagcccctgtcgaaaagtctcactgtatcgccgaggtggaaaacgacgagatgcctg ccgatctgcctagcctggctgcccatttctgtgaaagcaaggacgtgtgcaagaactacgcccaggccaaggat gtgtttctgggcatgtttctgtatgtagtaccgcccagacaccccactatttctgtgttctgtgtgcggctggcca aaacctacgagacaaccttgaaaaatgctgcgccgctgcccgtcctcacgagtggtatgccaaaggtgttcgac gagttcaagcctctggtggaagaaccccagaaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctgggcg agtacaagttccagaatgccctgctcgtgcggtacaccaagaaagtgcctcaggtgtccacacctacactggtg agggtgtcccgaatctgggcaaatgggcaagtggtgcaagcacctgaggccaagagaatgccttgcgc cgaggattacctgagcgtggtgtgaatcagctgtgcgtgtgcacgagaaaacccctgtgtccgacagagtgc caagtgtgtaccgagagcctcgtgaacagaaggccttcttagcgccctggaagtggacgagacatacgtgc ccaaagagttcaacgcccagacattcacctccacgcccagacatctgcacctgtccgagaaagagcggcagat caagaagcagacagccctggtcagctggttaagcacaagcccaaggccaccaaaagacagctgaaggcc gtgatggacgacttcgccgcttctgcgagaagtgtgcgaaggccgacgacaaagagacatgcttcgccgaaga gggcaagaaactggtggtgcttctcaggccgctcgtgtgtggaacccctcgcatggaaaacggcaatatcgc caatagccagattgccccagcagcgtcagagtacatttctgggactgcaacactgggtgcccagctggcta gactgaatagagccggcatggtcaacgctggacaccagcagcaacgacgataatccctggattcaagtgaa cctgctgcggcgtatgtgggtcacaggtgtgttacacagggcgcaagcagactggccagccagctatctgaa ggcctttaagggtggcctacagcctgaacggccacgagttcactcatccacgacgtgaacaagaagcacaaa gagtttctgggcaactggaacaagaacggcgtgcacgtgaacctgttcgagacacctgtggaagcccagctacgt gcggctgtacctacaagctgtcacaccgctgcactctgagattcgaactgctgggatgcgagctgaacggctgt gctaactcttgggctgaagaacaacgacatccccgataagcagatcaccgccagctccagctataagacatg gggctgcacctgttcagctggaaccttcttacgccagactggacaagcagggaacttcaatgcttgggtggcc ggcagctacggcaatgatcagtggtgcaagtggacctgggcagcagcaagaagtgcagggcatcatcacc caagggggcagaaattcggcagcgtgcagttcgtggccagctacaaagtgcctactccaacgacagcgcca

		actggaccgagtatcaggaccctagaaccggcagctccaagatctccccggcaattgggacaaccacagcca caagaagaatctgttcgaaaccctatcctggccagatatgtgctgcattctgccgtggcctggcacaacagaatt gccctgagactggaactgctcggtgc
48	FP776	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVRGDVFPSTCTCLKGYAGNH CETKDAH KSEVA HRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCD KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVR PEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAA DKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPA EFAEVS KLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK PLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR RHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQN CELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKR MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV EKCKADDKETCFAEEGKKLVACVEPLGMENGN IANSQIAASSVRVTFGLGLQHW VPELARLN RAGMVNAWTPSSNDDNPWIQV NLLRRMWVTGVVTQGASRLASHE YLKAFKVAYS LNHGHEFDFIHDVNKKHKEFVGNWNKN AVHVNLFETPVEAQYVRL YPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNN SIPDKQITASSSYKTWGLHLFSW NPSYARLDKQGNFN AWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQF VASYKVAYS NDSANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDN HSHKKNLFETPILARYVRIL PVAWHNR IALRLELLGC
49	FP776 Ácido nucleico	ctggacatctgtagcaagaacccttgccacaacggcgccctgtgcaagagatttcaagaagtgcggggcgca cgttttcccagctacacctgtacatgtctgaagggtacgcccgaaccactgcgagacaaaggatgccaca agagcgaggtggccacagattcaaggatctgggcaagagaactcaaggccctggtgctgatcgcttgcgt cagtatctccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagtgaccgagttcgccaagacctg tgtggc gatgagagcgccgagaactgtgataagagcctgcacacctgttcggcgacaagctgtgtacagtgg ccacactgagagaaacctacggcgagatggccgactgctgtgccaagcaagagcccgagagaaacgagtgc ttctccagcacaaggacgacaaccccaacctgcctagactcgtgcgaccgaagtggatgtgatgtgcaccgc cttcacgacaacgaggaaaccttcctgaagaagtacctgtacgagatcgccagacggcaccctacttttatgcc cctgagctgctgttcttcgccaagcgtataaggccgcttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggctgcctg tctgctgcctaagctggacgagctgagagatgagggcaaagccagctctgccaagcagagactgaaatgcgcc agcctccagaagtgcggcgagagagctttaaggcctgggcccgttgccagactgagccagagatttctaaggcc gagtttgccgaggtgtcaagctcgtgaccgatctgacaagggtgcacaccgagtgtgtcacggcgatctgtg gaatgtgccgacgatagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctg aaagagtgtcgcgagaagcccctgctggaaaagtctcactgtatcgccgaggtggaaaacgacgagatgcctg ccgatctgcctagcctggctgcccatttcgtggaagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgagggccaagga gtgtttctgggcatgtttctgtatgtagtaccgcccagacaccccgactattctgtgttctgtctgctgctggcca aaacctacgagacaaccttgaaaaatgtgcgcgctgcccagatcctcacgagtgttatgccaaggtgttcgac gagttcaagcctctggtggaagaacccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctggcg agtacaagttccagaatgccctgctcgtgcggtacaccaagaaagtgcctcaggtgtccacacctactggttg aggtgtcccgaatctgggcaaagtgggcagcaaggtgtgcaagcaccctgaggccaagagaatgccttgcc cgaggattacctgagcgtggtgtgaatcagctgtgcgtgtgcacgagaaaacctgtgtccgacagagtgac caagtgtgtaccgagagcctcgtgaacagaaggccttgcttagcgccctggaagtggacgagacatacgtgc ccaaagagttcaacgccgagacattcaccttcacgccgacatctgcaccctgtccgagaaagagcggcagat caagaagcagacagccctggtcgagctggttaagcacaagcccgaagccaccaaagaacagctgaaggcc gtgatggacgacttcgccgcttctgcgagaagtgtgtcaaggccgacgacaaagagacatgcttcgccgaaga gggcaagaaactggtggcctgtgtggaacctcggtcatggaaaacggcaatatcgccaatagccagattgcc gccagcagcgtcagagtacattctgggactgcaacactgggtgcccagctggctagactgaatagagccgg catggtcaacgcctggacaccagcagcaacgacgataatccctggattcaagtgaacctgtctgcggcgatgt gggtcacaggtgtgttacacaggcgcaagcagactggccagccacgagtatctgaaggccttaaggtggcct acagcctgaacggccacgagttcactcatccacgacgtgaacaagaagcacaaagagttgtcggaactg gaacaagaacgcctgcacgtgaacctgttcgagacacctgtggaagcccagtcagctgcggctgtacctaca

		agctgtcacaccgctgactctgagattcgaactgctgggatcgagctgaacggctgtgctaactcctctgggct gaagaacaacagcatccccgataagcagatcaccgccagctccagctataagacatggggcctgcacgtgttc agctggaacccttcttacgccagactggacaagcagggcaacttaactgctgggtggcggcagctacggcaa tgatcagtggtgcaagtggacctgggcagcagcaaagaagtgcagggcatcatcacccaaggggccagaa atttcggcagcgtgcagttcgtggccagctacaaagtggcctactccaacgacagcgccaactggaccgagtac aggaccctagaaccggcagctccaagatctccccggcaattgggacaaccacagccacaagaagaatctgtt cgaaaccctatcctggccagatatgtgcgcattctgccgtggcctggcacaacagaattgccctgagactgga actgctcggtgc
50	FP284	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVGRDVFPSYCTCLKGYAGNH CETKGS DAHKSE VAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPR L VRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFT EECQ AADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFP KA EFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC EKLPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EY ARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNL IK QNCELFEQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEA KRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVD EY VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFA AFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGVGGSGSGSGSGSCVEPLGM ENGNIANSQIAASSVRVTF LGLQHWVPELARLN RAGMVNAWTPSSNDN PWIQ VNLLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYS LNGHEFDFIHDVNKKHKEFV GNWNKNAVHVNL FETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLK NNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQ VDLGSSKEVTGIITQARNFGSVQFVASYKVAYS NDSANWTEYQDPRTGSSKIF PGNWDNHN SHKKNLFETPILARYVRILPVAWHNR IALRLELLGC
51	FP284 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaatccttgccacaacggcggtctgtgcaagagatttcaagaagtgcggggcgca cgtttccccagctacacctgtacatgtctgaagggtacgcggcaaccactgcgagacaaaaggatccgatgc tcacaagagcgcaggtggccacagattcaaggatctgggcaagagaactcaaggccctggtgctgatcgct tcgctcagtatctccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagtgcagcagttcgccaag acctgtgtggccgatgagagcgcggagaactgtgataagagcctgcacacctgttcggcgacaagctgtgtac agtggccacactgagagaaacctacggcgagatggccgactgctgtgccaagcaagagcccgagagaaacg agtgttctctgcagcacaaggacgacaacccaacctgcctagactcgtgcgacccgaagtggatgtgatgtgc accgcttctacgacaacgaggaaaccttcctgaagaagtacgttacgagatgccagacggcaccctacttt tatgcccctgagctgctgttcttcgcaagcgggtataaggccgcttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggc tgcctgtctgctgctaagctggacgagctgagagatgaggcacaagcagctctgccaagcagagactgaagt gcgccagcctgcagaagttcggcgagagagctttaaggcctgggctgttcagactgagccagagatttcta aggccgagtttgccgaggtgtccaagctcgtgaccgatcgacaaaggtgcacaccgagtgtgtcacggcgat ctgtggaatgtgccgacgatagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagc aagctgaaagagtgtcgcgagaagccctgctggaagctcactgtatcgccgaggtggaacgacgag atgctgccgatctgcttagcctggctgcccgttcgtggaagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgaggc caaggatgtgttctgggcatgttctgtatgtacgcccgcagacacccgactattctgtgttctgtctgctg ctggccaaaacctacgagacaaccttgaaaaatgtgcgcccgtgcccgatcctcacgagtgttatgccaaggt gttcgacgagttcaagcctctggtggaagaaccccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagc tgggcgagtacaagttccagaatgccctgctcgtgcccgtacaccaagaagtgctcaggtgtccacacctacac tggttgaggtgtcccgaatctgggcaagtgggcagcaagtggtgcaagcacctgaggccaagagaatgcct tgccgaggattacctgagcgtggtgtgaatcagctgtgcgtgtgcacgagaaaacctgtgtccgacaga gtgaccaagtgtgtaccgagagcctcgtgaacagaaggccttgcttagcgcctggaagtggacgagacata cgtgccc aaagagttcaacgccgagacattcaccttcacgccgacatctgtaccctgagcgagaagagcgg cagatcaagaagcagacagccctggtcgagctggttaagcacaagcccaaggccaccaagaacagctgaa ggccgtgatggacgacttcgcccgttctgcgagaagtgtgcaaggccgacgacaaagagacatgtctcggc aagagggcaagaaactggtggtgctcctcaggtgtctcggagtgggagggaaggcggaggtctgcccgttc

		cggaggctctgtgtggaacccctcggcattggaacacggcaatatcgccaatagccagattgccgccagcagc gtcagagtgaacatttctgggactgcagcactgggtgccgagctggctagactgaatagagccggcatggtcaac gcctggacacccagcagcaacgacgataacccttgattcaagtgaacctgtcgccgctatgtgggtcacagg tgtgttacacagggcgctcttagactggccagccagagatctgaaggccttaagggtggcctacagcctgaac ggccacgagttcgacttcatccacgacgtgaacaagaagcacaagagttgtcgccaactggaacaagaacg ccgtgcacgtgaacctgttcgagacacctgtggaagccagtagctgcggctgtacctacaagctgtcacaccg cctgactctgagattcgaactgtggatgcgagctgaacggctgtgtaacctctctggcctgaagaacaaca gcatccccgataagcagatcaccgccagctccagctataagacatggggcctgcacctgttcagctggaacctt cttacgccagactggacaagcagggcaactcaatgtctgggtggccggcagctacggcaatgatcagtggtg caagtggacctgggcagcagcaagaagtgcagggcatcatcaccagggcgccagaatttcggcagcgtg cagttgtggccagctacaaagtggcctactccaacgacagcgccaactggaccgagatcaggaccctagaac cggcagctccaagatctccccggcaattgggacaaccacagccacaagaagaatctgttcgaacccctatcc tgccagatatgtgcgcattctgcccgtggcctggcacaacagaattgcctgagactggaactgctcggtgt
52	FP138	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVGRDVFPSYCTCLKGYAGNHCEITKGSDAHSE VAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLPRL VRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCECCQ AADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFP KAFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EY ARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIK QNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEA KRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVD EY VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFA AFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGSGSGSGSGSGSCVEPLGMEN GNIANSQIAASSVRVTFGLQHWVPELARLN RAGMVNAWTPSSNDNPWIQVNL LRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDIHDVNKKHKEFVGN WNKNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNN SIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVD LGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSND SANWTEYQDPRTGSSKIFPG NWDNHSHKKNLFETPILARYVRILPVAWHNRIALRLELLGC
53	FP138 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaatccttgccacaacggcgccctgtgcaagagatttcaagaagtgcggggcgga cgtttccccagctacacctgtacatgtctgaagggtacgcccgaaccactgcgagacaaaaggatccgatgc tcacaagagcgaggtggccacagattcaaggatctggcggaagagaactcaaggcctggtgctgatcgct tcgctcagatctccagcagagcccttcgaggaccagctgaagctggtcaacgaagtgaccgagttcgccaag acctgtgtggccgatgagagcgccgagaactgtgataagagcctgcacacctgttcggcgacaagctgtgtac agtggccacactgagagaaaactacggcgagatggccgactgctgtgccaagcaagagcccagagagaaacg agtgttctctgcagcacaaggacgacaaccccaacctgctagactcgtgcgaccgaagtggatgtgatgtgc accgccttcacgacaacgaggaaccttctgaagaagtacctgtacgagatcgccagacggcaccctacttt tatgcccctgagctgctgttctcgccaagcgggtataaggccgcttcaccgaatgttgccagggcgtgataaggc tgctgtctgctgctaagctggacgagctgagagatgagggcaaagccagctctgccaagcagagactgaagt gcgccagcctgcagaagttcggcgagagagctttaaggcctggcggttgccagactgagccagagatttcta aggccgagtttgccgaggtgtccaagctcgtgaccgatctgacaaaggtgcacaccgagtgctgtcacggcgat ctgtggaatgtgccgacgatagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagc aagctgaaagagtgtgcgagaagcccctgtggaagagttcactgtatcgccgaggtggaacacgacgag atgctgcccgatctgcctagctggctgcccattctgtggaagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgaggc caaggatgtttctgggcatgtttctgtatgtagtacgcccgcagacaccccactattctgtgttctgtctgctg ctggccaaaacctacgagacaaccttgaaaaatgtgcgcccgtgcccgtcctcacagtggttatgccaaggt gttcgacgagttcaagcctctggtggaagaacccagaaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagc tgggcgagtacaagttcagaatgccctgctgctgctgacccaagaagtgctcaggtgtccacacctacac tggttgaggtgtcccggaatctgggcaagtgggcagcaagtggtgcaagcacctgaggccaagagaatgcct tgcgccgaggattacctgagcgtggtgctgaatcagctgtgctgctgcagagaaaacctgtgtccgacaga

		gtgaccaagtgtgtaccgagagcctctgtaacagaaggccttgccttagcgccctggaagtggacgagacata cgtgcccaaagagttcaacgccgagacattcaccttcacgccgacatctgtaccctgagcgagaaagagcgg cagatcaagaagcagacagccctggctgagctggttaagcacaagcccaagccaccaaaagacagctgaa ggccgtgatggacgacttcgccgctttgtcgagaagtgtgcaaggccgacgacaaaagagacatgcttcgccg aagagggcaagaaactggtggctgcctctcaggctgtctcgaggaagcggaggaatctggcggttcggagg ctctgtgtggaacccctcggcatggaaaacggcaatatcgcaatagccagattgccgccagcagcgtcagag tgacatttctgggactgcagcactgggtgccgagctggctagactgaatagagccggcatgttcaacgcctgga caccagcagcaacgacgataacccttgattcaagtgaacctgtcgcgctatgtgggtcacaggtgtgttac acagggcgcccttagactggccagccagagtatctgaaggccttaagggtggcctacagcctgaacggccacg agttcgacttcatccagcagctgaacaagaagcacaagagtttgcggcaactggaacaagaacgcgctgca cgtgaacctgttcgagacacctgtggaagcccagtagctgctggtgtaccctacaagctgtcacaccgctgcac tctgagattcgaaactgtgggatgagcgtgaacggctgtgtaatcctctgggcctgaagaacaacagcatccc cgataagcagatcaccgccagctccagctataagacatggggcctgcacgtgtcagctggaacccttctacgc cagactggacaagcagggaacttcaatgcttgggtggccgcagctacggcaatgatcagtggtgcaagt gacctgggcagcagcaaagaagtacaggcatcatcaccagggcgccagaaatttcggcagcgtgcagttg tgccagctacaaagtggcctactccaacgacagcgccaactggaccgagtacaggacctagaaccggca gctccaagatctccccggcaattgggacaaccacagccacaagaagaatctgttcgaaaccctatcctggcc agatatgtgcgcattctgccctggcctggcacaacagaattgccctgagactggaactgtcggctgt
54	FP811	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVGRDVFPSYTCTCLKGYAGNH CETKGS DAHKSE VAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRL VRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQ AADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFP KAFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVKNYAEAKDVFLGMFLY EY ARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL IK QNCELFEQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEA KRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRP CFSALEVDETY VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFA AFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GGGGS CVEPLGMENGN IANSQIA ASSVRVTFGLQLHWVPELARLNRAGMVNAWTPSSND DNPWIQVNL LRRMWVT GVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDIHDVNKKHKEFVGNWNKN AVH VNLFETPVEAQYVRLYPT SHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNNSIPDKQIT ASSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEV TGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSND SANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDN HSH KKNLFETPILARYVRILPVAWHNR IALRLELLGC
55	FP811 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaatcctgccacaacggcgccctgtgcaagagatttcaagaagtgcggggcga cgttttcccagctacacctgtacatgtctgaagggtacgccggaaccactgcgagacaaaaggaatccgatgc tcacaagagcgaggtggccacagattcaaggatctgggcgaagagaacttcaaggccctggctgatcgct tcgctcagtatctccagcagagcccttcgaggaccagctgaagctggtcaacgaagtaccgagttcgccaag acctgtgtggccgatgagagcgcgagaaactgtgataagagcctgcacacctgttcggcgacaagctgtgtac agtggccacactgagagaaacctacggcgagatggccgactgctgtgccaagcaagagcccagagagaaacg agtgttctctgcagcacaaggacgacaaccccaacctgcctagactcgtgcgaccggaagtggatgtgtgc accgcctttcacgacaacgaggaaaccttctgaagaagtacgtgtacgagatcgccagacggcaccctacttt tatgcccctgagctgtgttctcgccaagcgggtataaggccgcttcaccgaatgttgccagggcgtgataaggc tgctgtctgtgcctaagctggacgagctgagagatgagggcaaagccagctctgccaagcagagactgaagt gcgccagcctgcagaagttcggcgagagagctttaaaggcctgggccgttgccagactgagccagagatttcta aggccgagttgccgaggtgtccaagctcgtgaccgatctgacaaaggtgcacaccgagtgctgtcacggcgat ctgtggaatgtgccgacgatagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagc aagctgaaagagtgtgcgagaagcccctgtggaagaaagctcactgtatcgccgaggtggaagcagcag atgcctgccgatctgcctagcctggctgcccgttctgtggaagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgagggc caaggatgtgttctgggcagtttctgtatgtagtacctgcgcagacaccccgactattctgtgttctgtctgcgg

		ctggccaaaacctacgagacaacccctggaaaaatgctgcgcccgtgccgatcctcacgagtgttatgccaaaggt gttcgacgagttcaagcctctggtggaagaaccccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagc tgggagagtagaagttccagaatgccctgctcgtgcggtacaccaagaagtgcctcaggtgtccacacacacac tgggtgaggtgtcccggaatctgggcaaagtgggcagcaagtgttcaagcacccctgaggccaagagaatgcct tgcgcccaggattacctgagcgtggtgctgaatcagctgtgcgtgctgcacgagaaaaacccctgttccgacaga gtgaccaagtgtgtaccgagagcctcgtgaacagaaggcctgtcttagcgcctggaagtggacgagacata cgtgccaaaagagttcaacgcccagacattcacctccacgccgacatctgtaccctgagcgagaaagagcgg cagatcaagaagcagacagccctggtcagctggttaagcacaagcccaaggccaccaagaacagctgaa ggccgtgatggacgacttcgcccctttgtcgagaagtgtgcaaggccgacgacaaagagacatgttcgccc aagagggcaagaactggtggtgctcctcaagctgctcgtgagggcggaggatctgtgtggaacccctcggc atgaaaacggcaatatcgccaatagccagattgccgcccagcagcgtcagagtgcatttctgggactgcagca ctgggtgcccgagctggctagactgaatagagccggcatggtcaacgcctggacaccagcagcaacgacga taaccctggattcaagtgaacctgctgcggcgtatgtgggtcacaggtgtgttacacagggcgctctagactgg ccagccacgagtatctgaaggccttaaggtggcctacagcctgaacggccacgagttcgacttcatccacgacg tgaacaagaagcacaaagagttgtcggaactggaacaagaacgcctgacggtgaacctgttcgagacacc tgtggaagcccagtagctgcggctgtaccctacaagctgtcacaccgcctgcactctgagattcgaactgctggga tgcgagctgaacggctgtgttaacctctgggcctgaagaacaacagcatccccgataagcagatcacggccag ctccagctataagacatggggcctgcacctgttcagctggaacccttctacgccagactggacaagcagggcaa ctcaatgctgggtggccggcagctacggcaatgatcagtggtgcaagtggacctgggcagcagcaaaagaa gtgacaggcatcatcacccagggcgccagaaatttcggcagcgtgcagttgtggccagctacaaagtggccta ctcaacgacagcgccaactggaccgagtatcaggaccctagaaccggcagctccaagatcttccccggcaat tgggacaaccacagccacaagaagaatctgttcgaaacccctatctggccagatatgtgcgcattctgcccggtg gcctggcacaacagaattgccctgagactggaactgctcggtgc
56	FP010	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVGRDVFPSYTCTCLKGYAGNHCETKGSDAHKSE VAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPR VRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQ AADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKGERAFKAWAVARLSQRFP KAFAEVSKLVTDLTkvHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPsLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEY ARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIK QNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEA KRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTkcCTESLVNRRPCFSaleVDETY VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFA AFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGGGGSGGGGSCVEPLGMENGNI ANSQIAASSVRVTFGLQLHWPelARLNragMVNAWTPSSNDNPWiqVnLLR RMWVTGVVTQgasRLAShEYLkAFKVAYSLNgHEFDfIHdVNKKHKEfVGNWN KNAVHVNLfETPVEAQYVRLYPTsCHtACTLRFellGcelNGCANPLGLKnnSIP DKQITASSSYKTWGLHLfSWNPSYARldKQGNfNAwAGSYGNDQWLQVDLG SSKEVTGIITQgARNFGSVQfVAsYKVAYsNDSANwTEYQDPRTGSSKIFPGNW DNHSHKKNLfETpILARyVRILPVAWhNRlALrLEllGC
57	FP010 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaatccttgccacaacggcgccctgtgcgaagagatttcaagaagtgcggggcgga cgttttcccagctacacctgtacatgtctgaagggtacgccggcaaccactgcgagacaaaaggatccgatgc tcacaagagcgaggtggccacagattcaaggatctgggcgaagagaactcaaggccctggtgctgatcgct tcgctcagtatctccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagtgaccgagttcgccaag acctgtgtggccgatgagagcgcggagaactgtgataagagcctgcacacctgttcggcgacaagctgtgtac agtggccacactgagagaaaactacggcgagatggccgactgctgtgccaagcaagagcccagagagaaacg agtgttctctgcagcacaaggacgacaacccaacctgcctagactcgtgcgacccgaagtggatgtgatgtgc accgccttcacgacaacgaggaaaccttcctgaagaagtacgtgtacgagatgccagacggcaccctacttt tatgccctgagctgctgttcttcgccaagcggataaggccgcttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggc tgcctgtctgtgcctaagctggacgagctgagagatgagggcaaagccagctctgccaagcagagactgaagt gcgccagcctgcagaagttcggcgagagagctttaaggcctgggcccgttgccagactgagccagagatttcta

		aggccgagtttgcgaggtgtccaagctcgtgaccgatctgacaaaggtgcacaccgagtgctgtcacggcgat ctgctggaatgtgccgacgatagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagc aagctgaaagagtgtgcgagaagcccctgctggaaaagtctcactgtatcgccgaggtggaaaacgacgag atgcttgcgcatctgcctagcctggctgccgatttctgtgaaagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgagggc caaggatgtgtttctgggcatgtttctgtatgagtacgcccgcagacaccccactattctgtgttctgtctgctg ctggccaaaacctacgagacaaccctggaaaaatgctgcgcccgtgccgatcctcacgagtggtatgccaaagt gttcgacgagttcaagcctctggtggaagaaccccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagc tgggagagtagaagttccagaatgccctgctcgtgcggtacaccaagaaagtgcctcaggtgtccacacctacac tggttgaggtgtcccgaatctgggcaaagtgggcagcaagtgtgcaagcacctgaggccaagagaatgcct tgcgcccaggattacctgagcgtggtgtgaatcagctgtgcgtgtgcacgagaaaacccctgtgtccgacaga gtgaccaagtgtgtaccgagagcctcgtgaacagaaggcctgttagcgccttgaagtggacgagacata cgtgcccagaagagttcaacgccgagacattcacctccacgccgacatctgtacctgagcgagaagagcgg cagatcaagaagcagacagccctggtcagctggttaagcacaagcccgaagccaccaagaacagctgaa ggccgtgatggacgacttcgccgcttctgcgagaagtgtgcaaggccgacgacaaagagacatgcttcgccg aagagggcaagaactggtggtgctcctcaagctgtctcggaggcggagggtccggaggcggaggatcttg tgtgaacccctcggcatggaaaacggcaatatcgccaatagccagattgccgccagcagcgtcagagtga tttctgggactgcagcactgggtgccgagctggctagactgaatagagccggcatggtcaacgcctggacacc cagcagcaacgacgataaaccttgattcaagtgaacctgtgcggcgtatgtgggtcacagggtgtgttacacag ggcgcctctagactggccagccacgagtatctgaaggcctttaagggtggcctacagcctgaacggccacgagttc gacttcacccagcagtgaaacaagaagcacaagaagagtttgcggcaactggaacaagaacgccgtgcacgtga acctgttcgagacacctgtggaagccagtagctgcggctgtaccctacaagctgtcacaccgcctgcactctga gattcgaactgtctggatgcgagctgaacggctgtgctaactccttggcctgaagaacaacagcatccccgata agcagatcaccgccagctccagctataagacatggggcctgcacctgtcagctggaacctcttacgccagac tggacaagcagggcaactcaatgcttgggtggccggcagctacggcaatgatcagtggtgcaagtggacctg ggcagcagcaaagaagtgcagggcatcatcaccagggcgccagaaattcggcagcgtgcagttgtggcca gctacaaagtggcctactccaacgacagcgccaactggaccgagtagtaggacctagaaccggcagctcca agatcttccccggcaattgggacaaccacagccacaagaagaatctgttcgaaacccctatcctggccagatatg tgcgcattctgccgctggcctggcacaacagaattgccctgagactggaactgctcggctgc
58	FP816	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVGRDVFPSYCTCLKGYAGNH CETKDAH KSEVA HRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVR PEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCECCQAA DKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKA EFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK P LLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR RHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFEDEFKPLVEEPQNLIKQN CELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKR MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV EKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGLC VEPLGMENGN IANSQIAASSVRV TFLGLQHWVPELARLN RAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLRRMWVTGVVTQG ASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDFIHDVNKKHKEFVGWNWKNVHVNLFETP VEAQYVRLYPT SHTACTLRFELLGCELN GCANPLGLKNNSIPDKQITASSSYKT WGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQG ARNFGSVQFVASYKVAYSND SANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDN HSHKKNLFE TPILARYVRILPVAWHNR IALRLELLGC
59	FP816 Ácido nucleico	ctggacatctgcagcaagaatccttgccacaacggcgccctgtgcgaagagatttcaagaagtgcggggcga cgttttcccagctacacctgtacatgtctgaagggtacgccggcaaccactgcgagacaaggatgccaca agagcgaggtggccacagattcaaggatctggggaagagaactcaaggccctggtgctgatgccttcgt cagtatctccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagtaccgagttcgccaagacctg tgtggccgatgagagcggcgaactgtgataagagcctgcacaccctgttcggcgacaagctgtgtacagtgg ccacactgagagaaacctacggcgagatggccgactgtgtgccaagcaagagcccagagagaacgagtg

		ttctgcagcacaaggacgacaaccccaacctgcctagactcgtgcgacccgaagtggatgtgatgtgcaccgc ctttcacgacaacgaggaaaccttctgaagaagtacgtgtacgagatcgccagacggcaccctacttttatgcc cctgagctgctgttcttcgccaagcgtataaaggccgcttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggctgctg tctgctgcctaagctggacgagctgagagatgagggcaaagccagctctgccaagcagagactgaagtgcgcc agcctgcagaagttcggcgagagagctttaaggcctgggcccgttgccagactgagccagagatttctaaggcc gagtttgcgaggtgtccaagctcgtgaccgatctgacaaaggtgcacaccgagtgctgtcacggcgatctgtg gaatgtgcccagatagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctg aaagagtgctgcgagaagcccctgctgaaaagtctcactgtatcgccgaggtggaaaacgacgagatgcctg ccgatctgcctagcctggctgcccatttctgtgaaagcaaggacgtgtgcaagaactacgcccaggccaaggat gtgttctgggcatgttctgtatgagtacgcccgcagacaccccactatttctgtgttctgtctgctgctggcca aaacctacgagacaaccttgaaaaatgctgcgcgctgcccgatcctcacgagtggttatgccaagggtgttcgac gagttcaagcctctggtggaagaacccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctgggcg agtacaagttccagaatgccctgctcgtgcggtacaccaagaaagtcctcaggtgtccacacctactggttg aggtgtcccgaatctgggcaaagtggtggcagcaagtggtgcaagcaccctgaggccaagagaatgccttgcc cgaggattacctgagcgtggtgtgaatcagctgtgctgtgcacgagaaaacccctgtgtccgacagagtac caagtgtgtaccgagagcctcgtgaacagaaggcctgtttagcgccctggaagtggacgagacatacgtgc caaagagttcaacgccgagacattcaccttcacgccgacatctgtacctgagcgagaagagcggcagat caagaagcagacagccctggtcgagctggttaagcacaagcccgaagccaccaaaagaacagctgaaggcc gtgatggacgacttcgccgcttctgcgagaagtgtgtgaaggccgacgacaaaagagacatgcttcgccgaaga gggcaagaaactggtggctgttctcagggtgccctgggactgtgtgtgaacccctcggcatggaaaacggca atatcgccaatagccagattgccgccagcagcgtcagagtacatttctgggactgcagcactgggtgcccgag ctggctagactgaatagagccgcatgtgtaacgcctggacacccagcagcaacgacgataatccctggatcc aagtgaacctgctgcggcgtatgtgggtcacagggtgtgttacacagggcgcccttagactggccagccacgagt atctgaaggccttaagggtggcctacagcctgaacggccacgagttcgacttcacacgacgtgaacaagaag cacaagagttgtcggcaactggaacaagaacgccgtgcacgtgaacctgttcgagacacctgtggaagccc agtacgtgcggctgtaccctacaagctgtcacaccgctgcactctgagattcgaactgctgggatgcgagctga acggctgtgctaactctcgtggcctgaagaacaacagcatccccgataagcagatcacccgacgtccagctat aagacatggggcctgcacctgttcagctggaaccttcttacgccagactggacaagcaggggaactcaatgct tgggtggccggcagctacggcaatgatcagtggtgcaagtggaacctgggacgagcagaaagaagtacaggc atcatcaccagggcgccagaaatttcggcagcgtgcagtttggccagctacaaagtggcctactccaacgac agcgccaactggaccgagtagcaggatcctagaacggcgagctccaagatctccccggcaattgggacaacc acagccacaagaagaatctgttcgaaacccctatcctggccagatatgtgcggattctgcccggtggcctggcaca acagaattgcctgagactggaactgctcggctgt
62	Ligador (G ₂ S) ₄	GGSGSGSGSGS
63	Ligador (GS) ₄	GSGSGSGS
64	Ligador G ₄ S	GGGGS
65	Ligador (G ₄ S) ₂	GGGSGGGGS
66	EGS His- etiqueta	GSHHHHHH
67	His-etiqueta	HHHHHH
68	MFG-E8 Murino	MQVSRVLAALCGMLLCASGLFAASGDFCDSSLCLNGGTCLTGQDNDIYCLCPEG FTGLVCNETERGPCSPNPCYNDAKCLVTLDTQRGDIFTEYICQCPVGYSGIHCET ETNYYNLDGEYMFTTAVPNTAVPTPAPTPDLSNNLASRCSTQLGMEGGAIADSQ ISASSVYMGFMGLQRWGPPEARLYRTGIVNAWTASNYDSKPWIVQVNLRLKMRV SGVMTQGASRAGRAEYLKTFKVAYS LDGRKFEFIQDES GGDKEFLGNLDNNSLK VNMFNPTLEAQYIKLYPVSCHRGCTLRFELLGCELHGCSEPLGLKNNTIPDSQMS ASSYKTWNLRAFGWYPHLGRLDNQKINAWTAQSNSAKEWLQVDLGTQRQV TGIITQGARDFGHIQYVASYKVAHSDDGVQWTVYEEQGSSKVFQGNLDNNSHK KNIFEKPFMARYVRVLPVSWHNRITRLELLGC
69	FP1776	DICDPNPCENGICLPGLADGSFSCECPDGFDPNCSSVVEVASDEEEPTSAGP CTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQHNINECEVEPCKNG

		GICTDLVANYSCECPGEFMGRNCQYKDAHSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFA QYLQQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL KKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELREDEGK ASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTE CCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYE TTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCSELFQLEGEYKFQNALLV RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSCKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSE KERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEEG KKLVACSGPLGIEGGIISNQITASSTHRALFGLQKWYPYARLNKKGLINAWTAA ENDRWPWIIQINLQRKMRVTGVITQGAKRIGSPEYIKSYKIAYSNDGKTWAMYKVK GTNEDMVFRGNIDNNTPYANSFTPIKAQYVRLYPQVCCRHTLRMELLGCELS GCSEPLGMKSGHIQDYQITASSIFRTLNDMFTWEPRKARLDKQGVNAWTS HNDQSQWLQVDLLVPTKVTGIITQGAKDFGHVQFVGSYKLAYSNDGEHWTYQ DEKQRKDKVFQGNFNDNTHRKNVIDPPIYARHIRILPWSWYGRITLRSSELLGC
70	FP1068	DICDPNPCENGIGICLPLGLADGSFSCECPDGFTDPNCSSVVEVASDEEEPTSAGP CTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQHNINECEVEPCKNG GICTDLVANYSCECPGEFMGRNCQYKDAHSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFA QYLQQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL KKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELREDEGK ASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTE CCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYE TTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCSELFQLEGEYKFQNALLV RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSCKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSE KERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEEG KKLVAAASQAALCSGPLGIEGGIISNQITASSTHRALFGLQKWYPYARLNKKGLI NAWTAAENDRWPWIIQINLQRKMRVTGVITQGAKRIGSPEYIKSYKIAYSNDGKT WAMYKVKGTNEDMVFRGNIDNNTPYANSFTPIKAQYVRLYPQVCCRHTLRM ELLGCELSGCSEPLGMKSGHIQDYQITASSIFRTLNDMFTWEPRKARLDKQGV VNAWTSGHNDQSQWLQVDLLVPTKVTGIITQGAKDFGHVQFVGSYKLAYSNDG EHWTYQDEKQRKDKVFQGNFNDNTHRKNVIDPPIYARHIRILPWSWYGRITLRS ELLGC
71 =133	FP1777	DICDPNPCENGIGICLPLGLADGSFSCECPDGFTDPNCSSVVEVASDEEEPTSAGP CTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQHNINECEVEPCKNG GICTDLVANYSCECPGEFMGRNCQYKDAHSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFA QYLQQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL KKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELREDEGK ASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTE CCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYE TTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCSELFQLEGEYKFQNALLV RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSCKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSE KERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEEG KKLVACSGPLGIEGGIISNQITASSTHRALFGLQKWYPYARLNKKGLINAWTAA ENDRWPWIIQINLQRKMRVTGVITQGAKRIGSPEYIKSYKIAYSNDGKTWAMYKVK

		GTNEDMVFRGNIDNNTPYANSFTPIKAQYVRLYPQVCRRHCTLRMELLGCELS G
72	FP1069	DICDPNPCENGIGICLPGLADGFSCECPDGFTDPNCSSVVEVASDEEEPTSAGP CTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQHNECEVEPCKNG GICTDLVANYSCCEPGEFMRNCQYKDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFA QYLQQSPFEDHVKLVEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL KKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGK ASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTE CCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYE TTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCSELFQGEYKFQNALLV RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSE KERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEEG KKLVAASQAALCSGPLGIEGGIISNQITASSTHRALFGLQKWYPYARLNKKGLI NAWTAAENDRWPIQINLQKMRVTGVITQGAKRIGSPEYIKSYKIAYSNDGKT WAMYKVKGTNEDMVFRGNIDNNTPYANSFTPIKAQYVRLYPQVCRRHCTLRM ELLGCELSG
73 =121	FP261	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVRGDVFPSYTCTCLKGYAGNHCETKDAHKSEVA HRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKLVEVTEFAKTCVADESAENC KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVR PEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAA DKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPA EFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR RHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNC SELFQGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKR MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV EKCKKADDKETCFEEGKKLVACVEPLGMENGNANSQIAASSVRVTFGLQHW VPELARLN RAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLRRMWVTGVVTQGASRLASHE YLKAFKVAYS LNGHEFDFIHDVNKKHKEFVGNWNKNVHVNL FETPVEAQYVRL YPTSCHTACTLRFELLGCELNG
74 =119	FP262	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVRGDVFPSYTCTCLKGYAGNHCETKDAHKSEVA HRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKLVEVTEFAKTCVADESAENC KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVR PEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAA DKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPA EFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR RHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNC SELFQGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKR MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV EKCKKADDKETCFEEGKKLVAASQAALCVEPLGMENGNANSQIAASSVRVTFGL QHWVPELARLN RAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLRRMWVTGVVTQGASR LASHEYLKAFKVAYS LNGHEFDFIHDVNKKHKEFVGNWNKNVHVNL FETPVEA QYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNG

75	MFG-E8 de longitud completa [L76M]	MPRPRLAALCGALLCAPSLLVALDICKNPCHNGGLCEEISQEVRGDVFPSTYCTCLKGYAGNHCETKCVEPLGMENGNIANSQIAASSVRVTFLGLQHWVPELARLN RAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVA YSLNGHEFDIFIHDVNKKHKEFVGNWNKNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTA CTRFELLGCELNGCANPLGLKNNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLD KQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAY SNDSANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHSHKKNLFETPILARYVRILPVAWHNR IALRLELLGC
76	Dominio de unión a PS MFG-E8 con [L76M]	CVEPLGMENGNIANSQIAASSVRVTFLGLQHWVPELARLN RAGMVNAWTPSSN DDNPWIQVNLLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYS LINGHEFDIFIHDVN KKHKEFVGNWNKNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGC ANPLGLKNNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSY GNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYS NDSANWTEYQDP RTGSSKIFPGNWDNHSHKKNLFETPILARYVRILPVAWHNR IALRLELLGC
77	Dominio de unión a EGF EDIL-3 (Dominios similares a EGF 1-2-3)	DICDPNPCENGIGICLPLGLADGSFSCECPDGFTDPNCSSVVEVASDEEEPTSAGP CTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQH NINECEVEPCKNG GICTDLVANYSCECPGEFMGRNCQYK
96	Dominio de unión a EGF EDIL-3 (Dominio similar a EGF 1)	DICDPNPCENGIGICLPLGLADGSFSCECPDGFTDPNCSSVVEVASDEEEPT
97	Dominio de unión a EGF EDIL-3 (Dominio similar a EGF 2)	SAGPCTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQH
98	Dominio de unión a EGF EDIL-3 (Dominio similar a EGF 3)	NINECEVEPCKNGGICTDLVANYSCECPGEFMGRNCQYK
99	Dominio de unión a EGF EDIL-3 (Dominios similares a EGF 1 y 2)	DICDPNPCENGIGICLPLGLADGSFSCECPDGFTDPNCSSVVEVASDEEEPTSAGP CTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQH
100	Dominio de unión a EGF EDIL-3 (Dominio similar a EGF 2 y 3)	SAGPCTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQH NINECEVEP CKNGGICTDLVANYSCECPGEFMGRNCQYK
101	Dominio de unión a EGF EDIL-3 (Dominio similar a EGF 1 y 3)	DICDPNPCENGIGICLPLGLADGSFSCECPDGFTDPNCSSVVEVASDEEEPTNINE CEVEPCKNGGICTDLVANYSCECPGEFMGRNCQYK

78	Dominio de unión a PS EDIL-3	CSGPLGIEGGIISNQITASSTHRALFGLQKWYPYARLNKKGLINAWTAAENDR WPWIIQINLQRKMRVTGVITQGAKRIGSPEYIKSYKIAYSNDGKTWAMYKVKGNE DMVFRGNIDNNTPYANSFTPIKAQYVRLYPQVCRRHCTLRMELLGCELSGCSE PLGMKSGHIQDYQITASSIFRTLNMDFMFTWEPRKARLDKQGVNAWTS GHNDQ SQWLQVDLLVPTKVTGIITQGAKDFGHVQFVGSYKLAYSNDGEHWTVYQDEKQ RKDKVFQGNFDNDTHRKNVIDPPIYARHIRILPWSWYGRITLRSELLGCTEEE
79	Dominio de unión a PS EDIL-3 TEEE truncado	CSGPLGIEGGIISNQITASSTHRALFGLQKWYPYARLNKKGLINAWTAAENDR WPWIIQINLQRKMRVTGVITQGAKRIGSPEYIKSYKIAYSNDGKTWAMYKVKGNE DMVFRGNIDNNTPYANSFTPIKAQYVRLYPQVCRRHCTLRMELLGCELSGCSE PLGMKSGHIQDYQITASSIFRTLNMDFMFTWEPRKARLDKQGVNAWTS GHNDQ SQWLQVDLLVPTKVTGIITQGAKDFGHVQFVGSYKLAYSNDGEHWTVYQDEKQ RKDKVFQGNFDNDTHRKNVIDPPIYARHIRILPWSWYGRITLRSELLGC
80	Dominio similar a EGF 1-2-3 [EDIL3]_HSA[A626-L633]eliminado_C1_C2[MFG-E8] Non-M 3163	DICDPNPCENGIGICLPLADGSGFSCPCPDGFTDPNCSSVVEVASDEEEPTSDAGP CTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQHNECEVEPCKNG GICTDLVANYSCPCGPEFMGRNCQYKDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFA QYLQQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL KKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGK ASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTE CCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYE TTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLV RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL HEKTPVSDRVTCKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSE KERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEEG KKLVACVEPLGMENGNANSQIAASSVRVTFLGLQHWVPELARLNAGMVNAWT PSSNDDNPWIIQVNLRLRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYS LNHGHEFDI HDVNKKHKEFVGNWNKNVAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCE LNGCANPLGLKNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVA GSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSND SANWTEY QDPRTGSSKIFPGNWDNHSKKNLFETPI LARYVRILPVAWHNRILRLLELLGC
102	Dominio similar a EGF 1[EDIL3]_HSA[A626-L633]eliminado_C1_C2[MFG-E8]	DICDPNPCENGIGICLPLADGSGFSCPCPDGFTDPNCSSVVEVASDEEEPTDAHK SEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESA ENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT CCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLS QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKL KECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGM FLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP QNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCC KHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTCKCTESLVNRRPCFSALE VDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVM DDFAAFVEKCKKADDKETCFEEGKKLVACVEPLGMENGNANSQIAASSVRVT FLGLQHWVPELARLNAGMVNAWTPSSNDDNPWIIQVNLRLRMWVTGVVTQGA SRLASHEYLKAFKVAYS LNHGHEFDIHDVNKKHKEFVGNWNKNVAVHVNLFETPV EAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNSIPDKQITASSSYKTW GLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGAR NFGSVQFVASYKVAYSND SANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHSKKNLFETPI LARYVRILPVAWHNRILRLLELLGC
103	Dominio similar a EGF 2[EDIL3]_HSA[A626-L633]eliminado_C1_C2[MFG-E8]	SAGPCTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQHDAHKSEVAH RFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLRLVRP EVDVMCTAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCCQAAD KAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAE FAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK LLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYAR

	C1_C2[MFG-E8]	RHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQN CELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKR MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV EKCKADDKETCFAEEGKKLVACVEPLGMENGNIANSQIAASSVRVTFGLQHW VPELARLNLRAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLRRMWVTGVVTQGASRLASHE YLKAFKVAYSLNGHEFDFIHDVNKKHKEFVGNWNKNNAVHVNLFETPVEAQYVRL YPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSW NPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQF VASYKVAYSNDSANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHSHKKNLFETPILARYVRIL PVAWHNRIALRLELLGC
104	Dominio similar a EGF 3[EDIL3]_HSA[A626-L633]eliminado_ C1_C2[MFG-E8]	NINECEVEPCKNGGICTDLVANYSCCEPGEFMGRNCQYKDAHKSEVAHRFKDL GEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTL FGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKKDDNP NLPR LVRPEVDV MCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAC LLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEV SKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEK SHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPD YSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCA EDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFN AETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKC CKADDKETCFAEEGKKLVACVEPLGMENGNIANSQIAASSVRVTFGLQHWVPE LARLNLRAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLK AFKVAYSLNGHEFDFIHDVNKKHKEFVGNWNKNNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPT SCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPS YARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVAS YKVAYSND SANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHSHKKNLFETPILARYVRILPVA WHNRIALRLELLGC
105	Dominio similar a EGF 1-2[EDIL3]_HSA[A626-L633]eliminado_ C1_C2[MFG-E8]	DICDPNPCENGIGICLPLGADGSFSCECPDGTDPNCSSVVEVASDEEEPT SAGP CTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQHDAHKSEVAHRFKD LGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKKDDNP NLPR LVRPEVD VMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAA CLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAE VSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLE KSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHP DYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCA AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEK CKADDKETCFAEEGKKLVACVEPLGMENGNIANSQIAASSVRVTFGLQHWVPE ELARLNLRAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYL KAFKVAYSLNGHEFDFIHDVNKKHKEFVGNWNKNNAVHVNLFETPVEAQYVRLYP TSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNP SYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVA SYKVAYSND SANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHSHKKNLFETPILARYVRILPV AWHNRIALRLELLGC
106	Dominio similar a EGF 2-3[EDIL3]_HSA[A626-L633]eliminado_	SAGPCTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQH NINECEVEP CKNGGICTDLVANYSCCEPGEFMGRNCQYKDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALV LIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVA TLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKKDDNP NLPR LVRPEVDVMCTAFHDNE ETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL R EGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KV HTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDE MPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLLLRLA

	C1_C2[MFG-E8]	KTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQN ALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQ LCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADIC TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFA EEGKKLVACVEPLGMENGNIANSQIAASSVRVTFGLQHWVPELARLNRAGMVN AWTPSSNDDNPWIQVNLLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSLSNGHE FDFIHDVNKKHKEFVGNWNKNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFEL LGCELNGCANPLGLKNNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFN AWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSNSDSAN WTEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHSKKNLFETPILARYVRILPVAWHNRIALRLEL LGC
107	Dominio similar a EGF 1-3[EDIL3]_HSA[A626-L633]eliminado_C1_C2[MFG-E8]	DICDPNPCENGGICLPLGLADGSFSCECPDGFDPNCSSVVEVASDEEEPTNINE CEVEPCKNGGICTDLVANYSCCEPGEFMRNCQYKDAHKSEVAHRFKDLGEEN FKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLNVNEVEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDK LCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTA FHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKL DELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVT DLTKVHTECCHGDLLCADDRADLAKYICENQDSISSLKECKECKPLLEKSHCIAE VENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEY KFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSV VLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH ADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKE TCFAEEGKKLVACVEPLGMENGNIANSQIAASSVRVTFGLQHWVPELARLNR GMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYS LSNGHEFDIHDVNKKHKEFVGNWNKNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTL RFELLGCELNGCANPLGLKNNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQ GNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYS NSDSANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHSKKNLFETPILARYVRILPVAWHNRIAL RLELLGC
81	Ácido nucleico de SEQ ID NO: 80	gacatctgcgaccccaatccttgcgagaatggcggcattgtctgcctggactggccgatggcagcttctctgtga atgccccgatggcttcacagaccccaattgcagctctgtggtggaagtggccagcgacgaggaagaacctaca agcgctggccctgcacaccaatccatgtcataatggcggaacctgcgagatcagcgaggcctacagaggcg atacctcatcggtacgtgtgcaagtggccagaggctcaatggcatccactgccagcacaacatcaacgagt gcgaggtggaacctgaagaacggcgccatctgtaccgacctggtggccaattactctgcgagtgccctggc gagttcatgggcagaaactgccagtacaaggacgcccacaagagcgaggtggccacagattcaaggacctg ggcgaagagaactcaaggccctggtgctgatcgctcgtcagtatctccagcagagcccttcgaggaccac gtgaagctggtcaacgaagtaccgagttcgccaagacctgtgtggccgatgagagcgccgagaaactgtgaca agagcctgcacacactgttcggcgacaagctgtgtaccgtggccacactgagagaaacctacggcgagatggc cgactgctgtgccaagcaagagcccgagagaaacgagtgtctcctccagcacaaggatgacaaccccaacct gcctagactcgtgcggcctgaagtggatgtgatgtgcaccgcttcacgacaacgaggaaacctcctgaagaa gtacctgtacgagatcgccagacggcaccctactttatgcccctgagctgtgttcttcgccaagcggtataagg ccgccttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggctgctgtctgcctaagctggacgagctgagagatg agggcaaagccagctctgccaagcagagactgaaatgcgccagcctccagaagttcgcgagagagcttttaa ggcctgggcccgttgccagactgagccagagatttctaaggcgagtttgccgaggtgtccaagctcgtgaccga tctgacaaaggtgcacaccgagtgctgtcacggcgatctgctggaatgtgcccagcatagagccgacctggcca agtatatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaagagtgctgcgagaagcccctgctgga agtctcactgtatcgccgaagtggaaaacgacgagatgcccgccgatctgccttctggtgctgcgattctgtgga aagcaaggatgtgtgcaagaactacgccgaggccaaagatgtgtttctggcatgtttctgtatgtagtaccgccc agacaccccgactattctgtggttctgctgctgcggctggccaagacatacagagacaaccttgaaaaatgctgc gccgctgccgatcctcacgagtggtatgccaaggtgttcgacgagttcaagccactggtggaagaacccagaa cctgatcaagcagaactcgagctgttcgagcagctggcgagtagaagttccagaatgccctgctcgtgcggta caccaagaaagtgcctcaggtgtccacacctacactggtgaggtgtcccgaatctgggcaaagtgggcagca agtgttgaagcaccctgaggccaagagaatgccttgcgcgaggattacctgagcgtggtgtaacagctgt gcgtgctgcagagaaaacctgtgtccgacagagtaccaagtgctgacctgagagcctcgtgaacagaag gccttgcttagcgccctggaagtggacgagacatacgtgcccaaagagttcaacgccgagacattcacctcca

		cgccgatatctgcaccctgtccgagaaagagcgccgagatcaagaagcagacagccctggctgagctggtaag cacaagcccaaggccaccaagaacagctgaaggccgtgatggacgacttcgccgctttgtcgagaagtgt gcaaggccgacgacaaagagacatgttcgccgaagagggcaagaaactgggtggcctgtgtggaacccctcg gcatggaaaacggcaatatcgccaatagccagattgccggcagcagcgtcagagtacatttctgggactgcaa cactgggtgccgagctggctagactgaatagacggcatgtgtcaacgcctggacaccagcagcaacgac gataaccctggattcaagtgaacctgtgtcgggcgtatgtgggtcacaggtgtgttacacagggcgcaagcaga ctggcctctcacgagtacctaaggccttaaggtggcctacagcctgaacggccacgagttcgacttcatccacg acgtgaacaagaagcacaagaagttgtcggaactggaacaagaacgccgtgcacgtgaacctgttcgaga cacctgtggaagcccagctacgtgcgggtgtaccctacaagctgtcacaccgccctgcactctgagattcgaactgt gggatgcgagctgaacggctgtgctaactctgtggcctgaagaacaacagcatccccgataagcagatcacc gccagctccagctataagacatggggcctgcacctgttcagctggaaccttcttacgccagactggacaagcag ggcaacttcaatgcttgggtggccggcagctacggcaatgatcagtggtgcaagtggatctgggcagcagcaa agaagtgcagggcatcatcaccgaagggccagaaatttcggcagcgtgcagttcgtggccagctacaaagt gcctactccaacgacagcgccaactggaccgagtatcaggaccctagaaccggcagctccaagatctccccg gcaattgggacaaccacagccacaagaagaatctcttcgagactcccatcctggccagatatgtcggttctgc ctgtggcctggcacaacagaatcgccctgagactggaactgctcggtgt
108	Ácido nucleico de SEQ ID NO: 102	gacatctgcgaccccaacccctgcgagaacggcgacatctgcctgcccggcctggccgacggcagcttcagct gcgagtgcggcgacggcttcaccgaccccaactgcagcagcgtggtggaggtggccagcgacgaggaggag cccaccgacgcccacaagagcgcgaggtggccaccgggtcaaggacctgggcgaggagaacttcaaggccct ggtgtgatcgcccttcgccagctacgtgcagcagagccccttcgaggaccagtgaaagctggtgaacgaggtga ccgagttcgcaagacctgcgtggccgacgagagcggagaactgcgacaagagcctgcacacctgttctg gagacaagctgtgcacctggccaccctgcgggagacctacggcgagatggccgactgtgcgccaagcagg agccccgagcggaacgagtgcttctgcagcacaaggacgacaacccccacctgccccggctggtgcggccccg aggtggacgtgatgtgcaccgccttcacgacaacgaggagaccttctgaagaagtacgttacgagatgcc cggcgccacccctacttctacgccccgagctgtgttcttcgccaagcgggtacaaggccgcttcaccgagtgct gccaggcccgacgaaggccgctgctgtgccaagctggacgagctgcgggacgagggcaaggccag cagcgccaagcagcggctgaagtgcgccagcctgcagaagttcggcgagcgggcttcaaggcctgggcccgt ggccccgctgagccagcgggttcccaaggccgagttcgccgaggtgagcaagctggtgaccgacctgaccaa ggtgcacaccgagtgctgccacggcgacctgtgagtgccgacgacgggcccagctggccaagtacat ctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaggagtgctgcgagaagcccctgtggagaagagcc actgcatcgccgaggtggagaacgacgagatgcccgccagctgccagcctggccgcccagcttctgtggaga gcaaggacgtgtcaagaactacgccgaggccaaggacgtgttctgtggcatgttctgtacgagtacgcccgg cggcaccgactacagcgtggtgtgctgtgctgcgggtggccaagacctacgagaccacctggagaagtgt gcgcccggccgacccccacgagtgctacgccaaggtgttcgacgagttcaagcccctggtggaggagcccca gaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctgggagagtaagttccagaacgccctgtggtgtc ggtacaccaagaaggtgccccaggtgagcaccaccacctggtggagggtgagccggaacctgggcaagggtg ggcagcaagtgtgcaagcaccggcaggccaagcggatgccctgcgcccaggactacctgagcgtggtgtc aaccagctgtgctgtgcacgagaagacccccgtgagcgaccgggtgaccaagtgtgcaccgagagcctg gtgaaccggcgccctgttcagcgccctggaggtggacgagacctagctgccaaggagttcaacgccgaga ccttcaccttcacgcccagatctgcacctgagcgagaaggagcggcagatcaagaagcagaccgcccgtgt ggagctggtgaagcacaagcccaaggccaccaaggagcagctgaaggcctgatggacgacttcgccgctt cgtggagaagtgtcgaaggccgacgacaaggagacctgttcgagagagggaagaagctggtggcct gcgtggagcccctgggcatggagaacggcaacatcgccaacagccagatcgccgcccagcagcgtgcccgtg accttctgggctgacgactgggtgcccagctggccgggtgaaccgggcccagctggtgaacgcctgga ccccagcagcaacgacgacaacccctggatccaggtgaacctgtgcggcgatgtgggtgaccggcgtggt gaccagggcgccagccgctggccagccagctacgtgaaggccctcaagggtggcctacagcctgaacgg ccacgagttcgacttaccacgacgtgaacaagaagcacaaggagttcgtgggcaactggaacaagaacgc cgtgcacgtgaacctgttcgagacccccgtggaggccagctacgtgcggctgtacccaccagctgccacaccg cctgcacctgctgggttcgagctgtgggtgcgagctgaacggctgcgccaacccccctgggctgaagaacaa cagcatccccgacaagcagatcaccggcagcagcagctacaagacctggggcctgcacctgttcagctggaa ccccagctacgcccggctggacaagcagggaacttcaacgcctgggtggccggcagctacggcaacgacc agtggctgcaggtggacctgggagcagcaaggaggtgaccggcatcatcaccagggcgccggaaacttcg gcagcgtgcagttcgtggcagctacaaggtggcctacagcaacgacagcgccaactggaccgagtagcagg acccccggaccggcagcagcaagatctccccggcaactgggacaaccacagccacaagaagaacctgttc

		gagacccccatcctggcccggtacgtgcggatcctgcccggtggcctggcacaaccggatcgccctcggtgga gctgctgggctgc
109	Ácido nucleico de SEQ ID NO: 103	agcgccggcccctgcaccccaaccctgccacaacggcgccacctgcgagatcagcgaggcctaccgggg cgacaccttcacgtgctacgtgtgaagtgcggcggttcaacggcatccactgccagcacgagcccaca agagcgaggtggccaccggttcaaggacctggcgaggagaactcaaggccctggtgctgatcgcttcgc ccagtacctgcagcagagccccttcgaggaccacgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgccaagacc tgctggccgacgagagcgccgagaactgcgacaagagcctgcacaccctgttcggcgacaagctgtgcacc gtggccaccctgcgggagacctacggcgagatggccgactgctgcgccaagcaggagcccgagcggaacga gtgcttctgcagcacaaggacgacaaccccaaccctgccccggctggtgcggcccgaggtggacgtgatgtgc accgccttcacgacaacgaggagaccttctgaagaagtacctgtacgagatcgccggcgccgacccctactt ctacgccccgagctgctgttcttcgccaagcggtacaaggccgcttcaccgagtgctgccaggccgcccaca aggccgctgctgctgccaaagctggacgagctgcgggacgagggcaaggccagcagcgccaagcagcg gctgaagtgcgcccagcctgcagaagttcgccgagcgggcctcaaggcctggccggtggcccggtgagccag cggttcccaaggccgagttcgccgaggtgagcaagctggtgaccgacctgaccaaggtgcacaccgagtgct gccacggcgacctgctggagtgcgcccagcaccggcgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggac agcatcagcagcaagctgaaggagtgtgcgagaagcccctgctggagaagagccactgcatcgccgaggtg gagaacgacgagatgccgcccagctgccagcctggccgcccacttctgtagagcaaggacgtgtgcaag aactacgcccagggccaaggacgtgttctgggcatgttctgtacgagtagcggcgccgaccccagctacag cgtggtgctgctgctgcggctggccaagacctacgagaccacctggagaagtgtgcgcccggccgacccc cacgagtgctacgccaaggtgttcgacgagttcaagccctggtggaggagcccgagaacctgatcaagcaga actgcgagctgttcgagcagctggcgagtagacaagttccagaacgccctgctggtgcggtacaccaagaaggtg ccccaggtgagcaccaccctggtggaggtgagccggaacctgggcaaggtgggcagcaagtgctgcaa gcaccccagggccaagcggtgcctgcgcccaggaactacgtgagcgtggtgctgaaccagctgtgctgctg cacgagaagaccccctgtagcgaccgggtgaccaagtgtgcaccgagagcctggtgaaccggcgccctg cttcagcgccctggaggtggacgagacctacgtgccaaaggagttcaacgccgagaccttcacctccacgccg acatctgcaccctgagcgagaaggagcgccagatcaagaagcagaccgcccctggtggagctggtgaagcac aagcccaaggccaccaaggagcagctgaaggccgtgatggacgacttcgccccttcgtggagaagtgtctgc aaggccgacgacaaggagacctgttcgcccagggagggcaagaagctggtggcctgctggtgagccccctggg catggagaacggcaacatcgccaacagccagatcgccgcccagcagcgtgcgggtgaccttctgggctgca gcactgggtgcccagctggcccggtgaaccggggccgcatggtgaacgctggacccccagcagcaacg acgacaacccctggatccaggtgaacctgtcgcggcgatgtgggtgaccggcggtggtgaccagggcgcca gcccgtggtggcagccagtagctgaaggcctcaaggtggcctacagcctgaacggccacgagttcgacttc atccacgacgtgaacaagaagcacaaggagttcgtgggcaactggaacaagcgcgtgcacgtgaacctg ttcagacccccctggaggcccagtagctgcggcgtgtacccccaccagctgccacaccgctgcacctgcggtt cgagctgctgggctgcgagctgaacggctgcgccaacccccctgggctgaagaacaacagatccccgacaa gcagatcacggccagcagcagctacaagacctggggcctgcacctgttcagctggaaccccagctacgcccgg ctggacaagcaggggcaacttcaacgcctgggtggccgagctacggcaacgaccagtggtgcaggtggac ctgggcagcagcaaggaggtgaccggcatcatcaccagggcgcccggaacttcggcagcgtgcagttcgtg gccagctacaaggtggcctacagcaacgacagcgccaactggaccgagtagcaggacccccggaccggca gcagcaagatcttccccggcaactgggacaaccacagccacaagaagaacctgttcgagacccccatcctgg cccggtacgtgcggatcctgccgctggcctggcacaaccggatcgccctgcggctggagctgctgggctgc
110	Ácido nucleico de SEQ ID NO: 104	aacatcaacgagtgcgaggtggagccctgcaagaacggcggtcatctgcaccgacctggtggccaactacagc tgcgagtgccccggcgagttcatggccggaactgccagtacaaggacgcccacaagagcgaggtggccac cggttcaaggacctggcgaggagaacttcaaggccctggtgctgatcgcttcgccagtagctgcagcagag ccccttcgaggaccacgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgccaagacctgcgtggccgacgagag cgccgagaactgcgacaagagcctgcacaccctgttcggcgacaagctgtgcaccgtggccaccctgcggga gacctacggcgagatggccgactgctgcgccaagcaggagcccagcggaacgagtgcttctgcagcaca ggacgacaaccccaacctgccccggctggtgcggccgaggtggacgtgatgtgcaccgcttcacgacaac gaggagaccttctgaagaagtacctgtacgagatcgccggcgccacccctacttctacgccccgagctgct gttcttcgccaagcgggtacaaggccgcttcaccgagtgctgccaggccgcccagaaggccgctgctgctgc ccaagctggacgagctgcgggacgagggcaaggccagcagcgaagcagcggtgaagtgcgccagcct gcagaagttcggcgagcgggcttcaaggcctgggcccgtggccggctgagccagcggttccccaaaggccga gttcgcccaggtgagcaagctggtgaccgacctgaccaaggtgcacaccgagtgctgccagggcgacctgctg gagtgccgacgaccgggcccagctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagct gaaggagtgctgcgagaagcccctgctggagaagagccactgcatcgccgaggtggagaacgacgagatgc

		ccgccgacctgcccagcctggccgcccacttcgtggagagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgaggcca aggacgtgttctgggcatgttctgtacgagtagcggcgccgacccccgactacagcgtggtgtgtgtgtg gctggccaagacctacgagaccacctggagaagtgtgtgcccggccgacccccacgagtgtctacgcaa ggtgttcgacgagttcaagcccctggtggaggagccccagaacctgatcaagcagaactgagcgtgttcgagc agctggcgagtagacaagttccagaacgcccctgtggtgcggtacaccaagaaggtgtccccaggtagcacc caccctggtggaggtagccggaacctgggcaagggtggcgagcaaggtgtgcaagcaccgccgaggccaagc ggatgcccctgcgcccagagactacgtgagcgtggtgtgaaccagctgtgctgtgtgcacgagaagacccccgtg agcgaccgggtgaccaagtgtgcaccgagagcctggtgaaccggcgccctgtctcagcgccttgagggtg acgagacctacgtgcccaggagttcaacgcccagacacctcacctccacgcccagacatctgcaccctgagcgag aaggagcggcagatcaagaagcagaccgcccctggtggagctggtgaagcacaagcccaaggccaccaagg agcagctgaaggccgtgatggacgacttcgccccttcgtggagaagtgtgcaaggccgacgacaaggaga cctgcttcgcccaggagggaagaagctggtgctgtggtgagccctgggcatggagaacgggaacatcg ccaacagccagatcgccgacgagcgtgcgggtgaccttctgggctgcagcactgggtgccgagctggc ccggctgaaccgggcccggcatggtgaacgctggacccccagcagcaacgacgacaacccctggatccagg tgaacctgtgcggcggtatgggtgaccggcgtggtgaccaggcgccagccggctggccagccacgagt acctgaaggcctcaagggtggcctacagcctgaacggccacgagttcagcttccacgagctgaacaagaa gcacaaggagttcgtgggaactggaacaagaacgcccgtgcacgtgaacctgttcgagacccccgtggaggc ccagtacgtgcggctgtacccaccagctgcccacccgctgcaccctgcggttcgagctgtgggtgcgagct gaacggctgcgccaacccccctgggctgaagaacaacagcatccccgacaagcagatcacccgacgagca gctacaagacctggggcctgcacctgttcagctggaacccccagctacgcccggctgggacaagcagggaact caacgcccgtgggtggccggcagctacgggaacgagctggtgagtggtggcagcagcaaggaggg tgaccggcatcatcacccaggcgcccggaaacttcggcagcgtgcagttcgtggccagctacaagggtggcctac agcaacgacagcgccaactggaccgagtagcaggacccccggaccggcagcagcaagatctccccggca actgggacaaccacagccacaagaagaacctgttcgagacccccatcctggcccggtacgtgcggatcctgcc cgtggcctggcacaaccggatgcacctgcggctggagctgctgggctgc
111	Ácido nucleico de SEQ ID NO: 105	gacatctgcgaccccaacccctgcgagaacggcgcatctgcctgcccggcctggccgacggcagctcagct gcgagtccccgacggcttcaccgaccccaactgcagcagcgtggtggagggtggccagcagcagggagg cccaccagcgccggcccctgcaccccaacccctgccacaacggcgccacctgcgagatcagcgaggccta ccggggcgacaccttcacgtgtacgtgtgaagtccccggggctcaacggcatccactgccagcagcag cccacaagagcgagggtggcccaccgggtcaaggacctggcgaggagaactcaaggccctggtgtgatcg ccttcgcccagtagctgcagcagagccccttcgaggaccacgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgcc aagacctgcgtggccgacgagagcgccgagaactgcgacaagagcctgcacacctgttcggcgacaagctg tgaccgtggccaccctgcgggagacctacggcgagatggccgactgtgcgcccaagcaggagccagcg gaacgagtgcttctgcagcacaaggagcacaaccccaacctgcccggcgtggtgcggccgaggtggacgt gatgtgcaccgccttcacgacaacgaggagaccttctgaagaagtacgtgtacgagatcgcccggcgccac ccctacttctacgccccgagctgtgttcttcgcaagcgggtacaaggccgcttcaccgagtgctgccaggccg ccgacaaggccgctgctgtgcccgaagtggacgagctgcgggacgagggcaaggccagcagcgccaa gcagcggctgaagtgcgccagcctgcagaagttcggcgagcgggctcaaggcctgggctggccgggctg agccagcgggtcccaaggccgagttcggcgaggtgagcaagctggtgaccgacctgaccaaggtgcacacc gagtgctgccacggcgacctgtggtgagtgccgacgaccgggcccagctggccaagtacatctgcgagaac caggacagcatcagcagcaagctgaaggagtgctgcgagaagcccctgctggagaagagccactgcacgc cgaggtggagaacgacgagatcccggcgacctgcccagcctggccggcggacttcgtggagagcaaggacgt gtgcaagaactacgcccaggccaaggacgtgttctgggcatgttctgtacgagtagcggcgccgacccccg actacagcgtggtgtgtgtgtgcggctggccaagacctacgagaccacctggagaagtgtgcgcccggc cgacccccacgagtgctacgccaagggtgttcgacgagttcaagcccctggtggaggagccccagaacctgatc aagcagaactgcgagctgttcgagcagctgggagtagacaagttccagaacgcccctgctggtgcggtacacca agaagggtccccaggtgagcaccacccctggtggagggtgagccggaacctggggaagggtgggagcaag tgctgaagcaccggaggccaagcggtgacctgcgcccaggactacctgagcgtggtgtgaaccagctgt gcgtgtgcacgagaagacccccgtgagcgaccgggtgaccaagtgtgcaccgagagcctggtgaaccggc ggccctgcttcagcgcctggagggtgacgagacctacgtgccaaggagttcaacggcagaccttcaccttc cacggcgacatctgcacctgagcgagaaggagcgcgagatcaagaagcagaccgcccgtggtggagctggt gaagcacaagcccaaggccaccaaggagcagctgaaggccgtgatggacgacttcggcgcttcgtggaga agtgtgcaaggccgacgacaaggagacctgttcgcccaggaggggcaagaagctggtggcctgcgtggagc ccctgggcatggagaacggcaacatcgccaacagccagatcgccggcagcagcgtgcgggtgaccttctgg gcctgcagcactgggtgccgagctggccggctgaaccgggcccggcatggtgaacgctggacccccagca

		gcaacgacgacaacccctggatccaggtgaacctgctgcgccggatgtgggtgaccggcggtggtgaccagggcgccagccaggtgaggtacgtgaaggcctcaaggtggcctacagcctgaacggccacaggtcgacttcatccacgacgtgaacaagaagcacaaggagttcgtgggaactggaacaagaacgccgtgcacgtgaacctgttcgagaccccggtggaggccagtagctgctggtgtacccaccagctgccacaccgctgcaccctgctggttcgagctgctgggtgctgagctgaacggctgctgccaacccctgggctgaagaacaacagcatcccgacaagcagatcaccggcagcagcagctacaagacctggggcctgacctgttcagctggaacccagctacgcccggctggacaagcagggcaactcaacgcctgggtggccggcagctacggcaacgaccagtggtgcagggtggacctgggcagcagcaaggaggtgaccggcatcatcaccaggggcgccggaacttcggcagcgtgcagttcgtggccagctacaaggtggcctacagcaacgacagcgccaactggaccgagtagcagggaccccgaccggcagcagcaagatctccccggcaactgggacaaccacagccacaagaagaacctgttcgagaccccatcctggcccggtacgtgcggtacgtgcccgtggcctggcacaaccggatcgccctgcggtggagctgctgggctgc
112	Ácido nucleico de SEQ ID NO: 106	agcgccggccctgcacccccaacccctgccacaacggcgccacactgcgagatcagcgaggcctaccggggcgacaccttcatcggtacgtgtgcaagtgcggcggttcaacggcatccactgccagcacaacatcaacgagtgcgaggtggagccctgcaagaacggcgcatctgcaccgacctggtggcaactacagctgcgagtgcccgcgagttcatgggcccgaactgccagtaacggagcggcacaagagcgaggtggccaccgggtcaaggacctggcgaggagaactcaaggccctggtgtgatcgcttcgcccagtagctgcagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgccaagacctgctggccgacgagagcgccgagaa ctgcgacaagagcctgcacaccctgttcggcgacaagctgtgcaccgtggccaccctgcgggagacctacggcgagatggccgactgctgcgccaagcaggagcccgagcggaacgagtgcttctgcagcacaaggacgacaa ccccaacctgccccggctggtgcggcccgaggtggacgtgatgtgcaccgcttcacgacaacgaggagacc ttctgaagaagtacctgtacgagatcgccggcgccacccctacttctacgccccgagctgctgttctcgccaa gcggtacaaggccgcttcaccgagtgctgccaggccgccaagggccgctgctgctgcccagctggac gagctgcgggacgagggcaaggccagcagcgccaagcagcggtgaagtgcgccagcctgcagaagttcg gcgagcgggcctcaaggcctgggcccgtggcccggtgagccagcggttccccaaaggccgagttcgccgaggt gagcaagctggtgaccgacctgaccaaggtgcacaccgagtgctgccacggcgacctgctggagtgccgga cgaccgggcccagctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaggagtgct gcgagaagcccctgctggagaagagccactgcatcgccgaggtggagaacgacgagatgcccggcagctg cccagcctggccgagcttctgtggagagcaaggacgtgtgaagaactacgcccagggccaaggacgtgttc tgggcatgttctgtacgagtagcggcgccgaccccgactacagcgtggtgctgctgctgctgctggccaaga cctacgagaccaccctggagaagtgtgctgcggcgccgaccccccagagtgctacgccaaggtgttcgacga gttcaagcccctggtggaggagcccagaacctgatcaagcagaactgcagcagctgttcgagcagctggcgag tacaagttccagaacgcctgctggtgctggtacaccaagaaggtgccccaggtgagcacccccacctggtg aggtgagccggaacctgggcaagggtgggagcaagtgctgaagcaccggagggccaagcggtgcccgtgc gccgaggactacctgagcgtggtgctgaaccagctgtgctgctgcacgagaagaccccgtagcgaccgg gtgaccaagtgtgcaccgagagcctggtgaaccggcgccctgcttcagcgccctggaggtggacgagacct acgtgccccaaaggagttcaacgcccagaccttaccacgcccagacatctgcaccctgagcgagaaggagcg gcagatcaagaagcagaccgcccgtggtgagctggtgaagcacaagcccaaggccaccaaggagcagctg aaggccgtgatggacgacttcgccccttcgtggagaagtgtgcaaggccgacgacaaggagacctgttcg ccgaggagggcaagaagctggtggcctgctggtgagccctgggcatggagaacggcaacatcgccaacagc cagatcgccgcccagcagctgcccgtgaccttctgggctgcagcactgggtgcccagctggccggctga accgggcccgcagtggtgaacgcctggacccccagcagcaacgacgacaacccctggtaccaggtgaacctg ctgcccggatgtgggtgaccggcgtggtgaccaggggcgccagccggctggccagccacgagtagctgaag gcctcaaggtggcctacagcctgaacggccacgagttcgacttaccacgacgtgaacaagaagcacaagg agttcgtgggcaactggaacaagaacgcctgacagtgaaacctgttcgagaccccggtggaggccagtagct gcggctgtacccaccagctgccacaccgctgacccctcggttcgagctgctgggtgctgagctgaacggct gcgccaacccctgggctgaagaacaacagcatccccgacaagcagatcaccggcagcagcagctacaag acctggggcctgcacctgttcagctggaacccagctacgcccggctggacaagcagggcaactcaacgcct ggggtggccggcagctacggcaacgaccagtggtgaggtggacctgggagcagcaaggaggtgaccggc atcatcaccaggggcccggaaacttcggcagcgtgcagttcgtggccagctacaaggtggcctacagcaacg acagcgccaactggaccgagtagcagggaccccgacggcgagcagcaagatctccccggcaactgggac aaccacagccacaagaagaacctgttcgagacccccatcctgcccgggtacgtgcggtacgtgcccgtggcctg gcacaaccggatcgccctcggtggtgagctgctgggctgc

113	Ácido nucleico de SEQ ID NO: 107	gacatctgcgaccccaacccctgcgagaacggcgcatctgcctgccggcctggccgacggcagcttcagct gcgagtgccccgacggcttcaccgaccccaactgcagcagcgtggtggaggtggccagcgacgaggaggag cccaccaacatcaacgagtgcgaggtggagccctgcaagaacggcgccatctgcaccgacctggtggccaac tacagctgcgagtgccccggcgagttcatgggccggaactgccagtacaaggacgccacaagagcgaggtg gcccaccggttcaaggacctgggagaggagaacttcaaggccctggtgctgacgcttcgccagttacgtgca gcagagccccctcgaggaccacgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgccaagacctgctggtggcca cgagagcgccgagaactgcgacaagagcctgcacaccctgttcggcgacaagctgtgcaccgtggccaccct gcgggagacctacggcgagatggccgactgctgcgccaagcaggagcccagcggaacgagtgcttctgc agcacaaggacgacaaccccaacctgccccggctggtgcggcccgaggtggacgtgatgtgcaccgccttc acgacaacgaggagaccttctgaagaagtacctgtacgagatcgccccggcgccaccctacttctacgcccc gagctgctgttctcgccaagcgggtacaaggccgcttcaccgagtgctgccaggccgcccagacaaggccgctg cctgctgccaagctggacgagctgcgggacgagggcaaggccagcagcgccaagcagcggtgaagtgc gccagcctgcagaagttcggcgagcgggccttcaaggcctgggcccgtgagccagcggttcccca aggccgagttcggcaggtgagcaagctggtgaccgacctgaccaaggtgcacaccgagtgctgccacggcg acctgctgagtgccgacgacccggcgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagca gcaagctgaaggagtgctgcgagaagcccctgctggagaagagccactgcatcgccgaggtggagaacgac gagatgcccgccgacctgcccagcctggccgagcttctgagagcaaggacgtgtgcaagaactacgcc gaggccaaggacgtgttctggcatgttctgtacgagtagcggcgccgacccccgactacagcgtggtgctg ctgtgcggctggccaagacctacgagaccacctggagaagtgtgcgcccggccgacccccacagtgct acgccaaggtgttcgacgagttcaagccctggtggaggaagcccgacatgacgaactgcagaaactgcagct gttcgagcagctggcgagtagacaagttccagaacgcccctgctggtgcggtacaccaagaagtgccccaggtg agcacccccaccctggtggaggtgagccggaacctgggcaaggtggcgagcaagtgtgcaagcaccgga ggccaagcggatgcctgcgccgaggactacctgagcgtggtgctgaaccagctgtgctgtgcacgagaag acccccgtgagcgaccgggtgaccaagtgtgcaccgagagcctggtgaaccggcgccctgcttcagcgccc tgaggtggacgagacctacgtgcccaaggagttcaacgcccagaccttcacctccacgcccagatctgcacc ctgagcgagaaggagcggcagatcaagaagcagaccgcccgtggtgagctggtgaagcacaagcccaagg ccaccaaggagcagctgaaggccgtgatggacgacttcgccccttcgtggagaagtgtgcaaggccgacg acaaggagacctgttcgccgaggagggaagaagctggtggcctgctgagccctgggcatggagaacg gcaacatcgccaacagccagatcgccgcccagcagcgtgcgggtgaccttctggcctgcagcactgggtgcc cgagctggcccggtgaaccgggcccggcatggtgaacgctggacccccagcagcaacgacgacaacccct ggatccaggtgaacctgctgcggcggtatgtgggtgaccggtggtgaccaggggcgccagccggctggcca gccacgagtacctgaaggccttcaaggtggcctacagcctgaacggccacgagttcacttcacacgacgtg aacaagaagcacaaggagttcgtgggcaactggaacaagaacgccgtgcacgtgaacctgttcgagaccccc gtggaggcccagctgcggctgtacccaccagctgccacaccgctgcaccctgcgggttcgagctgtctggg ctgcgagctgaacggctgcgccaacccctgggctgaagaacaacagcatccccgacaagcagatcacccg cagcagcagctacaagacctggggcctgcacctgttcagctggaacccagctacgcccggctggacaagca gggcaacttaacgcctgggtggccggcagctacggcaacgaccagtggtgcaggtggacctgggacgag caaggaggtgaccggcatcatcaccagggcgcccggaacttcggcagcgtgcagttcgtggccagctacaag gtggcctacagcaacgacagcgccaactggaccgagtagcaggacccccggaccggcagcagcaagatctt ccccggcaactgggacaaccacagccacaagaagaacctgttcgagacccccatctggccggtagctgcg gatcctgcccggtggcctggcacaaccggatgcctgcggctggagctgctgggtgc
82	EGF[MFG-E8]_HSA[A626-L633]eliminado_C1_C2[EDIL3]	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVGRDVFPSTCTCLKGYAGNH CETKDAH KSEVA HRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCD KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLPRLVR PEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT EECQAA DKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKA EFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK P LLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR RHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV FDEFKPLVEEPQNLIKQN CELF EQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKR MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV EKCKADDKETCF AEEGKKLVACSGPLGIEGGIISNQ QITASSTHRALFGLQKWY PYYARLNKKGLINAWTA AENDRWPWIQINLQRKMRVTGVITQGAKRIGSPEYIKS YKIAYSNDGKTWAMYKVKG TNE DMVFRGNIDNNTPYANSFT PPIKAQYVRLYPQ

		VCRRHCTLRMELLGCELSGCSEPLGMKSGHIQDYQITASSIFRTLNMDFMFTWEP RKARLDKQGVNAWTSQHNDQSQWLQVDLLVPTKVTGIITQGAKDFGHVQFVG SYKLAYSNDGEHWTYQDEKQRKDKVFQGNFDNDTHRKNVIDPPIYARHIRILP WSWYGRITLRSELLGC
83	Ácido nucleico de SEQ ID NO: 82	ctggacatctgtagcaagaacccctgccacaacggcgccctgtgcaagagatttctaagaagtgcggggcgga cgttttcccagctacacctgtacatgtctgaagggctacgcccgaaccactgagagacaaaggatgccaca agagcgaggtggccacagattcaaggatctggcggaagagaactcaaggccctggtgctgacgccttcgct cagtatctccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagtaccgagttcgccaagacctg tgtggccgatgagagcgccgagaactgtgataagagcctgcacaccctgttcggcgacaagctgtgtacagtgg ccacactgagagaaaactacggcgagatggccgactgctgtgccaagcaagagcccagagagaaacgagtgc ttcctccagcacaaggacgacaaccccaacctgacctgacgtgcgaccggaagtgtgtatgtgcaccgc ctttcacgacaacgaggaaaccttctgaagaagtacgtgtacgagatcgccagacggcaccctacttttatgcc cctgagctgctgttctcgcaagcggataaggccgcttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggctgctg tctgtgcctaagctggacgagctgagagatgagggcaaaaggcagctctgccaagcagagactgaaatgcgcc agcctccagaagtgcggcgagagagctttaaggcctgggcccgttgccagactgagccagagatttctaaggcc gagttgcccaggtgtccaagctcgtgaccgatctgacaagggtgcacaccgagtgctgtcacggcgatctgctg gaatgtgccgacgatagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctg aaagagtgtcgagaagccctgctggaaaagtctcactgtatcgccgaggtggaaaacgacgagatgcctg ccgatctgcctagcctggctgctgattcgtggaaagcaaggacgtgtgcaagaactacgcccagggccaagat gtgttctgggcatgtttctgtatgtagtaccgcccagacaccccgactattctgtgtctgctgctgcccgtggcca aaactacgagacaacccctggaaaatgctgcgcccgtgcagatcctcacgagtgttatgccaaggtgttcgac gagttcaagcctctggtggaagaacccagaaactgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctgggcg agtacaagttccagaatgccctgctcgtgcgggtacaccaagaagtgcctcaggtgtccacacctacactggtg aggtgtcccgaatctgggcaaaagtggcgacgaagtgtgcaagcaccctgaggccaagagaatgccttgcgc cgaggattacctgagcgtggtgtgaatcagctgtgctgctgcacgagaaaacccctgttccgacagagtgc caagtgtgtaccgagagcctcgtgaacagaaggcctgtttagcgccctggaagtggacgagacatactgtc caaagagttcaacgcccagacattcaccttcacgcccagacatctgcaccctgtccgagaagagcggcgagat caagaagcagacagccctggtcagctggttaagcacaagcccaaggccaccaaaagaacagctgaaggcc gtgatggacgacttcgccccttctcgagaagtgtgcaaggccgacgacaagagacatgcttcgccaaga gggcaagaaactggtggcctgttctggccctctggcatcgaaggcgcatcatcagcaatcagcagatcaccg ccagcagacccacagagcactgtttggcctgcaaaagtgtatccctactacgcccgtgtaacaagaaggg cctgattaacgcctggacagcggcggagaatgacagatggcctggattcagatcaacctccagcggaagatg agagtgcggcggttatcacacagggcgcaaagagaatcggtcccctgagtacatcaagagctacaagatcg cctacagcaacgacggcaagacctgggcatgtacaaagtgaaggggaccaacgaggacatggtgttccggg gcaacatcgacaacaacaccccttacgccaacagcttcacccctcctatcaaggcccagtacgtgcggctgtac cctcaagtgtgcagaaggcactgtacctgagaatggaactgtgggctgcgaactgtctggtgttctgagccac tggaatgaagtccggccacatccaggactaccagattaccgctccagcatcttcagaacctgaacatggata tgttacctgggagccccggaaggccagactggataagcagggaaaagtgaatgctggaccagcggccaca acgaccagtctcaatggctgcaagtggacctgctggtgcctacaaagtgaaccggaatcatcaccgaaggcgt aaggatttcggccacgtgcagttcgtggctcctacaagctggcctactccaatgatggcgagcactggaccgtg accaggacgagaagcagcgggaaggataaggtgttcagggaacttcgataacgatacccaccggaagaac gtgatcgaccctcaatctacgcccagacacatcagaatcctgccttggtctgtgacggcagaatcacctgagat ccgagctgctgggatgc
115	EGF-C1-His6	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVGRDVFPSYTCTCLKGYAGNHCEKTCVEPLGME NGNIANSQIAASSVRVTFLGLQHWPELARLNRAGMVNAWTPSSNDDNPWVIQV NLLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDIHDVNKKHKEFVG NWNKNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGHHHHHH
116	Ácido nucleico de 115	ctggacatctgtagcaagaacccctgccacaacggcgccctgtgcaagagatttctaagaagtgcggggcgga cgttttcccagctacacctgtacatgtctgaagggctacgcccgaaccactgagagacaaaatgtgtggaacc cctcgccatggaacacggcaatctgcctaagccagatcgccgacgagcgtcagagtgacatttctggga ctgcaacactgggtgcccagagctggccagactgaatagagccggcatggttaacgcctggacaccagcagc aacgacgacaacccctggattcaagtgaacctgctgcggcgtatgtgggtcacaggtgtttacacagggcgca agcagactggccagccagagatctgaaggccttaagggtggcctacagcctgaacggccacgagttcgactt catccacgacgtgaacaagaagcacaagaagtgcgtcggaactggaacaagaacgcctgcacgtgaacct gttcgagacacctgtggaagcccagctacgtgcggctgtaccctacaagctgtcacaccgctgcacactgagatt cgagctgctgggctgtgaactgaatggccaccaccaccatcaccac

117 =147	EGF-HSA-C1 C1	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVGRDVFPSTCTCLKGYAGNHCETKGSDAHSE VAHRFKDLGEENFKALVLIQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRL VRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQ AADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRF KAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEY ARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIK QNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEA KRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDY VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFA AFVEKCKKADDKETCFEEGKKLVAASQAALGLGGSGGSGGSGGSCVEPLGM ENGNIANSQIAASSVRVTFGLQHWVPELARLNAGMVNAWTPSSNDDNPWIQ VNLLRRMWVTGVVTQASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDFIHDVNKKHKEFV GNWNKNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNG
118	Ácido nucleico de 117	ctggacatctgtagcaagaacccctgccacaacggcgccctgtgcgaagagatttcaagaagtgcggggcga cgttttcccagctacacctgtacatgtctgaagggctacgccgcaaccactgcgagacaaaaggatctgatgc ccacaagagcgaggtggccacagattcaaggatctggcggaagagaactcaaggccctggtgctgatcgcc ttcgctcagtatctccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagtgcgagatctgccaag acctgtgtggccgatgagagcgcgagaactgtgataagagcctgcacacactgttcggcgacagatgtgatc agtggccacactgagagaaacctacggcgagatggcgactgtgtgccaagcaagagcccgagagaaacg agtgtctcctccagcacaagggacgacaaccccaacctgcctagactcgtgcgacccgaagtggatgtgatgtgc accgccttcacgacaacgaggaaaccttcctgaagaagtacgtgtacgagatgccagacggcaccctacttt tatgcccctgagctgtgttctcgccaagcgggtataaggccgcttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggc tgctgtctgctgctaagctggacgagctgagagatgagggcaaagccagctctgccaagcagagactgaaat gcgccagcctccagaagtcggcgagagagctttaaggcctgggctgtgccaagcagagactgaaat aggccgagtttgcgaggtgtccaagctcgtgaccgatctgacaaaggtgcacaccgagtgctgtcacggcgat ctgtggaatgtgcgacgatagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagc aagctgaaagagtgctgcgagaagccctgctggaagagctcactgtatcgccgaggtggaagacgacgag atgcctgccgatctgcctagcctggctgcgatttcgtggaagcaaggacgtgtgcaagaactacgcccaggc caaggatgtttctggcagtttctgtatgtagtaccgcccagacaccccgactattctgtgttctgtctgtcg ctggccaaaacctacgagacaaccttgaaaaatgtgcgcccgtgcgacatctcacgagtgatgtgccaaggt gttcgacgagttcaagcctctggtggaagaaccccgagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagc tgggcgagtagaagttccagaatgccctgctcgtgcggtacaccaagaagtgccctcaggtgtccacacctacac tggttgaggtgtcccggaatctgggcaaagtgggcagcaagtggtgcaagcacctgaggccaagagaatgcct tgccgagagattacctgagcgtgtgtgaatcagctgtgcgtgtgcacgagaaaacctgtgtccgacaga gtgaccaagtgtgtaccgagagcctcgtgaacagaaggcctttagcgccctggaagtggacgagacata cgtgcccagaagagttcaacgcccagacattcacctccacgcccagacatctgcacccgttccgagaaagagcgg cagatcaagaagcagacagccctggctgagctggttaagcacaagcccgaagccaccaaagaacagctgaa ggcgtgatggacgacttcgcccgttctgcgagaagtgtgcaaggccgacgacaaagagacatgcttcgccc aagagggcaagaactggtggtgctcctcaggtgctcctcgactggtggaagcggaggaagtgtggtgatct ggcggatctgtgtgaacccctcggcatggaagacggcaatatcgccaatagccagattgcccgcagcagcgt cagagtgacatttctgggactgcaacactgggtgcccagctggctagactgaatagagccggcatgtgtcaacg cctggacaccagcagcaacgacgataatccctggattcaagtgaacctgctgcgagctgtgtggtcacaggt gtgttacacagggcgcaagcagactggccagccagctgtatctgaaggcctttaagggtggcctacagcctgaa cggccacgagttcgacttcacacgacgtgaacaagaagcacaagaagttgtgcggaactggaacaagaac gccgtgcacgtgaacctgttcgagacacctgtggaagccagctacgtgcggtgtacacctacaagctgtcacacc gcctgcactctgagattcgaactgctgggatgcgagctgaacggc
119 =74	EGF-HSA-C1	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVGRDVFPSTCTCLKGYAGNHCETKDAHSEVA HRFKDLGEENFKALVLIQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVR PEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAA DKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPA EFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR RHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQN

		CELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKR MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV EKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALCVEPLGMENGNANSQIAASSVRVTF GLQHWVPELARLNRAGMVNAWTPSSNDDNPWQVNLRLRMWVTGVVTQGASR LASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDIHDVNKKHKEFVGNWNKNAVHVNLFETPVEA QYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNG
120	Ácido nucleico de 119	ctggacatctgtagcaagaacctgtgccacaacggcgccctgtgcaagagatttcaagaagtgcggggcga cgttttcccagctacacctgtacatgtctgaagggctacgcccgaaccactgagagacaaggatgccaca agagcgaggtggccacagattcaaggatctggcggaagagaactcaaggccctggtgctgacgccttcgct cagtatctccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagtgaccgagttcgccaagacgtg tgtggccgatgagagcgccgagaactgtgataagagcctgcacacctgttcggcgacaagctgtgtacagtgg ccacctgagagaaacctacggcgagatggccgactgctgtgccaagcaagagcccagagagaaacgagtgc ttctccagcacaaggacgacaaccccaacctgctagactcgtgcgaccgaagtggatgtgatgtgcaccgc cttcacgacaacgaggaaaccttctgaagaagtacgtgacgagatcgccagacggcaccctactttatgcc cctgagctgctgttcttcgcaagcggataaggccgcttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggctgctg tctgctgctaagctggacgagctgagagatgagggcaagccagctcgtccaagcagagactgaaatgcgc agcctccagaagttcggcgagagagctttaaggcctgggcccgttgccagactgagccagagatttctaaggcc gagtttgcgaggtgtcaagctcgtgaccgatctgacaagggtgcacaccgagtgctgtcacggcgatctgctg gaatgtgcccagcagatagagccgacctggcgaagtacatcgtcgagaaccaggacagcatcagcagaagctg aaagagtgtcgagagaagcccctgctggaaggtctcactgtatcgccgaggtggaacacgacgagatggcctg ccgatctgcctagcctggctgcccatttctggaagcaaggacgtgtgcaagaactacgcccagggccaagga gtgtttctggcatgtttctgtatgtagtgcgcccagacacccgactattctgtggttctgctgctgcccgtggcca aaacctacgagacaaccttgaaaaatgtgcgcccgtgcccgtcctcacgagtgttatgccaaggtgttcgac gagttcaagcctctggtggaagaacccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctgggcg agtacaagttccagaatgccctgctgctgctggttacccaagaaagtgctcaggtgtccacacctacactggtg aggtgtcccgaatctgggcaagtggtggcagcaagtggtgcaagcaccctgaggccaagagaatgccttgccg cgaggattacctgagcgtggtgctgaatcagctgtgctgctgcacgagaaaacctgtgtccgacagagtgac caagtgtgtaccgagagcctcgtgaacagaaggccttcttagcgcctggaagtgacgagacatactgtc ccaaagagttcaacgccgagacattcacctccacgccgacatctgcacctgtccgagaagagcggcagat caagaagcagacagccctggtcagctggttaagcacaagcccaagccaccaaaagacagctgaaggcc gtgatggacgactcgcgccttctgagagaagtgctgaaggccgacgacaagagacatgcttcgcccgaaga gggcaagaactggtggtgctctcaggccgctctgtgtgtggaacccctcgcatggaaacggcaatatcgc caatagccagattgccgcccagcagcgtcagagtgacatttctgggactgcaacactgggtgcccagctggcta gactgaatagagccggcatggtcaacgcctggacaccagcagcaaccgacgataatccctggattcaagtgaa cctgctgcggcgatgtgggtcacaggtgtgttacacagggcgcaagcagactggccagccagctatctgaa ggcctttaaggtggcctacagcctgaacggccacgagttcactcatccacgacgtgaacaagaagcacaaa gagtttgcggcaactggaacaagaacggcgtgcacgtgaacctgttcgagacacctgtggaagcccagtagt gcccgtgtaccctacaagctgtcacaccgctgcactctgagattcgaactgctgggatgcgagctgaacggc
121 =73	FP135	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVRGDVFPSTCTCLKGYAGNHCEKDAHKSEVA HRFKDLGEENFKALVLIQYLLQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPPLRLVR PEVDVMCTAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCECCQAA DKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKQKQFGERAFKAWAVARLSQRFPA EFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECEK PILLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR RHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFEDEFKPLVEEPQNLKQK CELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKR MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV EKCKADDKETCFAEEGKKLVACVEPLGMENGNANSQIAASSVRVTFGLQHW VPELARLNRAGMVNAWTPSSNDDNPWQVNLRLRMWVTGVVTQGASRLASHE YLKAFKVAYSLNGHEFDIHDVNKKHKEFVGNWNKNAVHVNLFETPVEAQYVRL YPTSCHTACTLRFELLGCELNG

122	Ácido nucleico de 121	ctggacatctgtagcaagaacccttggcacaacggcgccctgtgcaagagatttcaagaagtgcggggcgacggtttccccagctacacctgtacatgtctgaagggtacgcccgaaccactgagagacaaaggatgccacaagagcgaggtggccacagattcaaggatctggcggaagagaactcaaggccctggtgctgacgcttcgctcagtatctccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagtgaccgaggtcgccaagacctgtgtggccgatgagagcgcgagaactgtgataagagcctgcacaccctgttcggcgacaagctgtgtacagtggccacactgagagaaacctacggcgagatggcgcactgctgtgccaagcaagagcccgagagaaacgagtgcttctccagcacaaggacgacaaccccaacctgctagactcgtgcgaccggaagtggatgtgatgtgcaccgcctttcacgacaacgaggaacaccttctgaagaagtacgtgtacgagatcgccagacggcaccacctactttatgccctgagctgctgttcttcgccaagcgggtataaggccgaccttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggctgcctgtctgtgcctaagctggacgagctgagagatgagggcaaaagccagctctgccaagcagagactgaaatgcgccagcctccagaagtgcggcgagagagcttttaaggcctgggcccgttgccagactgagccagagatttctaaggccgagtttgcggaggtgtcaagctcgtgaccgatctgacaaagggtgcacaccgagtgctgtcacggcgatctgctggaatgtgccgacgatagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaagagtgtcgcgagaagccctgctggaaaagtctcactgtatcgccgaggtggaaaacgacgagatgctgcccgatctgcctagcctggctgcccatttctgtggaagcaaggacgtgtgcaagaactacgcccagggccaaggatgtgttctggcatgtttctgtatgtagtgcggcgagacaccccgactattctgtgttctgtgctgctgcccgtggcca aaacctacgagacaaccttgaaaaatgtgcgcgctgcccgatcctcacgagtgattatgccaaggtgttgcagagttcaagcctctggtggaagaacccagaaacctgataagcagaactgcgagctgttcgagcagctgggagagtaacaagttccagaatgccctgctcgtgcgggtacaccaagaagtgccctcaggtgtccacacctactggttaggtgtcccgaatctgggcaaaagtgggcagcaagtggtgcaagcaccctgagggcagaagaatgcctgtgcgcgaggattacctgagcgtgggtgctgaatcagctgtgctgctgcacgagaaaaacccctgtgtccgacagagtgac caagtgtgtaccgagagcctcgtgaacagaaggcctgtcttagcgccttggaagtgagcagacatactgtccaaagagttcaacgcccagacattcaccttcacgcccagacatctgcaccctgtccgagaaagagcggcgagat caagaagcagacagccctggctgagctggttaagcacaagcccaaggccaccaaaagaacagctgaaggccgtgatggacgacttcgccccttctgcgagaagtgtgcaaggccgacgacaaagagacatgcttcgcccgaagaggcaagaactggtggcctgtgtggaacccctcgcatggaaaacggcaatatcgccaatagccagattgcc gccagcagcgtcagagtgacatttctgggactgcaacactgggtgcccagctggctagactgaatagagccggcatgtgtaacgcctggacacccagcagcaacgacgataatccctggattcaagtgaacctgtcgcggcgtatgt gggtcacaggtgtgttacacagggcgcaagcagactggccagccacgagatctgaaggccttaagggtggcct acagcctgaacggccacgagttcacttcacacgacgtgaacaagaagcacaagaaggttctcggaactg gaacaagaacccgtgcacgtgaacctgttcgagacacctgtggaagccagtagctgcggctgtacctaca agctgtcacaccgctgcactctgagattcgaactgctgggatgcgagctgaacggc
123	hlgG1_FC_DAP A_Ojal	DKTHTCPPELPGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL AAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
124	Ácido nucleico de 123	gataagacccacacctgtctccatgtctgtccagaactgctcgccgacacctccgttttctgtttccacctaag cctaaggacacctgatgatcagcagaacctgaagtgaacctgtgtggtggtggccgtgtctcacgaagatccc gaagtgaagttcaattgtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctagagaggaacag tacaacagcacctacagagtggtgtccgtgtgaccgtgtgcaccaggattggctgaacggcgaagagtagaa gtgcaagggtgtccaacaaggccctggccgctctatcgagaaaaccatctctaaggccaaggccagcctcgg gaacctcaagtctgtacactgcctcctagccgggacgagctgacaaaaaatcaggtgtccctgagctgcgcgtg aagggttttaccctccgatatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgagaaactacaagaccac acctcctgtgtgacagcagcggtcattcttctggtgtccaagctgacagtggacaagagcagatggcagca gggcaacgtgttcagctgttctgtgatgcagaggccctgcacaaccactacaccagaagtctgtctctgagc cccggcaaaa
125	EGF_hlgG1_FC _DAPA_Botón_ C1	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVGRGDVFPSTCTCLKGYAGNHCECTKGSCKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGGSGGSGGSGGSCVEPLGMENGNANSQIAASSVRVTFLGLQHWVP ELARLNRAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLRLRMWVTGVVTQGASRLASHEYL KAFKVAYSLNGHEFDIFIHDVNKKHKEFVGNWNKNVHVNLFTETPVEAQYVRLYP TSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNP

		SYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVA SYKVAYSNDSANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHSKKLNFETPILARYVRILPV AWHNRIALRLELLGC
126	Ácido nucleico de 125	ctggacatctgtagcaagaaccttgccacaacggcgccctgtgcgaagagatttcaagaagtgcggggcga cgttttcccagctacacctgtacatgtctgaagggtacgcccgaaccactgcgagacaaagggcagcgata agacccacacctgtctccatgtcctgtccagaactgtcggcgaccctccgttttctgtttccacctaagccta aggacacctgatgatcagcagaaccttgaaagtacgtgtgtggtggtggcgtgtctcacgaagatcccgaa gtgaagtcaattggtacgtggacggcggtgaagtgcacaacgccaagaccaagcctagagaggaacagtac aacagcacctacagagtgggtgtccgtgtgaccgtgtgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagt caagggttccaacaaggccctggccgtcctatcgagaaaaccatctctaaggccaagggccagcctcgggaa cctcagggttacacctgtcctcatgcccgggaagagatgaccaagaatcagggtgcctctgtggtgcctggtcaag ggcttctacccttccgatatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgagaacaactacaagaccacacc tctgtgtgacagcgacggctcatttctgtacagcaagctgacagtggacaagagcagatggcagcagg gcaacgtgttcagctgttctgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtctctgtctctgagccct ggcaaaggcggaagcgggtggaagcggaggtatctggcggtatctgtgtggaacccctcggcatggaaaacggc aataatcgccaatagccagatcgccgacgagcgtcagagtacatttctgggactgcaacactgggtgccaga gctggccagactgaatagagccgcatggttaacgcttgacaccagcagcaacgacgacaacccctggatt caagtgaacctgtcgtcggtatgtgggtcacagggtgtgttacacagggcgcaagcagactggccagccacga gtatctgaaggccttaagggtggcctacagcctgaacggccacgagttcgacttcatccacgacgtgaacaagaa gcacaaagagtctgtcgcaactggaacaagaacgcccgtgcacgtgaacctgttcgagacacctgtggaagcc cagtacgtgcggctgtaccctacaagctgtcacaccgctgcacactgagattcgagctgtgtgggtgcgagctg aatggctgtgctaactcctgtggcctgaagaacaatagcatcccgacaagcagatcaccgctccagcagctat aagacatggggcctgcacctgttttagctggaacctagctacgccagactggacaagcagggaaacttcaatgc ctgggtggccggcagctacggcaatgatcaatggtgcaagtggacctgggcagcagcaagaagtaccgg catcattaccaggcgctagaaatttcggcagcgtgcagttcgtggccagctacaagtggcctactccaacga cagcgcaactggaccgagtatcaggacctagaaccggcagctccaagatctccccggcaattgggacaac cacagccacaagaagaatctgttcgaaacctatcctggccagatatgtgcgcatctgcccggtggcctggcac aacagaattgccctgagactggaactgtgggatgc
127	hlgG1_FC_DAP A_Botón	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL AAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
128	Ácido nucleico de 127	gataagaccacacctgtcctcatgtcctgtccagaactgtcggcgaccctccgttttctgtttccacctaag cctaaggacacctgatgatcagcagaaccttgaaagtacgtgtgtggtggcgtgtctcacgaagatccc gaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctagagaggaacag tacaacagcacctacagagtgtgtccgtgtgaccgtgtgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaa gtgcaaggtgtccaacaaggccctggccgtcctatcgagaaaaccatctctaaggccaagggccagcctcgg gaacctcaggtttacacctgcctcatgcccgggaagagatgaccaagaatcagggtgtccctgtgtgctggtc aagggcttacccttccgatatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgagaacaactacaagacca cacctcctgtgtggacagcgacggctcatttctctgtacagcaagctgacagtggacaagagcagatggcag cagggcaacgtgttcagctgttctgtgatgcagaggccctgcacaaccactacaccagaagtctgtctctga gccccggcaaa
129	EGF_hlgG1_FC_DAPA_Ojal_C 1	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVGRDVFPSTCTCLKGYAGNHCETKGS DKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSSFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSL SLSPGKGGSGGSGGSGGSCVEPLGMENGNIA NSQIAASSVRVTFGLQHWVPE LARLN RAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLK AFKVAYSLNGHEFDFIHDVNKKHKEFVGWNWNKNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPT SCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPS YARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVAS YKVAYSND SANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHSKKLNFETPILARYVRILPVA WHNRIALRLELLGC

130	Ácido nucleico de 129	ctggacatctgtagcaagaacccttgccacaacggcgccctgtgcaagagatttcaagaagtgcggggcgacggtttccagctacacctgtacatgtctgaagggtacgccggcaaccactgcgagacaaagggcagcgataagacccacacctgtctccatgtcctgtctccagaactgtcggcgaccctccgtttctgtttccacctaagcctaaggacacccctgatgatcagcagaacccctgaagtgacctgtgtggtggtggccgtgtctcacgaagatcccgaaagtgaagttcaattggtacgtggacggcggtgaagtgacacacgccaagaccaagcctagagaggaacagtacaacagcacctacagagtgtgtccgtgtgacctgtgtgcaccaggattggtgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaaggccctggccgctcctatcgagaaaaccatctctaaggccaagggccagcctcgggaaacctcaagtctgtacactgcctcctagccgggacgagctgacaaaaatcaggtgtccctgagctgcgccgtgaagggtttaccctccgatatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgagaacaactacaagaccacacctctgtgtgacagcgacggctcattcttctggtgtccaagctgacagtgagacaagagcagatggcagcagggcaacgtgtcagctgttctgtgatgcagcagggccctgcacaaccactacaccagaagtctctgtctgagccctggcaaagggcggaagcgggtgaagcgggaggtatctgtgtggaacccctcggcatggaaaacggcataatcgccaatagccagatcgccgacgagcgtcagagtgcatttctgggactgcaacactgggtgccagagctggccagactgaatagacggcatggttaacgcttgacacccagcagcaacgacgacaacccctggattcaagtgaacctgtgcggcgtatgtgggtcacagggtgtgttacacagggcgcaagcagactggccagccagagtatctgaaggccttaaggtggcctacagcctgaacggccagagttcactcaccagcgtgaacaagaagcacaagagttcgtcggaactggaacaagaacgccgtgcacgtgaacctgttcgagacacctgtggaagcccagtagctgcggcgtgtaccctacaagctgtcacaccgctgcacactgagattcagctgctgtgggtgcgagctgaatggctgtgctaactccttgggctgaagaacaatagcatccccgacaagcagatcaccgcctccagcagctataagacatggggcctgcacctgttagctggaacccctagctacgacagactggacaagcaggaaacctcaatgccctgggtggccggcagctacggcaatgatcaatggctgcaagtggaacctgggacgagcagcaagaagtgcacggcgtatcattaccaggcgctagaaaattcggcagcgtgcagttcgtggccagctacaaagtgccctactccaacgacagcgccaactggaccgagatcaggaccctagaacggcgagctccaagatctccccggcaattgggacaaccacagccacaagaagaatctgttcgaaacccctatcctggccagatatgtgcgcattctgcccgtggcctggcacaacagaattgcctgagactggaactgctgggatgc
131	EGF(RGE)_HSA[A626-L633]eliminado_C1	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVGRGEVFPSTCTCLKGYAGNHCETKDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCECCQAA DKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFEDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELQGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCF AE EGKKLVACVEPLGMENGNIA NSQIAASSVRVTFGLGLQHWVPELARLNRAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLRLRMWVTGVVTQGASRLASHEY LKAFKVAYSLNGHEFDIFIHDVNKKHKEFVGNWNKNVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNG
132	Ácido nucleico de 131	ctggacatctgtagcaagaacccttgccacaacggcgccctgtgcaagagatcagtaagaagtgcggggcgaaagtctttccagctacacctgtacctgtgaagggtatgccggcaaccactgcgagacaaaggtatgccacaagagcgaggtggccacagattcaaggatctgggcgaagagaacttcaaggccctggtgtgatgccttcgctcagtagtccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagtgcagcagattcgccaagacctgtgtggccgatgagagcgcgagaactgtgataagagcctgcacaccctgttcggcgacaagctgtgtacagtggccacactgagagaaacctacggcgagatggccgactgtgtgccaagagaagccgagagaaacgagtgtcttctccagcacaagagacgacaaccccaacctgcctagactcgtgcgaccggaagtggatgtgtatgtgcaccgctttcacgacaacgaggaaaccttctgaagaagtacctgtacgagatcgccagacggcaccctacttttatgcccttgagctgtgttcttcgccaagcgggtataaggccgcttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggctgcctgtctgtgcctaagctggacgagctgagagatgagggcaaaagccagctctgccaagcagagactgaaatgcgccagcctccagaagttcggcgagagagctttaaggcctgggcccgttgccagactgagccagagatttctaaggccgagtttgcgaggtgtccaagctcgtgaccgatctgacaaaaggtgcacaccgagtgctgtcacggcgatctgtggaatgtgccgacgatagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaagagtctgcgagaagccctgctggaaaagtctcactgtatcgccgaggtggaaaacgacgagatgcctgccgatctgcctagcctggctgcccattcgtggaaaagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgagggccaaggtgtgtttctgggcagtttctgtatgtagtgcggcgagacaccccgactattctgtgttctgtctgcggctggcca

		aaacctacgagacaaccctggaaaaatgctgcgcgctgccgatcctcagagtggtatgccaagggtgtcgac gagttcaagcctctggtggaagaacccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctgggcg agtacaagttccagaatgccctgctcgtgcggtacaccaagaaagtcctcaggtgtccacacctactggttg aggtgtcccgaatctgggcaaagtgggcagcaagtggtgcaagcacctgaggccaagagaatgccttgccg cgaggattatctgagcgtggtgctgaatcagctgtgcgtgctgcacgagaaaacccctgtgtccgacagagtgc caagtgtgtaccgagagcctcgtgaacagaaggccttcttagcgccttggaagtggacgagacatactgtgc caaagagttcaacgccgagacattcaccttcacgccgacatctgcacccctgtccgagaaagagcggcagat caagaagcagacagccctggtcagctggttaagcacaagcccaaggccaccaaaagaacagctgaaggcc gtgatggacgacttcgcccctttgtcgagaagtgtgcaaggccgacgacaaaagagacatgcttcgccgaaga gggcaagaaactggtggcctgtgtggaaccctcgcatggaaaacggcaatatcgccaatagccagattgcc gccagcagcgtcagagtgacatttctgggactgcaacactgggtgccgagctggctagactgaatagagccgg catggtcaacgcctggacaccagcagcaacgacgataatccctggattcaagtgaacctgtcgcggtatgt gggtcacaggtgtgttacacaggcgcaagcagactggccagccagagtatctgaaggccttaaggtggcct acagcctgaacggccagagttcgaacttcacacgacgtgaacaagaagcacaagagttgtcggcaactg gaacaagaacgcctgcacgtgaacctgttcgagacacctgtggaagcccagtagctgcggtgtacacctaca agctgtcacaccgcctgcactctgagattcgaactgctgggatgcgagctgaacggc
133 =71	EGF[EDIL3]_HS A[A626- L633]eliminado_ C1[EDIL3]	DICDPNPCENGIGCLPLADGSFSCPCPDGFTDPNCSSVVEVASDEEEPTSA GPTNPCHNGGTCSEISEAYRGDTFIGYVCKPRGFNGIHCQHNINECEVEPC NGGICTDLVANYSCCEPGEFMRNRCQYKDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALV LIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSKSLHTLFGDK LCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCT AFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCECCQAADKA ACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFA EVSKLVTDLTkvHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCE KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTY ETLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQLGEYKFQNA LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLN QLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH ADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKAD DKETCFAEEGKKLVACSGPLGIEGGIISNQQITASSTHRALFGLQKWYPYAR LNKKGLINAWTAAENDRWPWIIQLQRKMRVTGVITQGAKRIGSPEYIKSYKI AYSNDGKTWAMYKVKGTNEDMVFRGNIDNNTPYANSFTPIKAQYVRLYPQVCR RHCTLRMELLGCELSG
134	Ácido nucleico de 133	gacatctgcgaccccaatccttgcgagaatggcggcatttctgctcgtgactggccgatggcagcttctctgtga atgccccgatggcttcacagaccccaattgcagctctgtggtggaagtggccagcgacgaggaagaacctaca agcgctggccccctgcacaccaatccatgtcataatggcggaacctgcgagatcagcgaggcctacagaggcg ataccttcacggtacgtgtgcaagtgcgccagaggcttaatggcatccactgccagcacaacatcaacgagt gcgaggtggaacatgaagaacggcgccatctgtaccgacctggtggccaattactcttgcgagtgccctggc gagttcatgggcagaaactgccagtacaaggacgcccacaagagcgaggtggccacagattcaaggacctg ggcgaagagaactcaaggccctggtgctgatcgctcagatctccagcagagcccttcgaggaccac gtgaagctggtcaacgaagtaccgagttcgccaagacctgtgtggccgatgagagcgccgagaaactgtgaca agagcctgcacacactgttcggcgaagaactgtgtaccgtggccacactgagagaaacctacggcgagatggc cgactgctgtgccaagcaagagcccagagaaaacgagtgcttctccagcacaaggatgacaaccccaacct gcctagactcgtgcggcctgaagtggatgtgatgtgcaccgccttcacgacaacgaggaaaccttctgaagaa gtacctgtacgagatcgccagacggcaccctacttttatgcccctgagctgctgttctcgccaagcggataagg ccgccttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggctgctgtcgtcctaagctggacgagctgagagatg agggcaaagccagctcgtccaagcagagactgaaatgcgccagcctccagaagttcgcgagagagcttttaa ggcctgggcccgttgccagactgagccagagatttctaaggccgagtttgcgagggttccaagctcgtgaccga tctgacaaagggtgcacaccgagtgctgtcacggcgatctgtggaatgtgccgacgatagagccgacctggcca agtatatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaagagtgctgcgagaagccccctgtgga aaaagtctcactgtatcgccgaagtggaaaacgacgagatgcccgccgatctgccttctggtcgcgatttctgga aagcaaggatgtgtgcaagaactacggcaggccaaagatgtgttctgggcatgttctgtatgtagtaccgccc gagacaccccgactattctgtggttctgctgctgcggctggccaagacatacagagacaaccttgaaaaatgctgc gccgctgccgatcctcacgagtggtatgccaagggttcgacgagttcaagccactggtggaagaacccagaa cctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctggcgagtagacaagttccagaatgcctgtcgtgcggta accaagaaagtgcctcaggtgtccacacctactggttgaggtgtcccggaatctgggcaaagtgggcagca

		agtggtgcaagcaccctgaggccaagagaatgccttgcgccgaggattacctgagcgtggtgctgaatcagctgt gcgtgctgcacgagaaaacccctgtgtccgacagagtgaccaagtgtgtaccgagagcctctgaacagaag gccttgccttagcgccctggaagtggacgagacatactgcccgaagagttaacgccgagacattaccttcca cgccgatatctgcaccctgtccgagaaagagcggcagatcaagaagcagacagccctggtcgagctggttaag cacaagcccaaggccaccaagaacagctgaagggcgtgatggacgacttcgccgcttctgcgagaagtgt gcaaggccgacgacaaagagacatgcttcgccgaagaggggaagaaactggtggcctgttctggccctctggg catcgaaggcggcatcatcagcaatcagcagatcaccgccagcagcaccacagagcactgttggcctgcaa aagtggatccctactacgcccggctgaacaagaagggcctgattaacgctggacagccgcccagagaatgaca gatggccctggattcagatcaacctccagcgggaagatgagagtaccggcggttatcacacagggcgcaaagag aatcggtccctgagtacatcaagagctacaagatgcctacagcaacgacggcaagacctgggcatgtac aaagtgaaggccaccaacgaggacatggtgtccggggcaacatcgacaacaaccccttacgccaacag cttcacccctctatcaaggccagtagctgcggctgtaccctcaagtgtgcagaaggcactgtaccctgagaatg gaactgctgggctgcgaactgtctggc
135	EGF[EDIL3]_HS A[A626- L633]eliminado_ C2[EDIL3]	DICDPNPCENGIGICLPGLADGSFSCECPDGFTDPNCSSVVEVASDEEEPTSAGP CTPNPCHNGGTCEISEAYRGDTFIGYVCKCPRGFNGIHCQHINECEVEPCKNG GICTDLVANYSCCEPGEFMGRNCQYKDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFA QYLQQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMTAFHDNEETFL KKYLYEIAIRRHYPFYAPPELLFFAKRYKAAFTCECCQAACDLPLKDLNDEGK ASSAKQRLKCSLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSRLVTDLTkvHTE CCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYE TTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLV RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETTFHADICTLSE KERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEEG KKLVACSEPLGMKSGHIQDYQITASSIFRTLNMDFMFTWEPRKARLDKQGVNAW TSGHNDQSQWLQVDLLVPTKVTGIITQGAQDFGHVQFVGSYKLAYSNDGEHWT VYQDEKQRKDKVFQGNFDNDTHRKNVIDPPIYARHIRLPWSWYGRITLRSLLG C
136	Ácido nucleico de 135	gacatctgcgaccccaatccttgcgagaatggcggcatttgcctgctgactggcagtgccagcttctctgtga atgccccgatggcttcacagaccccaattgcagctctgtggtggaagtggccagcagcaggaagaacctaca agcgtggtggccctgcacaccaatccatgtcataatggcggaacctgcgagatcagcagggcctacagaggcg atacctcatcggtacgtgtgcaagtggccagaggctcaatggcatccactgccagcacaacatcaacgagt gagaggtggaacatgcaagaacggcgccatctgtaccgacctggtggccaattactctgcgagtgccctggc gagttcatgggcagaaactgccagtacaaggacgcccacaagagcagaggtggccacagattcaaggacctg ggcgaagagaactcaaggccctggtgctgatcgctcgtcagtatctccagcagagcccttcgaggaccac gtgaagctggtcaacgaagtaccgagttcgccaagacctgtgtggccgatgagagcgccgagaaactgtgaca agagcctgcacacactgttcggcgacaagctgtgtaccgtggccacactgagagaaacctacggcgagatggc cgactgctgtgccaagcaagagcccagagaaacgagtgtctcctccagcacaaggatgacaaccccaacct gcctagactcgtgcggcctgaagtggatgtgatgacccgcttcacgacaacgaggaaacctcctgaagaa gtacctgtacgagatcgccagacggcaccctactttatgcccctgagctgctgttcttcgccaagcgtgataagg ccgcttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggctgctgtctgctgctaagctggacgagctgagagatg agggcaaagccagctctgccaagcagagactgaaatgcccagcctccagaagttcgcgagagagcttttaa ggcctgggcccgttgccagactgagccagagatttctaaggcaggttgccgaggttcgaagctcgtgaccga tctgacaaagggtcacaccgagtgctgtcacggcgatctgctggaatgtgcccagcatagagccgacctggcca agtatatctgcgagaaccaggagcatcagcagcaagctgaaagagtgctgcgagaagcccctgctgga agtctcactgtatcgccgaagtggaaaacgacgagatgcccgccgatctgcttctggtgctgcccattctgga aagcaaggatgtgtgcaagaactacgccgaggccaaagatgtgttctggtgatgtatgagtagcggcgc agacaccccgactattctgtgttctgctgctgcggctggccaagacatacagagacaacctggaaaaatgctgc gccgtgcccgtcctcagcagtggtatgccaaggtgttcgacgagttcaagccactggtggaagaacccagaa cctgatcaagcagaactcgagctgttcgagcagctggcgagtagaagttccagaatgccctgctcgtgcggta caccaagaaagtgcctcaggtgtccacacctacactggtgaggtgtccgggaatctgggcaaagtgggcagca agtgtgcaagcaccctgaggccaagagaatgccttgcgccgaggattacctgagcgtggtgctgaatcagctgt gcgtgctgcacgagaaaacccctgtgtccgacagagtgaccaagtgtgtaccgagagcctctgaacagaag gccttgccttagcgccctggaagtggacgagacatactgcccgaagagttaacgccgagacattaccttcca

		cgccgatatctgcaccctgtccgagaaagagcgccgagatcaagaagcagacagccctggctgagctggtaag cacaagcccaaggccaccaagaacagctgaaggccgtgatggacgacttcgccgctttgtcgagaagtgt gcaaggccgacgacaaagagacatgttcgccgaagagggcaagaaactggggcctgttctgagccactgg gcatgaagtctggccacatccaggattaccagatcaccgccagcagcatctcagaacctgaacatggatatgt tcacctgggagccccggaaggccagactggataagcagggaaaagtgaacgcctggaccagcgccacaat gaccagtctcagtggtgcaagtggacgtggtgctaccaaaagtaccggcatcatcacagggcgcaa aggatttcggccacgtgcagttgtggcagctacaagctggcctacagcaacgatggcgagcactggacagtgt accaggacgagaagcagcggaaggataaggtgtccagggcaactcgacaacgacaccaccggaagaa cgtgatcgaccctcctatctacgcccggcacatcagaatcctgccttggttggtacggccggtaccctgaga agcgagctgctggatgt
137	EGF_HSA[A626 – L633]eliminado_ C2	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVVRGDVFPSTCTCLKGYAGNHCETKDAHKSEVA HRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLLQHKDDNPNLRLVR PEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAA DKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPA EFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK PLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR RHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEKLPLVEEPQNLIKQN CELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLKVGSKCKHPEAKR MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV EKCKADDKETCFEEGKKLVACANPLGLKNNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFS WNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSV QFVASYKVAYSND SANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHSKKNLFETPILARYV RILPVAWHNRALRLELLGC
138	Ácido nucleico de 137	ctggacatctgtagcaagaaccttgccacaacggcgccctgtgcaagagatttcaagaagtgcggggcga cgttttccagctacacctgtacatgtctgaagggtacgcccgaacctgagacaaaggatgccaca agagcgaggtggccacagattcaaggatctggcggaagagaactcaaggccctggtgctgatcgcttgcgt cagtatctccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagtgaccgagttcgcaagacctg tgtggcgtgagagcgccgagaactgtgataagagcctgcacacctgttcggcgacaagctgtgtacagtgg ccacactgagagaaacctacggcgagatggcgactgtgtgccaagcaagagcccgagagaaacgagtgc ttctccagcacaaggacgacaaccccaacctgcctagactcgtgcgaccgaagtggatgtgtgaccgc cttcacgacaacgaggaaccttcctgaagaagtacgtgtacgagatcgccagacggcaccctactttatgcc cctgagctgtgttcttcgccaagcggtataaggccgcttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggctgcctg tctgctgcctaagctggacgagctgagagatgagggcaagccagctctgccaagcagagactgaaatgcgcc agcctccagaagttcgccgagagagctttaaggcctgggcccgttgccagactgagccagagatttctaaggcc gagtttgcgaggtgtcaagctcgtgaccgatctgacaaagggtgcacaccgagtgctgtcacggcgatctgctg gaatgtgcccagcatagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctg aaagagtgtcgcgagaagcccctgtcgaaaagtctcactgtatcgccgaggtggaaaacgacgagatgctg ccgatctgcctagcctggctgcccatttcgtggaaagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgagggccaaggt gtgttctggcatgtttctgtatgtagtcccgcagacaccccgactattctgtgttctgctgctgcccgtggcca aaacctacgagacaaccttgaaaaatgtgcgcccgtgcgatcctcacgagtggttatgccaaggtgttcgac gagttcaagcctctggtggaagaaccccaagcctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctggcg agtacaagttccagaatgccctgtcgtgcggtacaccaagaaagtgcctcaggtgtccacacctactggttg agggtgtcccgaatctgggcaagtggtggcagcaagtggtgcaagcacctgaggccaagagaatgccttgccg cgaggattacctgagcgtggtgctgaatcagctgtgctgctgcagagaaaaacccctgtgtccgacagagtgc caagtgtgtaccgagagcctcgtgaacagaaggcctgtcttagcgccctggaagtgagcagacatagctgc ccaaagagttcaacgccgagacattcaccttcacgccgacatctgcaccctgtccgagaaagagcgccgagat caagaagcagacagccctggctgagctggtaagcacaagcccaaggccaccaaaagaacagctgaaggcc gtgatggacgacttcgccgctttgtcgagaagtgtgcaaggccgacgacaaagagacatgcttcgccgaaga gggcaagaaactggtggcctgtgtaacctctgggctgaagaacaacagcatccccgataagcagatcacc gccagcagcagctataagacatggggcctgcacctgttcagctggaaccttctacgccagactggacaagca gggcaactcaatgcttgggtggccggcagctacggcaatgatcagtggtgcaagtggaacctgggcagcagca aagaagtgacaggcatcatcaccaggcgcaagaaatttcggcagcgtgcagttcgtggccagctacaaggt ggcctacagcaacgatagcgccaactggaccgagtatcaggaccctagaaccggcagctccaagatcttcccc

		ggcaactgggacaaccacagccacaagaagaatctgttcgagacacccatcctggccagatacgtgcggattc tgctgtggcctggcacaacagaatcgccctgagactggaactgctgggctgt
139	EGF_HSA[A626 -L633]	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVRGDVFPSTCTCLKGYAGNHCETKDAHKSEVA HRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLRLVR PEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAA DKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPA EFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK PILLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR RHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFEDEFKPLVEEPQNLIKQN CELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKR MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV EKCKADDKETCFAEEGKKLVA
140	Ácido nucleico de 139	ctggacatctgtagcaagaacccttgccacaacggcgccctgtgcaagagatttcaagaagtgcggggcga cgtttcccccagctacacctgtacatgtctgaagggctacgccggcaaccactgcgagacaaggatgccaca agagcgaggtggccacagattcaaggatctggcggaagagaacttcaaggccctggtgctgacgccttcgct cagtatctccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagtgcaggatgcgcaagacgtg tgtggcgtgagagcgccgagaactgtgataagacgtgcacacccctgttcggcgacaagctgtgtacagtgg ccacactgagagaaacctacggcgagatggccgactgctgtgccaagcaagagcccagagagaaacgagtgc ttctccagcacaaggacgacaaccccaacctgcctagactcgtgcgaccgaagtggatgtgattgtgcaccgc ctttcacgacaacgaggaaccttcctgaagaagtacgtgacgagatcgccagacggcaccctacttttatgcc cctgagctgctgttcttcgccaagcggtataaggccgcttcaccgaatgttgccaggccgctgataaggctgcctg tctgctgcctaagctggacgagctgagagatgagggcaaagccagctctgccaagcagagactgaaatgcgcc agcctccagaagttcggcgagagagcttttaaggcctgggcccgttgccagactgagccagagatttctaaggcc gagtttccgaggtgtccaagctcgtgaccgatctgacaaaagggtgcacaccgagtgtgtcacggcgatctgctg gaatgtgccgacgatagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctg aaagagtgtcgcgagaagccccctgctggaaaagtctcactgtatcgccgaggtggaaaacgacgagatgcctg ccgatctgcctagcctggctgcccatttctggaagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgaggccaaggtat gtgttctggcatgttctgtatgagtacggccgacacacccgactattctgtgttctgctgctgcccgtggcca aaacctacgagacaaccttgaaaaatgctgcgcccgtgcccgtatcctacgagtggtatgccaaggtgttcgac gagttcaagcctctggtggaagaacccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctgggcg agtacaagttccagaatgccctgctcgtgcggtacaccaagaaagtgctcaggtgtccacacctactggttg agggtgtcccgaatctgggcaaagtgggcaaggtgtgcaagcaccctgaggccaagagaatgccttgccg cgaggattacctgagcgtggtgtgaatcagctgtgcgtgctgcacgagaaaacccctgtgtccgacagagtgc caagtgtctgaccgagagcctcgtgaacagaaggcctgtttagcgccctggaagtggacgagacatacgtgc caaagagttcaacgccgagacattcaccttcacgccgacatctgcaccctgtccgagaaagagcggcagat caagaagcagacagccctggtcagctggttaagcacaagcccgaagccaccaaagaacagctgaaggcc gtgatggacgacttcgccccttctgcgagaagtgtgcaaggccgacgacaaagagacatgcttcgcccgaaga gggcaagaaactggtggct
141	MFG-E8 C1 de unión a PS	CVEPLGLENGNIANSQIAASSVRVTFGLQHWVPELARLNRAGMVNAWTPSSND DNPWIQVNLLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDHFDVNK KHKEFVGWNWKNNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNG
142	MFG-E8 [L76M] C1 de unión a PS	CVEPLGMENGNIANSQIAASSVRVTFGLQHWVPELARLNRAGMVNAWTPSSN DDNPWIQVNLLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDHFDVN KKHKEFVGWNWKNNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNG
143	MFG-E8 C2 de unión a PS	CANPLGLKNNIPDKQITASSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGS YGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSNDSANWTEYQD PRTGSSKIFPGNWDNHSKKNLFETPILARYVRILPVAWHNRALRLELLGC
144	EDIL-3 C1de unión a PS	CSGPLGIEGGIISNQITASSTHRALFGLQKWYPYARLNKKGLINAWTAAENDR WPWIQINLQRKMRVTGVITQGAKRIGSPEYIKSYKIAYSNDGKTWAMYKVKGNE DMVFRGNIDNNTPYANSFTPIKAQYVRLYPQVCRRHCTLRMELLGCELSG
145	EDIL-3 C2 de unión a PS	CSEPLGMKSGHIQDYQITASSIFRTLNDMDFTWEPRKARLDKQGVNAWTS NDQSQWLQVDLLVPTKVTGIITQGAQDFGHVQFVGSYKLAYSNDGEHWTYVQD

		EKQRKDKVFQGNFDNDTHRKNVIDPPIYARHIRLPWSWYGRITLRSELLGCTEE E
146	EDIL-3 C2 de unión a PS TEEE truncado	CSEPLGMKSGHIQDYQITASSIFRTLNDMDFTWEPRKARLDKQGVNAWTS NDQSQWLQVDLLVPTKVTGIITQGAQDFGHVQFVGSYKLAYSNDGEHWTVYQD EKQRKDKVFQGNFDNDTHRKNVIDPPIYARHIRLPWSWYGRITLRSELLGC
147 =117	Secuencia de la proteína FP133	LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVVRGDFVPSYCTCTCLKGYAGNHCETKGS DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLKLVNEVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVREVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAA FTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWA VARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDS ISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNL IKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEA KRMPCAEDYLSVVLNQCLVLEHETPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVD ETYPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKTALVELVKHKPKATKEQLKAVMD DFAAFVEKCKKADDKETCF AEEGKKLVAASQAALGLGSGSGSGSCVEPLGM ENGNIANSQIAASSVRVTFGLQHWVPELARLNRAGMVNAWTPSSNDNPW IQVNLLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDFIHDVNKKHKEFV GNWNKNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNG
148	Secuencia de ácido nucleico FP133	ctggacatctgtagcaagaacccctgccacaacggcgccctgtgcgaagagatttcaagaagtgcggggcga cgtttccccagctacacctgtacatgtctgaagggtacgcccgaaccactgcgagacaaaaggatctgatgc ccacaagagcgaggtggccacagattcaaggatctggcggaagagaactcaaggccctggtgctgatcgcc ttcgctcagtatctccagcagagcccttcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagtgaccgagttcgccaag acctgtgtggcgtatgagagcgccgagaactgtgataagagcctgcacacccgttcggcgacaagctgtgtac agtggccacactgagagaaaacctacggcgagatggcggactgtgtgccaagcaagagcccgagagaaaacg agtgttctccagcacaaggacgacaaccccaacctgcctagactgtgacgacccgaagtggatgtgatgtgc accgcttccagcacaacgaggaacccctcctgaagaagtacgtgacgagatcgccagacggcaccctacttt tatgccctgagctgtgttctcgcaagcggataaggccgctcaccgaatgttgccagggcgtgataaggc tgcctgtctgtgcctaagctggacgagctgagagatgagggcaaagccagctctgccaagcagagactgaaat gcgccagcctcagaagttcggcgagagagctttaaggcctgggctgccaagactgagccagagatttccta aggccgagttgccgaggtgtccaagctgtgaccgatctgacaaaaggtgcacaccgagtgctgtcacggcgat ctgtggaatgtgcccagcatagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagc aagctgaaagagtgctgcgagaagcccctgtggaaaagtctcactgtatcgccgaggtggaacgacgag atgctgcccgatctgcccagctggctgcccgaattcgtggaaagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgaggc caaggatgtgttctgggcatgttctgtatgtagtaccgcccagacaccccactattctgtgttctgtctgctg ctggccaaaacctacgagacaacccctggaaaaatgtgcgcgctgcccgatcctacgagtggtatgccaaggt gttcgacgagttcaagcctctggtggaagaaccccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagc tggtgaggtgtcccgaatctgggcaaagtgggcagcaaggttgcaagcaccctgaggccaagagaatgcct tgccgagagattacctgagcgtgtgtgaatcagctgtgctgtgcacgagaaaacccctgtgtccgacaga gtgaccaagtgtgtaccgagagcctcgtgaacagaaggccttgcttagcgcctggaagtggacgagacata cgtgcccagaagagttcaacgcccagacattcacctccacgcccagacatctgcacccgtccgagaaagagcgg cagatcaagaagcagacagcccgtgtgagctggttaagcacaagcccaggccaccaaagaacagctgaa ggccgtgatggacgacttcgccccttctgtcagaagtgctgcaaggccgacgacaaagagacatgcttcgccc aagagggcaagaactgtgtgctgctcagggctgtctcggacttggtggaagcggaggaagtgtgtggtatc ggcggatctgtgtggaacccctcgccatggaacggcaatatcgccaatagccagattgccgacgagcgt cagagtgacatttctgggactgcaacactgggtgcccagctggctagactgaatagacgggcatggtcaacg cctggacacccagcagcaacgacgataatccctggattcaagtgaacctgtgcggcgtatgtgggtcacaggt gtgttacacagggcgcaagcagactggccagccagagtatctgaaggcctttaagggtgcctacagcctgaa cggccacgagttcgactcatccacgacgtgaacaagaagcacaagagttgtcggaactggaacaagaac gccgtgcacgtgaacctgttcgagacacctgtggaagccagtagctgcggctgtaccctacaagctgtcacacc gcctgcactctgagattcgaactgctgggatgcgagctgaacggc

La presente solicitud también incluye variantes de cada una de las SEQ ID NO: 69, 70 y 72, en donde el dominio similar a EGF de la secuencia EDIL3 incluida en la misma corresponde a cualquiera de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, o SEQ ID NO: 101.

La presente solicitud también incluye una proteína de fusión terapéutica que comprende los dominios de unión a integrina de MFGE8 o EDIL3, y dominios de unión a PS truncados tales como una variante truncada del dominio V de IgSF de TIM4 o una variante truncada del dominio GLA de las variantes de la proteína puente GAS6.

Modificación de las Proteínas de la Presente Descripción

La presente solicitud incluye variantes de las proteínas descritas en este documento y/o fragmentos de las mismas que tienen diversas modificaciones en los dominios, así como fusiones y conjugados de las moléculas descritas. Por ejemplo, un dominio de la proteína de fusión terapéutica puede tener una modificación conservadora de residuos de aminoácidos, y en donde las proteínas modificadas retienen o tienen propiedades mejoradas en comparación con una proteína de fusión que comprende el dominio original. Alternativamente, un dominio de la proteína de fusión terapéutica puede tener una o más deleciones de residuos de aminoácidos, en donde las proteínas de fusión modificadas retienen o tienen propiedades mejoradas en comparación con la proteína que comprende el dominio original. Alternativamente, las proteínas de fusión terapéuticas pueden tener una o más inserciones de residuos de aminoácidos, en donde las proteínas modificadas retienen o tienen propiedades mejoradas en comparación con la proteína no modificada. En una modalidad, dicha inserción de aminoácidos incluye residuos de glicina o serina en varias combinaciones para funcionar como un ligador entre dominios de la proteína principal.

Se puede realizar mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR para introducir la mutación o mutaciones y el efecto sobre la unión de integrina y/o PS, u otra propiedad funcional de interés, puede evaluarse en ensayos *in vitro* o *in vivo*. Pueden introducirse modificaciones conservadoras (como se trató anteriormente) y/o las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos. Además, típicamente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de un dominio de unión.

Las variantes de la secuencia de aminoácidos de las proteínas de fusión terapéuticas, que tienen propiedades esencialmente similares a las variantes no modificadas, pueden prepararse mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en los ADN codificantes o

mediante la síntesis de las variantes deseadas. Tales variantes incluyen, por ejemplo, deleciones o inserciones o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de las moléculas presentes. En algunas modalidades, las variantes pueden incluir secuencias ligadoras adicionales, secuencias ligadoras reducidas o eliminación de secuencias ligadora y/o mutaciones o sustituciones de aminoácidos y deleción de uno o más aminoácidos. Se realiza cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar al constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales de las moléculas, como cambiar el número o la posición de los posibles sitios de glicosilación.

Métodos de Producción de Moléculas Recombinantes

Ácidos nucleicos y sistemas de expresión

En una modalidad, la presente solicitud proporciona un método para producir una o más cadenas polipeptídicas de la proteína de fusión terapéutica de forma recombinante, que comprende: 1) producir uno o más constructos de ADN que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena polipeptídica de la molécula de unión multiespecífica ; 2) introducir dicho(s) constructo(s) de ADN en uno o más vectores de expresión; 3) co-transfectar dicho(s) vector(es) de expresión en una o más células huésped; y 4) expresar y ensamblar la molécula en una célula huésped o en solución.

A este respecto, la descripción proporciona ácidos nucleicos aislados, por ejemplo, uno o más polinucleótidos, que codifican las proteínas de fusión terapéuticas descritas en el presente documento. Las moléculas de ácido nucleico incluyen ADN y ARN tanto en forma monocatenaria como bicatenaria, así como las correspondientes secuencias complementarias. Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen genes de longitud completa o moléculas de ADNc así como una combinación de fragmentos de los mismos. Los ácidos nucleicos de la invención se derivan de fuentes humanas, pero la invención incluye los derivados de especies no humanas.

Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico que se ha separado de secuencias genéticas adyacentes presentes en el genoma del organismo del que se aisló el ácido nucleico, en el caso de ácidos nucleicos aislados de fuentes naturales. En el caso de ácidos nucleicos sintetizados enzimáticamente a partir de una plantilla o químicamente, tales como productos de PCR, moléculas de ADNc u oligonucleótidos, por ejemplo, se entiende que los ácidos nucleicos resultantes de tales procesos son ácidos nucleicos aislados. Una molécula de ácido nucleico aislada se refiere a una molécula de ácido nucleico en forma de un fragmento separado o como un componente de un constructo de ácido nucleico más grande. En una modalidad preferida, los

ácidos nucleicos están sustancialmente libres de material endógeno contaminante. La molécula de ácido nucleico se ha derivado de modo preferente de ADN o ARN aislado al menos una vez en forma sustancialmente pura y en una cantidad o concentración que permite la identificación, manipulación y recuperación de las secuencias de nucleótidos que lo componen mediante métodos bioquímicos estándar (como los descritos en Sambrook *et al.* al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). De modo preferente, dichas secuencias se proporcionan y/o se construyen en forma de un marco de lectura abierto ininterrumpido por secuencias internas no traducidas, o intrones, que están típicamente presentes en genes eucariotas. Las secuencias de ADN no traducido pueden estar presentes en 5' o 3' de un marco de lectura abierto, donde las mismas no interfieren con la manipulación o expresión de la región codificante.

La presente invención también proporciona sistemas de expresión y constructos en forma de plásmidos, vectores de expresión, casetes de transcripción o expresión, que comprenden al menos un polinucleótido como se describió anteriormente. Además, la invención proporciona células huésped que comprenden dichos sistemas o constructos de expresión.

En una modalidad, la presente descripción proporciona un método para preparar una proteína de fusión terapéutica que comprende las etapas de: (a) cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión, en donde la célula huésped cultivada expresa la proteína de fusión; y (b) recuperar la proteína de fusión del cultivo de la célula huésped.

También se proporcionan en la descripción los vectores de expresión y las células huésped para producir las proteínas de fusión terapéuticas descritas anteriormente. El término "vector" significa cualquier molécula o entidad (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido, bacteriófago o virus) que es adecuada para la transformación o transfección de una célula huésped y contiene secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan (junto con la célula huésped) la expresión de una o más regiones codificantes heterólogas unidas operativamente a las mismas. Pueden emplearse varios vectores de expresión para expresar los polinucleótidos que codifican cadenas o dominios de unión de la molécula. Se pueden utilizar vectores de expresión tanto basados en virus como no víricos para producir la proteína de fusión terapéutica en una célula huésped de mamífero. Los vectores y sistemas no virales incluyen plásmidos, vectores episomales, típicamente con un casete de expresión para expresar una proteína o ARN, y cromosomas artificiales humanos (véase, por ejemplo, Harrington *et al.*, (1997) *Nat Genet* 15: 345). Por ejemplo, los vectores no virales útiles para la expresión de polinucleótidos y polipéptidos en células de mamíferos (por ejemplo, humanas) incluyen pThioHis A, B & C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B & C,

(Invitrogen, San Diego, CA), vectores MPSV y muchos otros vectores conocidos en la técnica para expresar otras proteínas. Los vectores virales útiles incluyen vectores basados en retrovirus, adenovirus, adeno virus asociados, virus del herpes, vectores basados en SV40, virus del papiloma, virus HBP Epstein Barr, vectores del virus vaccinia y virus Semliki Forest (SFV). Véase, Brent *et al.*, (1995) *supra*; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 807; and Rosenfeld *et al.*, (1992) *Cell* 68: 143.

La elección del vector de expresión depende de las células huésped previstas en las que se va a expresar el vector. Normalmente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (por ejemplo, potenciadores) que están unidas operativamente a los polinucleótidos que codifican una proteína de fusión terapéutica. En algunas modalidades, se emplea un promotor inducible para prevenir la expresión de secuencias insertadas excepto en condiciones inductoras. Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo, arabinosa, lacZ, promotor de metalotioneína o un promotor de choque térmico. Los cultivos de organismos transformados se pueden expandir en condiciones no inductoras sin sesgar la población para codificar secuencias cuyos productos de expresión son mejor tolerados por las células huésped. Además de los promotores, también se pueden requerir o desear otros elementos reguladores para la expresión eficaz de las proteínas de fusión terapéuticas. Estos elementos incluyen típicamente un codón de iniciación ATG y un sitio de unión de ribosoma adyacente u otras secuencias. Además, la eficacia de expresión puede mejorarse mediante la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso (véase, por ejemplo, Scharf *et al.*, (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20: 125; and Bittner *et al.*, (1987) *Meth. Enzymol.*, 153 :516). Por ejemplo, el potenciador de SV40 o potenciador de CMV se puede utilizar para aumentar la expresión en células huésped de mamífero.

Los vectores de expresión también pueden proporcionar una posición de secuencia señal de secreción para formar una proteína de fusión con polipéptidos codificados insertando las secuencias de dominios de unión y/o dominios de solubilización descritas anteriormente. Más a menudo, las secuencias insertadas se unen a secuencias señal antes de su inclusión en el vector. Los vectores que permiten la expresión de los dominios de unión y el dominio de solubilización como proteínas de fusión conducen de ese modo a la producción de proteínas manipuladas intactas. Una célula huésped, cuando se cultiva en condiciones apropiadas, se puede utilizar para expresar una proteína diseñada que posteriormente se puede recolectar del medio de cultivo (si la célula huésped la secreta al medio) o directamente de la célula huésped que la produce (si no se secreta). La selección de una célula huésped apropiada dependerá de varios factores, tales como niveles de expresión deseados, modificaciones de polipéptidos que son deseables o necesarias

para la actividad (tales como glicosilación o fosforilación) y facilidad de plegamiento en una molécula biológicamente activa. Una célula huésped puede ser eucariota o procariota.

Las líneas celulares de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) y cualquier línea celular utilizada en un sistema de expresión conocido en la técnica se puede utilizar para preparar las proteínas de fusión recombinantes de la invención. En general, las células huésped se transforman con un vector de expresión recombinante que comprende ADN que codifica una proteína de fusión deseada. Entre las células huésped que pueden emplearse se encuentran procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Los procariotas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen células de insectos y líneas celulares establecidas de origen mamífero. Ejemplos de líneas de células huésped de mamíferos adecuadas incluyen las células COS-7, células L, células CI27, células 3T3, células de ovario de hámster chino (CHO) o sus derivados y líneas celulares relacionadas que crecen en medios sin suero, células HeLa, líneas celulares BHK., la línea celular CV-1 EBNA, células de riñón embrionario humano (HEK) como 293, 293 EBNA o MSR 293, células epidérmicas humanas A431, células Colo205 humanas, otras líneas celulares de primates transformadas, células diploides normales, cepas celulares derivadas de cultivo in vitro de tejido primario, explantes primarios, células HL-60, U937, HaK o Jurkat. Opcionalmente, las líneas celulares de mamíferos tales como HepG2/3B, KB, NIH 3T3 o S49, por ejemplo, se pueden utilizar para la expresión del polipéptido cuando es deseable utilizar el polipéptido en diversos ensayos de transducción de señales o reporteros. Alternativamente, es posible producir el polipéptido en eucariotas inferiores como levadura o en procariotas como bacterias. Las levaduras adecuadas incluyen *P. pastoris*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, cepas *Kluyveromyces*, *Candida* o cualquier cepa de levadura capaz de expresar polipéptidos heterólogos. Las cepas bacterianas adecuadas incluyen *E. coli*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar polipéptidos heterólogos. Si la proteína de fusión se elabora en levadura o bacteria, puede ser deseable modificar el producto producido allí, por ejemplo, mediante fosforilación o glicosilación de los sitios apropiados, para obtener un producto funcional. Tales uniones covalentes se pueden lograr utilizando métodos químicos o enzimáticos conocidos.

Los métodos para introducir vectores de expresión que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación se pueden utilizar para otros huéspedes

celulares. Otros métodos incluyen, por ejemplo, electroporación, tratamiento con fosfato cálcico, transformación mediada por liposomas, inyección y microinyección, métodos balísticos, virosomas, inmunoliposomas, policación: conjugados de ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, fusión con la proteína estructural del virus del herpes VP22, agente–captación mejorada de ADN y transducción *ex vivo*. Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, a menudo se deseará una expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable proteínas modificadas por ingeniería pueden prepararse utilizando vectores de expresión de la descripción que contienen orígenes virales de replicación o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Después de la introducción del vector, se puede permitir que las células crezcan durante 1–2 días en un medio enriquecido antes de cambiarlas a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento de células que expresan con éxito las secuencias introducidas en medios selectivos. Las células resistentes, transfectadas de forma estable pueden proliferar utilizando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas para el tipo de célula.

Las proteínas de fusión se recuperan típicamente del medio de cultivo como un polipéptido secretado, aunque también pueden recuperarse del lisado de la célula huésped cuando se producen directamente sin una señal secretora. Si el polipéptido está unido a la membrana, se puede liberar de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Triton–X 100).

Cuando la proteína de fusión se produce en una célula recombinante distinta de una de origen humano, está completamente libre de proteínas o polipéptidos de origen humano. Sin embargo, es necesario purificar la proteína de fusión a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Como primer paso, el medio de cultivo o el lisado normalmente se centrifuga para eliminar los restos celulares en partículas. Las moléculas producidas se pueden purificar convenientemente mediante cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. Otras técnicas para la purificación de proteínas como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina Sepharose, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), cromatofoco, también están disponibles SDS–PAGE y precipitación con sulfato de amonio.

En ciertos aspectos, en el presente documento se proporciona un vector viral que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de fusión terapéutica de la presente invención. En algunas modalidades, el vector viral se deriva de AAV. En algunas modalidades, el

vector viral se administra a un sujeto, por ejemplo, un ser humano, en donde se expresa la proteína de fusión terapéutica, y se puede utilizar para el tratamiento y/o prevención de las enfermedades enumeradas en el presente documento.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene una proteína de fusión terapéutica de la presente invención, en combinación con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones pueden incluir una o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) proteínas de fusión terapéuticas de la descripción.

Las composiciones farmacéuticas como se describen en el presente documento también se pueden administrar en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una proteína de fusión de la presente descripción combinada con, por ejemplo, al menos un agente antiinflamatorio, antiinfeccioso o inmunosupresor. Los ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden utilizar en terapia de combinación se describen con mayor detalle a continuación en la sección sobre usos de las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción.

Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles que incluyen una proteína de fusión de la presente descripción, la proteína de fusión se mezcla con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La frase "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal, o incluido en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente, en seres humanos.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de al menos un ingrediente activo (por ejemplo, una proteína diseñada) y al menos un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

Un "medicamento" se refiere a una sustancia utilizada para tratamiento médico.

Como se utiliza en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. El portador debe ser adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). En una modalidad, el portador debería ser adecuado para la vía subcutánea.

Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, la proteína de fusión, se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una composición farmacéutica como se describe en este documento también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas como se describen en este documento incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, como oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto mediante procedimientos de esterilización como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, se puede producir una absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones

farmacéuticas de la invención. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, se pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición.

Se pueden encontrar reseñas sobre el desarrollo de formulaciones de proteínas estables en Cleland *et al.*, (1993) Crit Reviews Ther Drug Carrier Systems, 10(4): 307–377 and Wei W (1999) Int J Pharmaceutics, 185: 129–88.

Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación intradérmica o subcutánea normalmente incluyen uno o más de los siguientes componentes: un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos, agentes antibacterianos como alcohol bencílico o metil parabenos, antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito de sodio, agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético, buffers como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Tales preparaciones pueden encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración de esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando las proteínas de fusión de la invención en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y secado en

frío (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada filtrada del mismo.

La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una única forma de dosificación será generalmente la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente un 0,01 por ciento a aproximadamente un noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, de aproximadamente un 0,1 por ciento a aproximadamente un 70 por ciento, o de aproximadamente un 1 por ciento a aproximadamente un 30 por ciento de ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

La selección de un régimen de administración para una proteína de ingeniería terapéutica depende de varios factores, incluida la tasa de recambio sérico o tisular de la entidad, el nivel de síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células objetivo en la matriz biológica. En ciertas modalidades, un régimen de administración maximiza la cantidad de terapéutico administrado al paciente de acuerdo con un nivel aceptable de efectos secundarios. Por consiguiente, la cantidad de proteína administrada depende en parte de la entidad particular y la gravedad de la afección que se está tratando. Se dispone de orientación para seleccionar las dosis apropiadas de moléculas biológicas y pequeñas (véase, por ejemplo, Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Baert, et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601–608; Milgrom, et al. (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966–1973; Slamon, et al. (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783–792; Beniaminovitz, et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613–619; Ghosh, et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24–32; Lipsky, et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594–1602).

La determinación de la dosis apropiada la realiza el médico, por ejemplo, utilizando parámetros o factores conocidos o sospechados en la técnica que afectan al tratamiento o se prevé que afecten al tratamiento. Generalmente, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y luego se incrementa en pequeños incrementos hasta que se logra el efecto deseado u óptimo en relación con cualquier efecto secundario negativo. Las medidas de diagnóstico importantes incluyen las de los síntomas de, por ejemplo, la inflamación o el nivel de citocinas inflamatorias producidas.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente,

composición y modo de administración en particular, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente descripción empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general e historial médico previo del paciente que está siendo tratado, y factores similares conocidos en la técnica médica.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada. Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación, como se utiliza en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se debe lograr, y las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en los individuos.

Para la administración de la proteína de fusión terapéutica, la dosis varía de aproximadamente 0,0001 a 150 mg/kg, tal como 5, 15 y 50 mg/kg de administración subcutánea, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a seis meses.

Las proteínas de fusión terapéuticas de la invención se pueden administrar en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, cada tres meses o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica midiendo los niveles sanguíneos de proteína diseñada en el paciente. En algunos métodos, la

dosis se ajusta para conseguir una concentración de proteína plasmática de aproximadamente 1–1000 µg/mL y en algunos métodos de aproximadamente 25–300 µg/mL.

Alternativamente, la proteína de fusión terapéutica se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían en función de la vida media de la proteína en el paciente y pueden variar según el tratamiento sea profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes pueden continuar recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la afección o enfermedad o hasta que el paciente muestra una mejoría parcial o completa de los síntomas de la afección o enfermedad. Posteriormente, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración en particular, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente descripción empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración de la tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general e historial médico previo del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" de una proteína de fusión de la invención puede dar como resultado una disminución de la gravedad de una afección o síntomas o una enfermedad y/o la prevención del deterioro o discapacidad debido a la afección.

Una composición de la presente descripción puede administrarse mediante una o más vías de administración utilizando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración para las proteínas modificadas genéticamente de la invención incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenterales, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La frase "administración parenteral", como se utiliza en este documento, significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica,

normalmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraestemal.

Alternativamente, una proteína de fusión terapéutica de la invención puede administrarse por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa.

Las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción se pueden preparar con portadores que protegerán las proteínas contra una liberación rápida, como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etilenvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

En determinadas modalidades, las proteínas de fusión terapéuticas de la invención se pueden formular para asegurar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la BBB (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente a células u órganos específicos, mejorando así la administración de fármacos dirigida (véase, por ejemplo, Ranade VV (1989) J. Clin. Pharmacol., 29: 685).

Usos terapéuticos y métodos de la invención.

Las proteínas de fusión terapéuticas de la presente invención tienen utilidades terapéuticas y de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar a células en cultivo, por ejemplo *in vitro* o en un sujeto, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir o diagnosticar una variedad de trastornos. Los métodos son particularmente adecuados para tratar, prevenir o diagnosticar trastornos de órganos y microvasculares agudos o crónicos inflamatorios e impulsados por el sistema inmunitario.

Las proteínas de fusión terapéuticas de la invención, aunque no se limitan a, son útiles para el tratamiento, prevención o mejora de lesiones orgánicas inflamatorias agudas y crónicas, en

particular lesiones inflamatorias en las que existen mecanismos de depuración homeostáticos endógenos o vías de eferocitosis para la eliminación de células moribundas, fragmentos de células y las micropartículas protrombóticas/proinflamatorias están significativamente reguladas por disminución. Ejemplos de lesiones de órganos inflamatorias agudas incluyen infarto de miocardio, lesión renal aguda (AKI), accidente cerebrovascular agudo e inflamación y lesiones de órganos resultantes de isquemia/reperfusión tales como isquemia/reperfusión del tracto gastrointestinal, hígado, bazo, pulmón, riñón, páncreas, corazón, cerebro, médula espinal y/o extremidad aplastada.

Las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción también pueden ser útiles para el diagnóstico, tratamiento, prevención o mejora de la inhibición o ralentización de la coagulación sanguínea, tratamiento del microbioma, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), captación de ácidos grasos y/o disminución de la motilidad gástrica, trastornos dependientes de microtrombina, aterosclerosis, remodelación cardíaca, fibrosis tisular, lesión hepática aguda, enfermedades hepáticas crónicas, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedades vasculares, trastornos vasculares relacionados con la edad, enfermedades intestinales, sepsis, trastornos óseos, cáncer, talasemia, pancreatitis, hepatitis, endocarditis, neumonía, lesión pulmonar aguda, osteoartritis, periodontitis, inflamación inducida por traumatismo tisular, colitis, diabetes, shock hemorrágico, rechazo de trasplante, daño inducido por radiación, esplenomegalia, AKI inducida por sepsis o insuficiencia multiorgánica, quemaduras agudas, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, cicatrización de heridas, reparación de tendones y enfermedades neurológicas.

En una modalidad, las enfermedades neurológicas se pueden seleccionar entre afecciones que tienen un componente neuropsiquiátrico, neuroinflamatorio y/o neurodegenerativo que incluye síntomas tales como síndromes de enfermedad, náuseas, evitación pasiva, supresión de la agilidad conductual, alteración de la memoria y disfunción de la memoria. Ejemplos de enfermedades neurológicas incluyen enfermedades neurológicas relacionadas con la beta amiloide, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la depresión.

En una modalidad, los trastornos óseos pueden seleccionarse de afecciones que incluyen osteoporosis, osteomalacia, osteoesclerosis y osteopetrosis. Más particularmente, la administración de una proteína de fusión de la presente descripción puede inhibir la expresión de al menos un marcador de osteoclasto, tal como NFATc1, catepsina K e integrina $\alpha\beta3$. En una modalidad, la administración inhibe la osteoclastogénesis. En otra modalidad, la administración inhibe la osteoclastogénesis inducida por RANKL. En otra modalidad más, la administración inhibe la resorción ósea. En incluso otra modalidad, la administración inhibe la expresión de al menos un estimulador de resorción ósea, tal como un estimulador de resorción ósea que comprende TNF,

IL-6, IL-17A, MMP-9, Ptgs2, RANKL, Tnfsf11, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 y combinaciones de los mismos. En otra modalidad, la administración inhibe la expresión de al menos una citoquina proinflamatoria seleccionada del grupo que consiste en IL-8 y CCL2/MCP-1.

En una modalidad, la fibrosis tisular puede ser fibrosis en el hígado, pulmón, diafragma, riñón, cerebro, corazón en la que la proteína de fusión de la invención reduce la expresión de colágeno. En una modalidad, la fibrosis pulmonar es fibrosis pulmonar intersticial (IPF). En una modalidad, la fibrosis hepática es cirrosis hepática, que puede o no ser atribuible a NASH.

Múltiples enfermedades respiratorias se caracterizan por la acumulación de células apoptóticas. Además, la eferocitosis defectuosa y la fagocitosis por macrófagos en el trastorno pulmonar obstructivo crónico (EPOC) se asocian con exacerbaciones y gravedad. Las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción también pueden ser útiles para el diagnóstico, tratamiento, prevención o mejora de enfermedades respiratorias, tales como el síndrome de dificultad respiratoria aguda o COPD. Las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción también pueden ser útiles para el diagnóstico, tratamiento, prevención o mejora de la lesión pulmonar aguda (ALI), por ejemplo lesión pulmonar inducida por inhalación o aspiración de compuestos o fármacos tóxicos exógenos o endógenos; lesión pulmonar causada por edema pulmonar, shock, pancreatitis, quemaduras, traumatismos del tórax o politraumatismos, radiación, sepsis, patógenos (bacterias, virus o parásitos como plasmodios); Enfermedades por insuficiencia pulmonar crónica que provocan hipoxemia.

Las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción también pueden ser útiles para el diagnóstico, tratamiento, prevención o mejora de la gravedad de la lesión pulmonar causada por virus del tipo Corona, por ejemplo SARS-CoV, SARS-CoV-2 o MERS-CoV. En una modalidad, las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción se proporcionan para su uso en el tratamiento de la infección por SARS-CoV-2 en pacientes con COVID 19.

Las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción también pueden ser útiles para el diagnóstico, tratamiento, prevención o mejora de la gravedad de la insuficiencia pulmonar asociada a transfusión (TRALI).

Las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción también pueden ser útiles para el diagnóstico, tratamiento, prevención o mejora de la gravedad de enfermedades de insuficiencia pulmonar crónica que conducen a hipoxemia.

Las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción, por ejemplo las proteínas de fusión terapéuticas contienen un dominio de EDIL3 de la descripción, también pueden ser útiles para el

diagnóstico, tratamiento, prevención o mejora de la gravedad de las adherencias peritoneales posoperatorias.

Las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción también pueden ser útiles para el diagnóstico, tratamiento, prevención o mejora de la gravedad de la insuficiencia cardíaca.

Las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción también pueden ser útiles para el diagnóstico, tratamiento, prevención o mejora de la gravedad de la hemodiálisis.

Las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción también pueden ser útiles para el diagnóstico, el tratamiento, la prevención o la mejora de la gravedad de la función retardada del injerto o de la enfermedad del injerto contra el huésped.

Las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción también pueden ser útiles para el diagnóstico, tratamiento, prevención o mejora de la gravedad de congelaciones graves, pie de trinchera, pioderma gangrenoso/gangrena.

Las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción también pueden ser útiles para el diagnóstico, tratamiento, prevención o mejora de la gravedad de patologías inducidas por bacterias, hongos, virus o parásitos (por ejemplo, sepsis u otras patologías inducidas directamente por los patógenos como en ántrax, plaga, infecciones necrotizantes de tejidos blandos (NSTI como fascitis necrotizante, osteomielitis, malaria).

Las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción también pueden ser útiles para el diagnóstico, tratamiento, prevención o mejora de la gravedad del trauma/politraumatismo causado por accidentes que causan lesiones, como accidentes laborales, caídas, accidentes de tráfico, lesiones balísticas y de combate u otros mecanismos de lesión.

Las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción también pueden ser útiles para el diagnóstico, tratamiento, prevención o mejora de la gravedad de la patología mediada por osteoclastos.

Las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción se pueden administrar como el único ingrediente activo o junto con, por ejemplo como adyuvante o en combinación con otros fármacos, por ejemplo agentes inmunosupresores o inmunomoduladores u otros agentes antiinflamatorios o por ejemplo agentes citotóxicos o anticancerígenos, por ejemplo para el tratamiento o prevención de las enfermedades mencionadas anteriormente.

Administrado 'en combinación', en referencia a un agente terapéutico adicional, significa que se administran dos (o más) tratamientos diferentes al sujeto durante el curso de la aflicción del sujeto con el trastorno, por ejemplo, los dos o más tratamientos se administran después de que el sujeto se ha diagnosticado con el trastorno y antes de que el trastorno se haya curado o eliminado o el tratamiento haya cesado por otras razones. En algunas modalidades, la

administración de un tratamiento todavía se está produciendo cuando comienza la administración del segundo, de modo que hay superposición en términos de administración. Esto a veces se denomina en el presente documento "administración simultánea" o "administración concurrente". En otras modalidades, la administración de un tratamiento termina antes de que comience la administración del otro tratamiento. En algunas modalidades de cualquier caso, el tratamiento es más eficaz debido a la administración combinada. Por ejemplo, el segundo tratamiento es más efectivo, por ejemplo, se observa un efecto equivalente con menos del segundo tratamiento, o el segundo tratamiento reduce los síntomas en mayor medida que lo que se vería si el segundo tratamiento se administrara en ausencia del primer tratamiento, o la situación análoga se ve con el primer tratamiento. En algunas modalidades, la administración es tal que la reducción de un síntoma u otro parámetro relacionado con el trastorno es mayor de lo que se observaría con un tratamiento administrado en ausencia del otro. El efecto de los dos tratamientos puede ser parcialmente aditivo, totalmente aditivo o mayor que aditivo. La administración puede ser tal que un efecto del primer tratamiento administrado aún sea detectable cuando se administra el segundo.

El término 'concurrentemente' no se limita a la administración de terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) exactamente al mismo tiempo, sino que significa que una composición farmacéutica que comprende proteínas de fusión terapéuticas de las mismas de la presente descripción se administra a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que las proteínas de fusión puedan actuar junto con el agente o agentes terapéuticos adicionales para proporcionar un mayor beneficio que si se administraran de otro modo. Por ejemplo, cada terapia puede administrarse a un sujeto al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes momentos; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse lo suficientemente cerca en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada terapia se puede administrar a un sujeto por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada.

Una proteína de fusión terapéutica como se describe en el presente documento, y el agente o agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar simultáneamente, en la misma composición farmacéutica o en una composición separada que la proteína de fusión descrita, o secuencialmente. Para la administración secuencial, la proteína de fusión como se describe en el presente documento, se puede administrar en primer lugar y el agente adicional se puede administrar en segundo lugar, o se puede invertir el orden de administración. El agente o agentes

terapéuticos adicionales pueden administrarse a un sujeto por la misma o diferentes vías de administración en comparación con la proteína de fusión.

La proteína de fusión terapéutica como se describe en este documento, y/o agente o agentes, procedimientos o modalidades terapéuticas adicionales se pueden administrar durante períodos de trastorno activo, o durante un período de remisión o enfermedad menos activa. La proteína de fusión terapéutica, como se describe en el presente documento, se puede administrar antes del otro tratamiento, al mismo tiempo que el tratamiento, después del tratamiento o durante la remisión del trastorno.

Cuando se administra en combinación, la proteína de fusión terapéutica como se describe en este documento, y el agente terapéutico adicional (por ejemplo, el segundo o tercer agente), o todos, pueden administrarse en una cantidad o dosis que es mayor, menor o igual que la cantidad o dosis de cada agente utilizado individualmente, por ejemplo, como monoterapia. En ciertas modalidades, la proteína de fusión terapéutica como se describe en el presente documento, el agente adicional (por ejemplo, segundo o tercer agente), o todos, es menor (por ejemplo, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50%) que la cantidad o dosis de cada agente utilizado individualmente, por ejemplo, como monoterapia. En otras modalidades, la cantidad o dosis de la proteína de fusión terapéutica como se describe en este documento, el agente adicional (por ejemplo, el segundo o tercer agente), o todos, que da como resultado un efecto deseado (por ejemplo, el tratamiento de una enfermedad o afección inflamatoria) es menor (por ejemplo, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50% menor) que la cantidad o dosis de cada agente utilizado individualmente, por ejemplo, como monoterapia, necesaria para lograr el mismo efecto terapéutico.

Por ejemplo, las proteínas de fusión terapéuticas de la descripción se pueden utilizar en combinación con DMARD, por ejemplo sales de oro, sulfasalazina, antimaláricos, metotrexato, D-penicilamina, azatioprina, ácido micofenólico, tacrolimus, sirolimus, minociclina, leflunomida, glucocorticoides; un inhibidor de calcineurina, por ejemplo ciclosporina A o FK 506; un modulador de la recirculación de linfocitos, por ejemplo análogos FTY720 y FTY720; un inhibidor de mTOR, por ejemplo rapamicina, 40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina, CCI779, ABT578, AP23573 o Tafa-93; una ascomicina que tiene propiedades inmunosupresoras, por ejemplo ABT-281, ASM981, etc.; corticosteroides; ciclofosfamida; azatioprina; leflunomida; mizoribina; micofenolato de mofetilo; 15-desoxispergualina o sus homólogo, análogo o derivado inmunosupresor; anticuerpos monoclonales inmunosupresores, por ejemplo, anticuerpos monoclonales para receptores de leucocitos, por ejemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD40, CD45, CD58, CD80, CD86 o sus ligandos; otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo una molécula de

unión recombinante que tiene al menos una parte del dominio extracelular de CTLA4 o un mutante del mismo, por ejemplo una porción al menos extracelular de CTLA4 o un mutante del mismo unido a una secuencia de proteína que no es CTLA4, por ejemplo CTLA4Ig (por ejemplo, denominado ATCC 68629) o un mutante del mismo, por ejemplo LEA29Y; inhibidores de moléculas de adhesión, por ejemplo antagonistas de LFA-1, antagonistas de ICAM-1 o -3, antagonistas de VCAM-4 o antagonistas de VLA-4; o un agente quimioterapéutico, por ejemplo paclitaxel, gemcitabina, cisplatino, doxorubicina o 5-fluoruracilo; agentes anti TNF, por ejemplo anticuerpos monoclonales contra TNF, por ejemplo infliximab, adalimumab, CDP870 o constructos de receptores para TNF-RI o TNF-RII, por ejemplo Etanercept, PEG-TNF-RI; bloqueadores de citocinas proinflamatorias, bloqueadores de IL-1, por ejemplo Trampa de Anakinra o IL-1, canakinumab, bloqueadores de IL-13, bloqueadores de IL-4, bloqueadores de IL-6; bloqueadores de quimiocinas, por ejemplo, inhibidores o activadores de proteasas, por ejemplo metaloproteasas, anticuerpos anti-IL-15, anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos anti-IL-4, anticuerpos anti-IL-13, anticuerpos anti-CD20, AINE, tales como aspirina o un agente antiinfeccioso; antagonistas del patrón molecular asociado al daño (DAMP) o del patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), por ejemplo convertidores, desintoxicantes, removedores, por ejemplo convertidores de ATP, moduladores de HMGB-1, desintoxicantes de histonas; inhibidores de respuestas inmunes inducidas por superantígenos; inhibidores del complemento y dispositivos de plasmaféresis extracorporeal.

Kits

También dentro del alcance de la invención están los kits que consisten en las composiciones, por ejemplo, proteínas de fusión terapéuticas de la descripción e instrucciones de uso. Dichos kits comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de acuerdo con la divulgación. Además, dichos kits pueden comprender medios para administrar la proteína de fusión terapéutica (por ejemplo, un autoinyector, una jeringa y un vial, una jeringa precargada, una pluma precargada) e instrucciones de uso. Estos kits pueden contener agentes terapéuticos adicionales (descritos más adelante) para tratar a un paciente que tiene una enfermedad autoinmune o un trastorno inflamatorio o AOI. Dichos kits también pueden comprender instrucciones para la administración de la proteína de fusión terapéutica para tratar al paciente. Dichas instrucciones pueden proporcionar la dosis, la vía de administración, el régimen y la duración total del tratamiento para su uso con la proteína de fusión incluida. Los kits suelen incluir una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier escritura o material grabado suministrado en o con el kit, o que de otro modo acompañe al kit. El

kit puede comprender además herramientas para diagnosticar si un paciente pertenece a un grupo que responderá al tratamiento con una proteína de fusión terapéutica de la presente invención, como se define anteriormente.

Modalidades

La presente descripción proporciona las siguientes modalidades:

1. Una proteína de fusión terapéutica para potenciar la eferocitosis que comprende un dominio de unión a integrina, un dominio de unión a fosfatidilserina (PS) y un dominio de solubilización, donde el dominio de solubilización se inserta entre el dominio de unión a integrina y el dominio de unión a PS, y en donde el dominio de unión a PS es una variante truncada.
2. La proteína de fusión de la modalidad 1, en donde el dominio de unión a PS es una variante truncada de al menos un dominio de unión a PS enumerado en la Tabla 2.
3. La proteína de fusión de la modalidad 1 o la modalidad 2, en donde el dominio de unión a PS es una variante truncada del motivo de unión a PS de MFG-E8 o de EDIL3.
4. La proteína de fusión de la modalidad 3, en donde el dominio de unión a PS es una variante truncada del motivo de unión a PS de MFG-E8.
5. La proteína de fusión de la modalidad 4, en donde el dominio de unión a PS es un dominio discoidina.
6. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el dominio de unión a PS es un dominio C1.
7. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el dominio de unión a PS no comprende un dominio C2.
8. Una proteína de fusión para potenciar la eferocitosis que comprende un dominio de unión a integrina, un dominio de unión a fosfatidilserina (PS) y un dominio de solubilización, en donde el dominio de solubilización se inserta entre el dominio de unión a integrina y el dominio de unión a PS, y en donde el dominio de unión a PS es un dominio C1.
9. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el dominio de unión a la integrina se une a una o más integrinas.
10. La proteína de fusión de la modalidad 9, en donde el dominio de unión a integrina se une a la integrina $\alpha v\beta 3$ y/o $\alpha v\beta 5$ y/o $\alpha 8\beta 1$.
11. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el dominio de unión a integrina comprende un motivo arginina–glicina–ácido aspártico (RGD).
12. Una proteína de fusión terapéutica de fórmula EGF – S – C (Fórmula I), en donde
 - (i) EGF es un dominio de unión a integrina, en donde el dominio de unión a integrina

se une a una o más integrinas,

- (ii) S es un dominio de solubilización, y
- (iii) C es un dominio de unión a PS truncado.

13. La proteína de fusión terapéutica de la modalidad 12, en donde el dominio de unión a integrina se une a la integrina $\alpha v\beta 3$ y/o $\alpha v\beta 5$ y/o $\alpha 8\beta 1$.
14. La proteína de fusión terapéutica de la modalidad 12 o la modalidad 13, en donde el dominio de unión a integrina comprende un motivo de arginina–glicina–ácido aspártico (RGD).
15. La proteína de fusión terapéutica de una cualquiera de las modalidades 12 a 14, en donde el dominio de unión a integrina es un dominio similar a EGF de MFG–E8, EDIL3 o una proteína que comprende un dominio de unión a integrina enumerado en la Tabla 1.
16. La proteína de fusión terapéutica de una cualquiera de las modalidades 12 a 15, en donde el dominio de unión a PS truncado es una variante truncada de un dominio de unión a PS que se enumera en la Tabla 2.
17. La proteína de fusión terapéutica de una cualquiera de las modalidades 12 a 16, en donde el dominio de unión a PS es una variante truncada del motivo de unión a PS de MFG–E8 o de EDIL3.
18. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 12 a 16, en donde el dominio de unión a PS es una variante truncada del motivo de unión a PS de MFG–E8.
19. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 12 a 18, en donde el dominio de unión a PS es un dominio de discoidina.
20. La proteína de fusión terapéutica de una cualquiera de las modalidades 11 a 16, en donde el dominio de unión a PS truncado comprende cualquiera de los dominios C1 y/o dominio C2 de un dominio de unión a PS que se enumera en la Tabla 2.
21. La proteína de fusión terapéutica de una cualquiera de las modalidades 11 a 18, en donde el dominio de unión a PS truncado es un dominio C1.
22. La proteína de fusión terapéutica de una cualquiera de las modalidades 11 a 21, en donde el dominio de unión a PS truncado no comprende un dominio C2.
23. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el dominio de solubilización se une directamente al dominio de unión a integrina, al dominio de unión a PS o a ambos dominios.
24. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el dominio de solubilización está unido indirectamente al dominio de unión a integrina y/o al dominio de unión a PS mediante un ligador.
25. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el dominio

de unión a integrina tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, o al menos un 90% de identidad de secuencia con la misma.

26. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el dominio de unión a integrina tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77 o al menos un 90% de identidad de secuencia con la misma.

27. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el dominio de unión a la integrina tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de: SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100 o SEQ ID NO: 101; o al menos un 90% de identidad de secuencia con la misma.

28. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el dominio de unión a PS tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141 o SEQ ID NO: 142; o al menos un 90% de identidad de secuencia con la misma.

29. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el dominio de unión a PS tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, o al menos un 90% de identidad de secuencia con la misma.

30. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el dominio de solubilización es HSA y tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o al menos un 90% de identidad de secuencia con la misma.

31. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades anteriores que comprende en secuencia: un dominio de unión a integrina–dominio de unión a HSA–PS.

32. Una proteína de fusión terapéutica que comprende MFG–E8 y un dominio de solubilización, en donde MFG–E8 comprende desde el N–terminal al C–terminal: un dominio similar a EGF, un dominio C1 o un dominio C2, y comprende una secuencia de MFG–E8 humana de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) o una variante funcional de la misma.

33. La proteína de fusión de la modalidad 32, en donde el dominio de solubilización se inserta entre el dominio similar a EGF y el dominio C1 o C2.

34. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el dominio de solubilización es HSA, HSA D3 o Fc–IgG, o una variante funcional de los mismos.

35. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades anteriores en donde el dominio de solubilización comprende albúmina de suero humano (HSA), o una variante funcional de la misma.

36. Una proteína de fusión, en donde la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34, o al menos un 90% de identidad de secuencia con la misma.

37. Una proteína de fusión, en donde la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos

de la SEQ ID NO: 36, o al menos un 90% de identidad de secuencia con la misma.

38. Una proteína de fusión, en donde la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de: SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 o SEQ ID NO: 147; o al menos un 90% de identidad de secuencia con la misma.

39. Una proteína de fusión, en donde la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147, o al menos un 90% de identidad de secuencia con la misma.

40. La proteína de fusión de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicha proteína de fusión:

a. restaura la eferocitosis alterada de macrófagos en un ensayo de eferocitosis de macrófagos-neutrófilos humanos;

b. reduce el número de micropartículas plasmáticas por depuración en un ensayo de eferocitosis de micropartículas endoteliales humanas; y/o

c. protege contra la lesión multiorgánica en un modelo de isquemia renal aguda;

d. mejora la carga de enfermedad en un modelo de fibrosis hepática.

41. Un ácido nucleico aislado que codifica la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las modalidades 36 a 39.

42. Un vector de clonación o expresión que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la modalidad 41.

43. Un vector viral que comprende el ácido nucleico aislado de acuerdo con la modalidad 41, de modo preferente el vector viral que comprende el ácido nucleico aislado de acuerdo con la modalidad 41 se deriva de AAV.

44. El vector viral de acuerdo con la modalidad 43, en donde el vector se administra a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, que lo necesite.

45. El vector viral de acuerdo con la modalidad 43, para su uso en el tratamiento y/o prevención de las enfermedades enumeradas en el presente documento.

46. Una célula huésped recombinante adecuada para la producción de una proteína de fusión terapéutica, que comprende uno o más vectores de clonación o expresión de acuerdo con la modalidad 42 y opcionalmente, señales de secreción.

47. La célula huésped recombinante de la modalidad 46, en donde la célula huésped es por ejemplo una célula procariota, de levadura, de insecto o de mamífero.

48. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la expresión de la proteína en una célula huésped da como resultado un rendimiento de al menos 10

mg/L.

49. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la expresión de la proteína en una célula de mamífero da como resultado un aumento en el rendimiento de al menos 100 veces con respecto a MFG–E8 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1).

50. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 1 a 40 y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

51. Un método de tratamiento o prevención de un trastorno inflamatorio o lesión orgánica inflamatoria en un individuo que lo necesita, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de cualquiera de las modalidades 1 a 40.

52. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 1 a 40 para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno inflamatorio o lesión orgánica inflamatoria en un individuo que lo necesite.

53. El método de la modalidad 51 o el uso de la modalidad 52, en donde el trastorno inflamatorio o lesión orgánica inflamatoria es lesión renal aguda, sepsis, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular agudo, quemaduras, lesión traumática y lesiones orgánicas e inflamatorias resultantes de isquemia/reperfusión. .

54. El método de la modalidad 51 o el uso de la modalidad 52, en donde la proteína de fusión se administra en combinación con otro agente terapéutico.

55. El método o uso de la modalidad 54, en donde el otro agente terapéutico es un agente inmunosupresor, un agente inmunomodulador, un agente antiinflamatorio, un antioxidante, un agente antiinfeccioso, un agente citotóxico o un agente anticanceroso. .

56. Una proteína de fusión terapéutica que comprende MFG–E8 y un dominio de solubilización, en donde MFG–E8 comprende desde el N–terminal al C–terminal: un dominio similar a EGF, un dominio C1 o un dominio C2, y comprende una variante funcional de la secuencia de MFG–E8 humana de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1).

57. La proteína de fusión de la modalidad 56, en donde el dominio de solubilización se inserta entre el dominio similar a EGF y el dominio C1.

58. La proteína de fusión de la modalidad 56, en donde el dominio de solubilización se inserta entre el dominio similar a EGF y el dominio C2.

59. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 56 a 58, en donde el dominio de solubilización es HSA, HSA D3 o Fc–IgG, o una variante funcional de los mismos.

60. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 56 a 59, en donde la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID enumerada en la Tabla

4.

61. Un ácido nucleico aislado que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 56 a 60.

62. Un vector viral que comprende el ácido nucleico aislado de acuerdo con la modalidad 61, de modo preferente el vector viral que comprende el ácido nucleico aislado de acuerdo con la modalidad 60 se deriva de AAV.

63. El vector viral de acuerdo con la modalidad 62, en donde el vector se administra a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, que lo necesite.

64. El vector viral de acuerdo con la modalidad 62, para su uso en el tratamiento y/o prevención de las enfermedades enumeradas en el presente documento.

65. Un vector de clonación o expresión que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la modalidad 61.

66. Una célula huésped recombinante adecuada para la producción de una proteína de fusión terapéutica, que comprende uno o más vectores de clonación o expresión de acuerdo con la modalidad 65 y, opcionalmente, señales de secreción.

67. La célula huésped recombinante de la modalidad 66, en donde la célula huésped es por ejemplo una célula procariota, de levadura, de insecto o de mamífero.

68. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 56 a 60, en donde la expresión de la proteína en una célula huésped da como resultado un rendimiento de al menos 10 mg/L.

69. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 56 a 60, en donde la expresión de la proteína en una célula de mamífero da como resultado un aumento en el rendimiento de al menos 100 veces con respecto a MFG-E8 de tipo salvaje.

Debe entenderse que cada modalidad puede combinarse con una o más de otras modalidades, en la medida en que dicha combinación sea coherente con la descripción de las modalidades. Debe entenderse además que se entiende que las modalidades proporcionadas anteriormente incluyen todas las modalidades, incluyendo tales modalidades como resultado de combinaciones de modalidades.

Todas las referencias citadas en este documento, incluidas patentes, solicitudes de patente, artículos, publicaciones, libros de texto y similares, y las referencias citadas en el mismo, en la medida en que aún no lo estén, se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la descripción pero no para limitar su alcance. Otras variantes de la descripción serán evidentes para un experto en la técnica y están incluidas en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Generación de proteínas de fusión

MFG-E8 es una proteína de múltiples dominios que consta de un dominio de factor de crecimiento epidérmico N-terminal (similar a EGF) y dos dominios C-terminales de tipo C de lectina (C1 y C2). Los intentos de producir proteína humana recombinante de longitud completa, como se documenta en la literatura, han demostrado que los agregados de proteínas y las tasas de expresión son muy bajas (Castellanos *et al.*, (2016) Protein Expression Purification 1124: 10–22). Por lo tanto, para intentar solubilizar la proteína y potenciar su expresión, investigamos el efecto de fusionar varias proteínas a MFG-E8.

Un dominio de solubilización (SD) derivado de Fc-IgG1 humano, albúmina de suero humano (HSA) y el dominio 3 de HSA (HSA D3) se fusionaron en diferentes posiciones a MFG-E8; en el extremo N o C, o entre el EGF y los dominios C1 o C1 y C2, como se muestra esquemáticamente en la Figura 1. Además, las fusiones a Fc-IgG1 o HSA tienen el potencial de extender la vida media de la molécula *in vivo*, dado que estas proteínas se unen a FcRn. La fusión de MFG-E8 a Fc-IgG1 o HSA también puede mejorar la producción y solubilidad (Castellanos *et al.*, (2016) *supra*) de la proteína de fusión como se muestra en los siguientes ejemplos.

La Tabla 5 muestra la unión de la proteína de fusión FP330 (EGF-HSA-C1-C2; SEQ ID NO: 42) que comprende un inserto de HSA, al receptor Fc neonatal humano (véase también el Ejemplo 5.1).

Tabla 5: Afinidad de unión de la proteína de fusión FP330 al FcRn humano

Muestra	FcRn humano (pH 5,8)		FcRn humano (pH 7,4)	
	K _D (nM)	n	K _D (nM)	n
FP330 (SEQ ID NO: 42)	1380 ± 95	2	Sin unión	1

Ejemplo 2: Generación de fusiones HSA wtMFG–E8 y MFG–E8; expresión y purificación

Los métodos para la generación de proteínas de fusión se describen a continuación; en resumen, las fusiones de MFG–E8 y MFG–E8 y las fusiones de EDIL, en particular las fusiones a HSA, se generaron de acuerdo con el siguiente método.

El ADN se sintetizó en GeneArt (Regensburg, Alemania) y se clonó en un vector de expresión de mamífero utilizando técnicas de clonación basadas en ligadura de enzimas de restricción. El plásmido resultante se transfectó en células HEK293T. Para la expresión transitoria de proteínas, los vectores para cadenas de tipo salvaje o manipuladas se transfectaron en células HEK293T adaptadas a la suspensión utilizando polietilenimina (PEI; Cat# 24765 Polysciences, Inc.). Típicamente, se transfectaron 100 mL de células en suspensión a una densidad de 1–2 millones de células por mL con ADN que contenía 100 µg de vectores de expresión que codifican las cadenas manipuladas. A continuación, se introdujeron los vectores de expresión recombinantes en las células huésped y se produjo el constructo mediante el cultivo adicional de las células durante un período de 7 días para permitir la secreción en el medio de cultivo (HEK, medio libre de suero) suplementado con ácido plurónico al 0,1%. Glutamina 4 mM y 0,25 µg/mL de antibiótico.

A continuación, los constructos producidos se purificaron a partir del sobrenadante libre de células, utilizando cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC) o cromatografía de captura de proteína A o de captura anti–HSA.

Cuando la proteína marcada con his fue capturada por IMAC, el medio acondicionado filtrado se mezcló con resina IMAC (GE Healthcare), se equilibró con tritón al 1% y NaPO₄ 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, pH 7,0. La resina se lavó tres veces con volúmenes de columna 15 de NaPO₄ 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 20 mM, pH 7,0 antes de eluir la proteína con volúmenes de columna 10 de buffer de elución (NaPO₄ 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 500 mM, pH 7,0).

Cuando la proteína se capturó mediante cromatografía de proteína A o anti–HSA, el medio acondicionado filtrado se mezcló con resina de proteína A (CaptivA PriMab™, Repligen) o resina anti–HSA (matriz de afinidad de albúmina humana Capture Select, Thermo), equilibrada con PBS, pH 7,4. La resina se lavó tres veces con volúmenes de columna 15 de PBS, pH 7,4 antes de eluir la proteína con volúmenes de columna 10 de buffer de elución (citrato 50 mM, NaCl 90 mM, pH 2,5) y se neutralizó el pH utilizando TRIS 1 M pH 10,0.

Finalmente, las fracciones eluidas se pulieron utilizando cromatografía de exclusión por tamaño (HiPrep Superdex 200, 16/60, GE Healthcare Life Sciences) y se analizaron mediante

SDS–PAGE frente a un marcador Precision Plus Protein Unstained Standards (Biorad, ref # 161–0363).

En la Figura 2 se muestran geles de expresión representativos para las proteínas de fusión: Figura 2A: proteína EGF–HSA–C1–C2 (FP330; SEQ ID NO: 42); Fig. 2B: EGF–HSA–C1–C2 de la proteína EDIL3 (FP050; SEQ ID NO: 12); Fig 2C: proteína EGF–Fc (KiH) C1–C2 no reducida y reducida. Esta proteína es un heterodímero de FP071 (EGF–Fc (botón)–C1–C2; SEQ ID NO: 18) con el ojal Fc–IgG1 (SEQ ID NO: 10); Fig. 2D: proteína EGF–HSA–C1 (FP260; SEQ ID NO: 34). La proteína en condiciones reducidas y no reducidas se muestra en la Fig. 2C porque los heterodímeros tienden a deshacerse en condiciones reductoras, por lo que se probaron ambas condiciones. Los resultados de la expresión y el rendimiento después de la purificación para un conjunto adicional de proteínas de fusión se muestran en la Tabla 6; Como puede verse a partir de los datos de expresión, las fusiones de HSA de MFG–E8, incluso con HSA en diferentes posiciones, muestran al menos una mejora de 100 veces en la expresión sobre wtMFG–E8. Como se muestra en la columna de la derecha de la Tabla 6, las fusiones HSA de MFG–E8 también muestran un aumento en el rendimiento de al menos 100 veces con respecto a wtMFG–E8.

Tabla 6: Expresión y rendimiento de proteínas de fusión expresadas en una línea celular HEK

Proteína	Expresión posterior a captura de His (mg/L)	Rendimiento final después de His y SEC (mg/L)
wtMFG–E8	0,2	0,04
FP220 (HSA–EGF–C1–C2)	23	5,5
FP110 (EGF–C1–C2–HSA)	34	7,8
FP330 (EGF–HSA–C1–C2)	23	4,0

Otros ejemplos de proteínas de fusión terapéuticas de la descripción se generaron de acuerdo con el método anterior y se analizaron adicionalmente mediante SDS–PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio), donde las proteínas se separaron en base a su peso molecular. Cada proteína se mezcló con buffer Laemmli antes de cargar en gel de poliacrilamida (Biorad, 4–20% Mini–PROTEAN TGX Stain free). Después de 30 min de migración a 200 V en tampón de ejecución TRIS–Glicina–SDS, las proteínas contenidas en el gel se revelaron en un generador de imágenes disponible sin manchas (Biorad, Gel Doc EZ).

Como se describe en la Figura 2E, SDS–PAGE muestra proteínas recombinantes que se han producido y purificado:

Línea 1, 12:	Marcador de peso molecular (Biorad, Precision plus protein)		
Línea 2:	His6_EGF[MFG-E8]_C1[MFG-E8]		23,87kDa
Línea 3:	EGF[MFG-E8]_C1[MFG-E8]_His6	SEQ ID 115	23,87kDa
Línea 4:	EGF[MFG-E8]_HSA_C1[MFG-E8]	SEQ ID 117	90,38kDa
Línea 5:	EGF[MFG-E8]_HSA_C1[MFG-E8]	SEQ ID 74	89,27kDa
Línea 6:	EGF[MFG-E8]_HSA_C1[MFG-E8]	SEQ ID 73	88,72kDa
Línea 7:	EGF[EDIL3]_HSA_C1[EDIL3]	SEQ ID 71	98,22kDa
Línea 8:	EGF[EDIL3]_HSA_C2[EDIL3]	SEQ ID 135	98,20kDa
Línea 9:	EGF[MFG-E8]_HSA_C2[MFG-E8]	SEQ ID 137	88,45kDa
Línea 10:	EGF[EDIL3]_HSA_C1_C2[MFG-E8]	SEQ ID 80	115,67kDa
Línea 11:	EGF[MFG-E8]_HSA_C1_C2[EDIL3]	SEQ ID 82	107,32kDa

Ejemplo 3: Caracterización de proteínas diseñadas MFG–E8–HSA

3.1 Unión de fosfatidilserina (bioquímica)

Se disolvió L– α –fosfatidilserina (cerebro, porcino, Avanti 840032, Alabama, EE. UU.) En cloroformo, se diluyó en metanol y se recubrieron placas de microtitulación de 384 pocillos (Corning™ 3653, Kennebunk ME, EE. UU.) a 1 μ g/mL. Después de la incubación durante la noche a 4°C, el solvente se evaporó utilizando un sistema SpeedVac™ (Thermo Scientific™). Las placas se trataron con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) que contenía albúmina de suero bovino (BSA) libre de ácidos grasos al 3% a TA durante 1,5 h.

La unión de proteínas de fusión a L– α –fosfatidilserina se evaluó compitiendo contra la unión de lactadherina/MFG–E8 murina biotinilada (producida internamente, mMFG–E8: biotina). Las proteínas se diluyeron en PBS que contenía BSA libre de ácidos grasos al 3%, pH 7,4 y se incubaron con placas de microtitulación recubiertas con L– α –fosfatidilserina durante 30 min. mMFG–E8: biotina se agregó en PBS que contenía BSA libre de ácidos grasos al 3%, pH 7,4 a 1 nM y se incubó durante 30 min más. MMFG–E8 no unido: biotina se eliminó la mediante tres pasos de lavado con buffer de lavado de inmunoensayo de fluorescencia de lantánidos potenciada por disociación (DELFIATM) (Perkin Elmer 1244–114 MA, US). Se agregó estreptavidina marcada con europio (Perkin Elmer 1244–360, Wallac Oy, Finlandia) en buffer de ensayo DELFIATM (Perkin Elmer 1244–111 MA, EE.UU.) a TA durante 20 min. A esto le siguieron tres pasos de lavado con buffer de ensayo DELFIATM. El europio se reveló de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Perkin Elmer 1244–105, Boston MA, EE. UU.). La fluorescencia resuelta en el tiempo del europio

se cuantificó con un lector de placas de etiquetas múltiples Envision™ 2103, Perkin Elmer, CT, EE. UU.). El análisis de los datos se realizó utilizando el software MS Excel y GraphPad Prism.

Las placas de polipropileno son placas de microtitulación de baja unión a proteínas que se utilizan normalmente en los laboratorios para diluciones en serie. En comparación con el poliestireno, estas placas tienen la ventaja de reducir la pérdida de proteínas durante las diluciones y normalmente se clasifican como placas de "baja unión a proteínas". Cuando se prepararon diluciones de wtMFG-E8 en placas de polipropileno, en comparación con las diluciones hechas en placas sin unión, wtMFG-E8 perdió potencia en el ensayo de competición de L- α -fosfatidilserina. Estos datos, como se muestra en la Figura 3, sugieren que wtMFG-E8 se pierde parcialmente durante la manipulación de líquidos y los pasos de dilución cuando se utilizan placas de polipropileno que ya se han optimizado para una baja unión a proteínas (Figura 3A). Estos resultados indican que la pegajosidad inherente de wtMFG-E8 plantea un desafío en la manipulación en el laboratorio y muy probablemente durante la fabricación y producción de fármacos, donde se requieren pasos de captura y pulido para producir la sustancia de fármaco con alto rendimiento y muy alta pureza. Por el contrario, la adherencia de la proteína manipulada FP278 (etiqueta EGF-HSA-C1-C2-His; SEQ ID NO: 44) se redujo drásticamente en comparación con wtMFG-E8 y prácticamente ninguna diferencia entre las diluciones realizadas en placas sin unión frente a placas de polipropileno se observó (Fig. 3B). Estos datos sugieren que la inserción de un dominio de solubilización en las proteínas de la presente descripción puede mejorar su manipulación técnica para mejorar el rendimiento por etapas y, por lo tanto, el rendimiento global durante el proceso de fabricación.

La evaluación de la unión de las proteínas de fusión a la L- α -fosfatidilserina se muestra en la Figura 4. La proteína FP278 derivada de MFG-E8 diseñada (etiqueta EGF-HSA-C1-C2-His; SEQ ID NO: 44) unida a PS inmovilizada y en menor grado al fosfolípido cardiolipina de una manera dependiente de la concentración (Fig. 4A). La unión de FP278 a L- α -fosfatidilserina inmovilizada o la unión a cardiolipina (1,3-bis(sn-3'-fosfatidil)-sn-glicerol) se detectó utilizando un anticuerpo contra el dominio EGF-L de wtMFG-E8. La fuerza de unión de varias proteínas de fusión recombinantes a L- α -fosfatidilserina inmovilizada se muestra en la Fig. 4B. El wtMFG-E8 humano y las proteínas de fusión FP278 (etiqueta EGF-HSA-C1-C2-His; SEQ ID NO: 44) y FP260 (EGF-HSA-C1; SEQ ID NO: 34) compitieron eficazmente con la unión de 1 nM de MFG-E8 de ratón biotinilado para inmovilizar L- α -fosfatidilserina de una manera dependiente de la concentración. Los valores de IC₅₀ obtenidos para las proteínas de fusión significan fuerzas de unión de L- α -fosfatidilserina muy similares de los dominios C1-C2 de la proteína FP278 diseñada (etiqueta EGF-HSA-C1-C2-His; SEQ ID NO: 44) en comparación con wtMFG-E8 humano.

Sorprendentemente, estos datos también sugieren que el dominio C2 humano no interactúa o solo interactúa débilmente con la L- α -fosfatidilserina como se muestra en el resultado de FP270 (EGF-HSA-C2; SEQ ID NO: 36), que junto con FP250 (EGF-HSA; SEQ ID NO: 32) no compitió en este formato de ensayo. Se probó FP100, una proteína EGF-C2-C2 (SEQ ID NO: 26) y no compitió en este formato de ensayo (no mostrado), dejando el dominio C1 como el resto de unión a PS principal en MFG-E8 humano. Este hallazgo fue sorprendente dado que una gran cantidad de literatura sugiere que el dominio C2 de MFG-E8 es el dominio principal responsable de la unión de PS (Andersen *et al.*, (2000) *Biochemistry*, 39(20): 6200–6; Shi & Gilbert (2003) *Blood*, 101: 2628–2636; Shao *et al.*, (2008) *J Biol Chem.*, 283(11): 7230–41). En conclusión, estos hallazgos demuestran que el dominio C1 es el principal dominio de unión a PS integral de las proteínas diseñadas MFG-E8 y es importante para las funciones dependientes de la unión a PS. Como tal, el dominio C1 puede ser útil para la sustitución en proteínas heterólogas para conferir unión a PS; sin embargo, la unión de PS más alta se mostró para las proteínas de fusión que contienen un dominio en tándem C1-C2 o C1-C1 (este último no se muestra).

3.2 *Ensayo de adhesión de integrina αv*

Las proteínas de fusión se diluyeron en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) pH 7,4 y se inmovilizaron 50 μ L de una solución 24 nM por adsorción (placa de 96 pocillos, Nunc Maxisorb) durante la noche (1,2 nM/pocillo). Las placas se trataron posteriormente con PBS que contenía albúmina de suero bovino (BSA) libre de ácidos grasos al 3% a TA durante 1,5 h. Se cultivaron células de linfoma que expresan integrina $\alpha v\beta 3$ (ATCC-TIB-48 BW5147.G.1.4, ATCC, EE. UU.) en RPMI 1640 suplementado con GlutaMax, HEPES 25 mM, FBS al 10%, Pen/Estrep, piruvato de Na 1 mM, β -Mercaptoetanol 50 μ M. Las células se dividieron el día antes del experimento de adhesión. Las células se marcaron con 3 μ g/mL de 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(y-6)-carboxifluoresceína, éster acetoximetílico (BCECF AM) (Thermo Fisher Scientific Inc, EE. UU.) durante 30 min. Se resuspendieron células BW5147.G.1.4 en buffer de adhesión (TBS, BSA al 0,5%, $MnCl_2$ 1 mM, pH 7,4) y se dejaron adherir 50000 células/pocillo a TA durante 40 min. Las células no adherentes se eliminaron mediante lavados repetidos con buffer de adhesión. La fluorescencia de las células adherentes se cuantificó utilizando un lector de placas de múltiples etiquetas Envision™ 2103, Perkin Elmer, EE.UU. El análisis de los datos se realizó utilizando el software MS Excel y GraphPad Prism.

La adhesión celular a la proteína de fusión FP330 inmovilizada (EGF-HSA-C1-C2; SEQ ID NO: 42) fue bloqueada completamente por el inhibidor de la integrina αv cilengitide o EDTA 10 mM que demuestra la adhesión celular dependiente de la integrina a la proteína diseñada

inmovilizada (Fig 5A) . Una mutación de un solo punto en el motivo de unión a integrina RGD (RGD> RGE) del dominio similar a EGF (FP280; SEQ ID NO: 38) resultó en la abrogación completa de la adhesión celular, lo que demuestra que un motivo de unión a RGD funcional y accesible en la proteína de fusión es esencial para la adhesión dependiente de la integrina α v (Fig. 5B). Una proteína EGF–HSA inmovilizada que carece de los dominios C1–C2, FP250 (SEQ ID NO: 32) no apoyó, o sólo marginalmente, apoyó la adhesión de células BW5147.G.1.4 a pesar de un dominio similar a EGF (Fig 5C). Este hallazgo sugiere que en las condiciones experimentales probadas, el bucle RGD en el dominio similar a EGF fusionado a HSA puede ser insuficientemente accesible para las integrinas de la superficie celular, posiblemente debido a razones estéricas. Esta perturbación no fue aparente una vez que C1, C2 o C1–C2 se fusionaron al EGF–HSA en la posición C–terminal. Las proteínas recombinantes de esta descripción, por ejemplo, FP330 promueven la adhesión celular dependiente de la integrina α v similar a wtMFG–E8 si se expresa en células CHO o células HEK (Fig. 5D).

Tomados en conjunto, estos datos demuestran que las proteínas de fusión de la presente descripción se unen a integrinas celulares, apoyan la adhesión celular dependiente de integrinas e indican que en proteínas con un inserto de dominio HSA, el dominio similar a EGF C–terminal puede beneficiarse funcionalmente de un dominio de proteína fusionado C–terminalmente para soportar la unión de integrina.

3.3 *Ensayo de eferocitosis de macrófagos y neutrófilos humanos*

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de la capa leucocitaria mediante centrifugación en gradiente Ficoll (Ficoll®–Paque PLUS, GE Healthcare, Suecia) seguida de selección negativa de monocitos utilizando un kit de aislamiento Stemcell (Stemcell 19059, Vancouver, Canadá). Los monocitos se diferenciaron en macrófagos "M0" utilizando M–CSF humano recombinante 40 ng/mL (Factor estimulante de colonias de macrófagos, R&D Systems, EE. UU.) en RPMI 1640 que contenía HEPES 25 mM, FBS al 10%, Pen/Estrep, NaPyr 1 mM, 50 μ M β –Merc durante 5 días. Un día antes de la eferocitosis, los macrófagos se marcaron con PKH26 utilizando el kit Red Fluorescent Dye Linker (Sigma MINI26, EE. UU.). Las células se resuspendieron en RPMI 1640 que contenía HEPES 25 mM, FBS al 10%, Pen/Estrep, NaPyr 1 mM, β –Merc 50 μ M y se sembraron en placas negras de 96 pocillos (Corning, EE.UU.) a 40.000 células/pocillo y se dejaron adherir durante 20h.

Neutrófilos: Se aislaron neutrófilos humanos de las capas leucocitarias mediante sedimentación de dextrano en combinación con un gradiente de densidad Ficoll™ como sigue: Se eliminó el plasma de la capa leucocitaria mediante centrifugación de la capa leucocitaria diluida.

La cosecha celular se diluyó en dextrano al 1% (de *Leuconostoc* spp. PM 450.000–650.000; Sigma, EE.UU.) y se dejó sedimentar en hielo durante 20–30 min.

Se recogieron los leucocitos del sobrenadante y en una capa Ficoll™ –Paque (GE Healthcare Suecia). Después de la centrifugación, se recogió el sedimento y se lisaron los eritrocitos restantes utilizando buffer de lisis de glóbulos rojos (RBC) (BioConcept, Suiza). Los neutrófilos se lavaron una vez en medio (RPMI 1640 + GlutaMax que contenía HEPES 25 mM, FBS al 10%, Pen/Estrep, NaPyr 0,1 mM, b–Merc 50 uM) y se mantuvieron durante la noche a 15°C. Se indujo apoptosis/muerte celular mediante el tratamiento de neutrófilos con ligando de Superfas 1 µg/mL (Enzo Life Sciences, Lausanne, Suiza) a 37°C durante 3 h. Los neutrófilos se tiñeron con Hoechst 33342 (Life Technologies, EE. UU.) durante 25 min y con DRAQ5 (eBioscience, Reino Unido, diluido 1: 2000) a 37°C en la oscuridad durante 5 min.

Ensayo de eferocitosis

Los macrófagos M0 se incubaron con las proteínas de fusión durante 30 min. Se agregaron neutrófilos marcados apoptóticos en una proporción de M0/neutrófilos 1: 4. Se visualizó la eferocitosis de neutrófilos apoptóticos por macrófagos aprovechando el aumento de la intensidad de fluorescencia de DRAQ5 tras la localización de neutrófilos en el compartimento lisosómico de pH bajo de los macrófagos M0.

La eferocitosis se cuantificó utilizando un sistema de análisis de alto contenido de campo amplio ImageXpress Micro XLS (Molecular DEVICES. CA, EE. UU.). Los macrófagos se identificaron mediante fluorescencia PKH26. El índice de eferocitosis (EI, mostrado como %) se calculó como la proporción de macrófagos que contienen al menos un evento de neutrófilos apoptóticos ingeridos (DRAQ5^{high}) con respecto al número total de macrófagos. El análisis de los datos se realizó utilizando el software MS Excel y GraphPad Prism.

El efecto de la proteína de fusión FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44) sobre la promoción de la eferocitosis de neutrófilos moribundos por macrófagos humanos se muestra en la Figura 6. Las proteínas de fusión aumentan la internalización de neutrófilos humanos moribundos marcados con pHrodo en macrófagos sobre la ya alta capacidad de eferocitosis de los macrófagos M0, que se muestra como el nivel basal. En la Figura 7 se muestra que la proteína de fusión recombinante FP278 puede rescatar la eferocitosis alterada por endotoxina (lipopolisacárido) de neutrófilos moribundos por macrófagos humanos. La Figura 7A muestra el deterioro de la eferocitosis de macrófagos de neutrófilos humanos moribundos por 100 pg/mL de lipopolisacárido (LPS) en tres donantes humanos. El panel de la izquierda muestra la respuesta

del donante individual, el panel de la derecha muestra el deterioro medio de la eferocitosis (%) de los tres donantes. La Figura 7B muestra el rescate de esta eferocitosis alterada por endotoxina (LPS) de neutrófilos moribundos por macrófagos humanos con la proteína de fusión FP278.

El rescate de la eferocitosis alterada por partículas de *S. aureus* de neutrófilos moribundos por macrófagos humanos con la proteína de fusión FP330 se muestra en la Figura 8. La Figura 8A muestra el efecto de una concentración de 100 nM de proteína de fusión en la promoción de la eferocitosis sobre el nivel de base (línea de puntos; parte izquierda de la figura), así como el efecto de la proteína de fusión 100 nM en rescatar el deterioro de la eferocitosis causado por la adición de *S. aureus* (parte derecha de la figura). La Figura 8B muestra el efecto de las concentraciones crecientes de la proteína de fusión FP278 (EC50 8 nM) sobre el rescate de la eferocitosis alterada causada por la adición de *S. aureus*, y sobre la promoción de la eferocitosis una vez que se alcanzaron los niveles básicos de eferocitosis.

3.4 Ensayo de eferocitosis endotelial humana – Jurkat

Cultivo celular

Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se obtuvieron de Lonza (Basilea, Suiza). Las células se cultivaron en matraces recubiertos con gelatina (de piel bovina, concentración final al 0,2% en PBS, dilución de solución de stock al 2%, Sigma, Alemania). Las células se cultivaron con medio de cultivo 199 (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.) suplementado con FBS al 10% (GE Healthcare, Reino Unido), Pen/Estrep al 1% (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.), Glutamax al 1% (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.) y 1 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos recombinante básico (Peprotech, Reino Unido). Las células se separaron para recolectarlas o pasarlas utilizando Accutase™ (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.).

Las células Jurkat E6–1 se obtuvieron de ATCC (American Type Culture Collection, EE. UU.) y se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.) suplementado con FBS al 10% (GE Healthcare, Reino Unido), 1% Pen/Estrep (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.), piruvato de sodio 10 mM (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.) y 10 mM de HEPES ácido (4–(2–hidroxietil)–1–piperazinetansulfónico, Thermo Fischer Scientific, EE. UU.).

Se indujo la apoptosis de las células Jurkat E6–1 utilizando TRAIL humano recombinante (R&D Systems, EE.UU.). Las células apoptóticas se marcaron con colorante éster pHrodo™ Green STP (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.). El buffer de citometría de flujo se preparó con PBS (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.) complementado con FBS al 1% (GE Healthcare, Reino

Unido), azida sódica al 0,05% p/v (Merck, Alemania) y EDTA 0,5 mM (ácido etilendiaminotetraacético, Thermo Fischer Scientific, EE. UU.).

Ensayo de eferocitosis

El día 1, las HUVEC (confluencia del 70–90%) se recogieron por desprendimiento con Accutase™ durante 5 minutos, se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio de cultivo celular. El número de células y la viabilidad se evaluaron utilizando un citómetro de flujo Guava EasyCyte (Merck, Alemania) y el reactivo Guava ViaCount (Merck, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad requerida de células se centrifugó a 300 xg durante 5 min a TA y se resuspendió en medio de cultivo para permitir un número de células de $6,6 \times 10^4$ células/mL. Se agregaron 150 µL/pocillo de esta suspensión celular a placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Corning™, EE. UU.). Las HUVEC se incubaron en una incubadora a 37°C/5% de CO₂/95% de humedad durante 16–20 horas adicionales.

El número de células Jurkat E6–1 y el estado de viabilidad/muerte celular se evaluaron utilizando un citómetro de flujo Guava EasyCyte (Merck, Alemania) y el reactivo Guava ViaCount (Merck, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad requerida de células se centrifugó a 300 xg durante 5 min a temperatura ambiente y se resuspendió a una densidad de 1×10^6 células/mL en medio de cultivo complementado con TRAIL humano recombinante a una concentración final de 50 ng/mL. La muerte celular se indujo a 37°C/5% de CO₂/95% de humedad durante la noche.

En el día 2, el medio se retiró de las HUVEC por aspiración y se agregaron 25 µL de medio de cultivo fresco precalentado (37°C), seguido de la adición de 25 µL de proteína de fusión o controles diluidos en medio de cultivo precalentado (37°C). Para la dilución se utilizaron placas de 96 pocillos tratadas con superficie no ligante (NBS) (Corning™, EE. UU.). Se permitió que las proteínas de fusión interactuaran con las HUVEC durante 30 min a 37°C/5% de CO₂/95% de humedad antes de la adición de células Jurkat moribundas.

Se contó el número de células Jurkat E6–1 apoptóticas/moribundas utilizando un citómetro de flujo Guava EasyCyte (Merck, Alemania) y el reactivo Guava ViaCount (Merck, Alemania). La cantidad requerida de células apoptóticas se centrifugaron a 400 xg a TA durante 5 min y se resuspendieron a una densidad de 5×10^6 células/mL en medio RPMI 1640 (sin FBS) complementado con tinte éster pHrodo™ Green STP a una concentración final de 5 µg/mL (medio de tinción). Después de teñir durante 10 min a 37°C, el éster de STP pHrodo™ Green reactivo restante se inactivó con medio de tinción complementado con FBS al 10% durante 5 min adicionales a 37°C. Las células marcadas con pHrodo™ Green se lavaron una vez y el número de

células se ajustó a 3×10^6 células/mL en medio de cultivo HUVEC. Se añadieron $1,5 \times 10^6$ /pocillo de células Jurkat marcadas con pHrodo™ Green a HUVEC y se incubaron a 37°C/5% de CO₂/95% de humedad durante 5 h. Se eliminó el medio, se lavaron las HUVEC una vez en PBS y se separaron con 40 µL/pocillo de solución Accutase™. Las células se recolectaron mediante la adición de 80 µL de buffer de citometría de flujo helado, se transfirieron a un bloque de 96 pocillos de polipropileno de 1,5 mL, se lavaron con un exceso de buffer de citometría de flujo helado y se centrifugaron a 400 xg (4°C) durante 5 min. Los sobrenadantes se eliminaron por aspiración y los sedimentos se resuspendieron en 80 µL de buffer de citometría de flujo enfriado con hielo y se transfirieron a una placa de microtitulación con fondo en V de 96 pocillos (BD Biosciences, EE. UU.). A continuación, las muestras se midieron en un citómetro de flujo BD LSRFortessa™ (BD Biosciences, EE. UU.). Se registró la intensidad de la fluorescencia pHrodo™ Green, como indicador de la localización lisosómica de las células Jurkat absorbidas. El análisis de datos de citometría de flujo se realizó utilizando el software FlowJo™. Se utilizaron como lectura los valores de intensidad de fluorescencia medios (MFI) de la señal de pHrodo™ Green de las HUVEC reguladas por singlete. El análisis de datos se realizó utilizando el software MS Excel y GraphPad Prism para el cálculo de EC₅₀.

El efecto de las proteínas de fusión FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44) y FP270 (EGF–HSA–C2; SEQ ID NO: 36) sobre la promoción de la eferocitosis de células Jurkat moribundas por las células endoteliales HUVEC se muestran en la Figura 9. La internalización de las células T Jurkat humanas moribundas marcadas con pHrodo por las HUVEC se potencia de forma potente por la proteína de fusión FP278. Los resultados demuestran que las células endoteliales se arman por la proteína de fusión para convertirse en fagocitos eficientes de células moribundas. Sorprendentemente, la eficacia de las proteínas de fusión en este ensayo depende claramente de la presencia de un dominio en tándem C1–C2 o C1–C1. Una proteína de fusión que consiste en EGF–HSA–C2 (FP270), por ejemplo, está inactiva en este entorno experimental, como se muestra en la Figura 9. La Figura 10 demuestra nuestro hallazgo altamente sorprendente de que la ubicación de un dominio HSA en las proteínas diseñadas, es decir, en la posición N–o C–terminal (HSA–EGF–C1–C2 (FP220; SEQ ID NO: 30) o EGF–C1–C2–HSA (FP110; SEQ ID NO: 28), respectivamente), confiere capacidad de bloqueo de eferocitosis en el ensayo de eferocitosis de macrófagos a las proteínas diseñadas de MFG–E8 HSA. Estos datos demuestran claramente la importancia de posicionar el dominio HSA entre los dominios de unión

a integrina y de unión a PS para la promoción eficiente de la eferocitosis por las proteínas de fusión de la presente descripción.

La Figura 11 muestra una comparación de la promoción de la eferocitosis endotelial mediante varios formatos de proteínas de fusión que comprenden combinaciones de un dominio EGF, un dominio C1–C2, HSA o un dominio Fc. La Figura 11A muestra una comparación de proteínas de fusión que comprenden HSA con HSA que se coloca en el C–terminal o N–terminal o entre los dominios de tipo EGF y C1–C2; EGF–C1–C2–HSA (FP110; SEQ ID NO: 28), HSA–EGF–C1–C2 (FP220; SEQ ID NO: 30) y etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His (FP278; SEQ ID NO: 44), respectivamente. La Figura 11B muestra una comparación de proteínas de fusión que comprenden un dominio Fc con el Fc posicionado en el C–terminal o entre los dominios tipo EGF y C1. Se muestran dos formatos del resto Fc: Fc de tipo salvaje (SEQ ID NO: 7) como se encuentra en FP070 (EGF–Fc–C1–C2; SEQ ID NO: 17) y FP080 (EGF–C1–C2–Fc; SEQ ID NO: 22) y restos Fc con las modificaciones KiH S354C y T366W en un brazo del Fc (FP060; EGF–C1–C2–Fc [S354C, T366W]; SEQ ID NO: 14) Numeración de la EU (Merchant *et al* (1998) *supra*). La Figura 11C muestra una comparación de las proteínas de fusión FP090 (Fc–EGF–C1–C2; SEQ ID NO: 24) que comprenden un resto Fc posicionado en el N–terminal, para tres lotes de FP090 a tres concentraciones diferentes (0,72, 7,2 y 72 nM) en comparación con el control wtMFG–E8. La eferocitosis de células Jurkat moribundas por HUVECs solo fue promovida por proteínas diseñadas con un resto HSA o Fc insertado después del dominio similar a EGF. La Fig. 11D muestra que el inserto de un dominio de solubilización puede conducir a una nueva proteína de fusión bioactiva basada en la proteína puente endógena EDIL3, un parálogo de MFG–E8. Como se muestra en la Fig. 11D, HSA se insertó entre el dominio similar a EGF y el dominio C1–C2 de EDIL3, el parálogo de MFG–E8. Este constructo EDIL3 (FP050 (EGF–HSA–C1–C2 basado en EDIL3; SEQ ID NO: 12) tiene solo uno (que contiene el bucle RGD) de los 3 dominios similares a EGF que se encuentran en wtEDIL3. En este constructo encontramos sorprendentemente una tolerancia similar del inserto de dominio HSA con respecto a la expresión de una nueva proteína diseñada recombinante con una pureza muy alta (Fig.2B). Además, se encontró sorprendentemente que la proteína FP050 diseñada recombinante derivada de EDIL3 promovió la eferocitosis de células Jurkat moribundas por células endoteliales (HUVECS) que demuestran la funcionalidad central de

una proteína puente y ejemplifican que los dominios de las proteínas puente son útiles para diseñar proteínas funcionales nuevas diseñadas recombinantes.

Ejemplo 4: Eferocitosis de micropartículas plasmáticas protrombóticas

4.1 Ensayo de eferocitosis de micropartículas endoteliales humanas

Cultivo de células

Las células HUVEC se obtuvieron de Lonza (Basilea, Suiza). Las células se cultivaron en matraces recubiertos con gelatina (de piel bovina, concentración final al 0,2% en PBS, dilución de solución de stock al 2%, Sigma Aldrich/Merck, Alemania). Las células se cultivaron con medio de cultivo 199 (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.) complementado con FBS al 10% (GE Healthcare, Reino Unido), Pen/Estrep al 1% (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.), Glutamax al 1% (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.) y 1 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos recombinante básico (Peprotech, Reino Unido). Las células se separaron para recolectarlas o pasarlas utilizando Accutase™ (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.).

Se prepararon micropartículas derivadas de plaquetas de acuerdo con el siguiente procedimiento: se extrajo sangre venosa citrada (Coagulation 9NC Citrate Monovette, Sarstedt, Alemania) de voluntarios adultos sanos después de otorgar el consentimiento informado por escrito. Se preparó plasma rico en plaquetas (PRP) mediante centrifugación (200 x g, 15 minutos, sin freno, temperatura ambiente). Se generaron micropartículas/restos derivados de plaquetas sometiendo el PRP a tres ciclos de quebrado/congelación utilizando nitrógeno líquido y descongelación a 37°C. Los fragmentos de plaquetas/micropartículas se sedimentaron mediante centrifugación a 20 000 xg durante 15 min a TA. El sedimento se resuspendió en PBS, se prepararon alícuotas y se almacenaron a –80°C. Las preparaciones de micropartículas fueron positivas al 85–100% de PS de acuerdo con se determinó mediante citometría de flujo utilizando lactadherina/MFG–E8 murina marcada con Alexa Fluor™ 488 (Novartis internamente). Se determinó el número de micropartículas utilizando perlas de recuento dedicadas (BioCytex/Stago, Francia). El buffer de citometría de flujo se preparó con PBS (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.) complementado con FBS al 1% (GE Healthcare, Reino Unido), azida sódica al 0,05% p/v (Merck, Alemania) y EDTA 0,5 mM (ácido etilendiaminotetraacético, Thermo Fischer Scientific, EE. UU.).

4.2 Ensayo de eferocitosis

El día 1, las células HUVEC (confluencia 70–90%) se recogieron por desprendimiento con Accutase™ durante 5 min, se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio de cultivo celular. El número de células y la viabilidad se evaluaron utilizando un citómetro de flujo Guava EasyCyte

(Merck, Alemania) y el reactivo Guava ViaCount (Merck, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad requerida de células se centrifugó a 300 xg durante 5 min a TA y se resuspendió en medio de cultivo para permitir un número de células de $6,6 \times 10^4$ células/mL. Se agregaron 150 µL/pocillo de esta suspensión celular a placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Corning™, EE. UU.). Las células HUVEC se incubaron en una incubadora a 37°C/5% de CO₂/95% de humedad durante 16–20 horas adicionales.

En el día 2, se extrajo el medio de las células HUVEC por aspiración y se agregaron 25 µL de medio de cultivo fresco precalentado (37°C), seguido de la adición de 25 µL de la proteína de fusión FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44) a tres concentraciones diferentes: 0,3 nM, 3 nM o 30 nM o control, diluido en medio de cultivo precalentado (37°C). Para la dilución se utilizaron placas de 96 pocillos tratadas con superficie no ligante (NBS) (Corning™, EE. UU.). Se permitió que las proteínas de prueba interactuaran con las células HUVEC a 37°C/5% de CO₂/95% de humedad durante 30 min antes de la adición de micropartículas derivadas de plaquetas.

La cantidad requerida de micropartículas se centrifugaron a 20.000 xg a 4°C durante 15 min y se resuspendieron a una densidad de 2×10^8 partículas/mL en medio RPMI 1640 (sin FBS) suplementado con tinte pHrodo™ Green STP Ester a una concentración final de 5 µg/mL (medio de tinción). Después de teñir durante 10 min a 37°C, el éster de pHrodo™ Green STP reactivo restante se inactivó con medio de tinción complementado con FBS al 10% durante 5 min adicionales a 37°C. Las micropartículas marcadas con pHrodo™ Green se lavaron una vez mediante centrifugación a 20 000 xg a 4°C durante 15 min y el número se ajustó a 1×10^8 partículas/mL en medio de cultivo celular HUVEC. Se agregaron 5×10^6 partículas/pocillo de micropartículas marcadas con pHrodo™ Green a las células HUVEC y se incubaron a 37°C/5% de CO₂/95% de humedad durante 5 h. Se retiró el medio, se lavaron las células HUVEC una vez en PBS y se separaron con 40 µL/pocillo de solución Accutase™. Las células se recolectaron mediante la adición de 80 µL de buffer de citometría de flujo enfriado con hielo, se transfirieron a un bloque de 96 pocillos de polipropileno de 1,5 mL, se lavaron con un exceso de buffer de citometría de flujo enfriado con hielo y se centrifugaron a 400xg (4°C) durante 5 min. Los sobrenadantes se eliminaron por aspiración y los sedimentos se resuspendieron en 80 µL de buffer de citometría de flujo enfriado con hielo y se transfirieron a una placa de microtitulación con fondo en V de 96 pocillos (BD Biosciences, EE. UU.). Las muestras se midieron en un citómetro de flujo BD LSRFortessa™ (BD Biosciences, EE. UU.). Se registró la intensidad de la fluorescencia de pHrodo™ Green, como indicador de la localización lisosómica de las micropartículas absorbidas. El análisis de datos de citometría de flujo se realizó utilizando el software FlowJo™. Se utilizaron

como lectura los valores medios de intensidad de fluorescencia (MFI) de la señal de pHrodo™ Green de células HUVEC reguladas por singlete. El análisis de datos se realizó utilizando el software MS Excel y GraphPad Prism para el cálculo de EC₅₀. La proteína de fusión FP278 promovió la eferocitosis de micropartículas derivadas de plaquetas por células endoteliales de una manera dependiente de la concentración como se muestra en la Figura 12. La promoción de la captación fue dependiente de la concentración y también se observó en otros tipos de células endoteliales (no mostradas).

Ejemplo 5: Propiedades técnicas de las proteínas de fusión MFG-E8-HSA

5.1 *Análisis de unión por resonancia de plasmón superficial (SPR) de la proteína de fusión FP330*

a FcRn

Se realizó un ensayo de unión directa para caracterizar la unión de la proteína de fusión FP330 (EGF-HSA-C1-C2; SEQ ID NO: 42) a FcRn. Se midieron las constantes de afinidad de unión cinética (KD) en la proteína capturada utilizando FcRn humano recombinante como analito. Las mediciones se realizaron en un BIAcore® T200 (GE Healthcare, Glattbrugg, Suiza) a temperatura ambiente y a pH 5,8 y 7,4, respectivamente. Para las mediciones de afinidad, las proteínas se diluyeron en NaP 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 5,8 y se inmovilizaron en las celdas de flujo de un chip sensor de grado de investigación CM5 (GE Healthcare, ref BR-1000-14) utilizando un procedimiento estándar de acuerdo con la recomendación del fabricante (GE Healthcare). Para que sirva de referencia, se inmovilizó una celda de flujo en blanco. Los datos de unión se adquirieron mediante la inyección posterior de diluciones de analito en serie en la celda de flujo de referencia y medición. Se incluyeron muestras de concentración cero (solo buffer de ejecución) para permitir una doble referencia durante la evaluación de datos. Para la evaluación de los datos, se utilizaron sensogramas referenciados duplicados y se analizaron las constantes de disociación (KD).

La proteína de fusión FP330 se une a FcRn a pH 5,8 con una afinidad de 1380 nM, mientras que no se observó unión a pH 7,4 (véase la Tabla 5 anterior). Estos resultados concuerdan bien con la HSA de tipo salvaje (1000-2000 nM, a pH 5,8, datos no mostrados).

5.2 *Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de MFG-E8 y variantes*

La estabilidad térmica de la variante FP278 de la proteína MFG-E8 diseñada (etiqueta EGF-HSA-C1-C2-His; SEQ ID NO: 44) se midió utilizando calorimetría de barrido diferencial. Las mediciones se realizaron en un micro calorímetro de barrido diferencial (Nano DSC, TA

instrumentos). El volumen de la celda fue de 0,5 mL y la velocidad de calentamiento fue de 1°C/min. La proteína se utilizó a una concentración de 1 mg/mL en PBS (pH 7,4). La capacidad calorífica molar de la proteína se estimó por comparación con muestras duplicadas que contenían buffer idéntico del que se había omitido la proteína. Las capacidades caloríficas molares parciales y las curvas de fusión se analizaron utilizando un procedimiento estándar. Los termogramas se corrigieron en la línea de base y se normalizaron las concentraciones. Se observaron dos eventos de fusión, el primer T_m fue a 50°C, el segundo T_m a 64°C.

5.3 *Mediciones de solubilidad y propensión a la agregación de variantes de MFG-E8*

En primer lugar, se midió la propensión a la agregación de la proteína variante FP278 de MFG-E8 (etiqueta EGF-HSA-C1-C2-His; SEQ ID NO: 44) mediante dispersión de luz dinámica (DLS, Wyatt). Se aplicó la dispersión de luz dinámica para medir los coeficientes de difusión traslacional de FP278 en solución cuantificando las fluctuaciones dinámicas en la luz dispersa. Las distribuciones de tamaño de las variantes de proteína sin fraccionamiento, que proporcionan estimaciones de polidispersidad, así como los radios hidrodinámicos, se midieron a una concentración de 1 mg/mL. Los radios hidrodinámicos de la proteína de fusión FP278 se determinaron con un lector de placas DynaPro™ (Wyatt Technology Europe GmbH, Dernbach, Alemania) combinado con el software DYNAMICS (versión 7.1.0.25, Wyatt). Se midieron 50 µL de la solución de proteína sin diluir y filtrada (filtro PVDF de 0,22 µm (Unidad de filtro accionada por jeringa Millex®, Millipore, Billerica, EE. UU.)) en una placa de 384 pocillos (placa de 384 pocillos redondos, Polystyrol, Thermo Scientific, Langenselbold, Alemania). No se pudieron identificar agregados de mayor peso molecular de la muestra de proteína. El radio hidrodinámico de la proteína fue de alrededor de 5–6 nm, lo que indica una proteína monomérica en solución.

En segundo lugar, se realizaron mediciones del radio hidrodinámico dependiente de la concentración de la proteína de fusión FP278 para estimar la solubilidad de la proteína. Se aplicaron concentraciones de proteínas de hasta 22 mg/mL. Los radios hidrodinámicos se determinaron como se describió anteriormente. Al aumentar la concentración de la proteína de fusión FP278, no se pudo observar ningún aumento del radio (5–7 nm), mientras que la medición dinámica de la dispersión de luz de wtMFG-E8 (SEQ ID NO: 1) falló debido a la alta agregación a concentraciones de alrededor de 0,2 mg/mL.

Ejemplo 6: Optimización de proteínas de fusión MFG-E8

Se utilizó espectrometría de masas (MS) para investigar la proteína de fusión FP330 (EGF-HSA-C1-C2) para generar un panel de proteínas de fusión basadas en MFG-E8 variantes

optimizadas para mejorar la expresión y el rendimiento. Se generó un panel de proteínas variantes con ligadores de tamaño y estructura variables, por ejemplo, ligadores que comprenden GS entre los dominios EGF y HSA y/o múltiplos de GS o G4S entre los dominios HSA y C1. Además, en algunas de las variantes se incluyeron modificaciones de aminoácidos (representadas como HSA* en la Tabla 7) que comprenden deleciones o sustituciones. El panel de proteínas de fusión variantes se resume en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7: Resumen de proteínas de fusión variantes

Variante	Dominios	Modificación de aminoácidos ¹	Ligador	SEQ ID NO:
wtMFG-E8	EGF-C1-C2	–	-	1
FP330	EGF-GS-HSA-ligador-C1-C2	–	(G ₂ S) ₄ ligador (SEQ ID 62)	42
FP278	Etiqueta EGF-GS-HSA-ligador-C1-C2-His	–	(G ₂ S) ₄ ligador (SEQ ID 62)	44
FP811	EGF-GS-HSA*-ligador-C1-C2	Delección: G632 – L633	G ₄ S (SEQ ID NO: 64)	54
FP010	EGF-GS-HSA*-ligador-C1-C2	Delección: G632 – L633	(G ₄ S) ₂ (SEQ ID NO: 65)	56
FP816	EGF-HSA-C1-C2	–	-	58
FP138	EGF-GS-HSA*-ligador-C1-C2	Delección: G632 – L633	(G ₂ S) ₄ ligador (SEQ ID 62)	52
FP284	EGF-GS-HSA*-ligador-C1-C2	Sustitución L633V	(G ₂ S) ₄ ligador	50

			(SEQ ID 62)	
FP776	EGF-HSA*-C1-C2	Delección: A626 – L633	-	48
FP068	EGF-HSA*-C1-C2	Delección: G632 – L633	-	46

¹ La posición de la modificación de aminoácidos se enumera de acuerdo con la SEQ ID NO: 42 (FP330)

Ejemplo 7: Proteínas de fusión variantes MFG-E8; expresión y purificación

Los métodos para la generación de proteínas de fusión en líneas celulares HEK se describen en el Ejemplo 2. Para la expresión en una línea celular CHO patentada, los ácidos nucleicos que codifican las variantes de MFG-E8 se sintetizaron en Geneart (LifeTechnologies) y se clonaron en un vector de expresión de mamífero utilizando técnicas de clonación basadas en ligación de enzimas de restricción. Los plásmidos resultantes se transfectaron en células CHO-S (Thermo). En resumen, para la expresión transitoria de las proteínas de fusión, el vector de expresión se transfectó en células CHO-S adaptadas a la suspensión utilizando el agente de transfección ExpifectamineCHO (Thermo). Típicamente, se transfectaron 400 mL de células en suspensión a una densidad de 6 millones de células por mL con ADN que contenía 400 µg de vector de expresión que codificaba la proteína diseñada. A continuación, se introdujo el vector de expresión recombinante en las células huésped para su posterior secreción durante siete días en medio de cultivo (medio de expresión ExpiCHO, suplementado con alimentación ExpiCHO y reactivo potenciador (Thermo)).

Como puede verse en los datos de expresión mostrados en la Tabla 8, las proteínas de fusión variantes FP068 (SEQ ID NO: 46) y FP776 (SEQ ID NO: 48) mostraron una mejora aproximada del doble en la expresión sobre la proteína de fusión FP330 (SEQ ID NO: 42).

Tabla 8: Expresión de proteínas de fusión variantes en líneas celulares HEK y CHO*

Proteína	Expresión posterior a la captura de HSA (mg/L)
FP330	11
FP138	10
FP816	9

FP068*	18
FP776*	21
FP284	10
FP811	8
FP010	10

* indica proteína de fusión producida en una línea celular CHO

Se han obtenido proteínas de fusión terapéuticas adicionales de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1. Por ejemplo, los niveles de expresión (mg/L) obtenidos después del proceso de purificación completo (captura y pulido) son 4,3 para Seq ID 80 y 8,4 para Seq ID 82.

Ejemplo 8: Caracterización de proteínas de fusión variantes

El efecto de las proteínas de fusión variantes sobre la eferocitosis se determinó realizando ensayos de eferocitosis como se describe en el Ejemplo 3.

En un primer ensayo, se determinó el efecto de las proteínas de fusión variantes en un ensayo de eferocitosis de macrófagos–neutrófilos humanos de acuerdo con el método descrito en la Sección 3.3 anterior. Los macrófagos M0 se incubaron con la proteína de fusión FP330 (EGF–HSA–C1–C2; SEQ ID NO: 42) o variantes FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44) o FP776 (EGF–HSA–C1–C2; SEQ ID NO: 48) durante 30 min. Como se muestra en la Figura 13, las proteínas de fusión FP330, FP278 y FP776 pueden rescatar endotoxina (lipopolisacárido (LPS))–eferocitosis alterada de neutrófilos moribundos por macrófagos humanos. El aumento de las concentraciones de las proteínas de fusión FP330 (CE_{50} = 1,6 nM; Figura 13A), FP278 (CE_{50} = 1,78 nM; Figura 13B) y FP776 (CE_{50} = 0,5 nM; Figura 13C) llevaron al rescate de la eferocitosis alterada causada por la adición de LPS e incluso promovió la eferocitosis una vez que se alcanzaron los niveles básicos.

Las proteínas de fusión FP330, FP278 y FP776 se caracterizaron además en un ensayo de eferocitosis de células endoteliales humanas (HUVEC)–células Jurkat de acuerdo con el método descrito en la Sección 3.4 anterior. El efecto de las proteínas de fusión FP330, FP278 y FP776 sobre la promoción de la eferocitosis de las células Jurkat moribundas por las células endoteliales HUVEC se muestra en la Figura 14. La internalización de las células T Jurkat humanas moribundas marcadas con pHrodo por las HUVEC se promovió de manera potente mediante concentraciones crecientes de FP330 (EC_{50} = 3,4 nM; figura 14A), FP278 (EC_{50} = 2,4 nM; Figura 14B) y FP776 (EC_{50} = 3 nM; Figura 14C). Estos resultados demuestran que las células endoteliales

están armadas por las proteínas de fusión para convertirse en fagocitos eficientes de células moribundas.

Ejemplo 9: Protección de ratones de AKI y la respuesta orgánica aguda desencadenada por AKI

9.1 *Modelo de lesión renal aguda*

Se adquirieron ratones hembra C57BL/6 (18–22 g) de Charles River (Francia) y se alojaron en una instalación de temperatura controlada en jaulas protegidas con filtro con ciclos de luz/oscuridad de 12 h. Los animales se manipularon respetando estrictamente las leyes federales suizas y los Principios de cuidado de animales de laboratorio NIH. La proteína de fusión terapéutica bajo prueba se administró por vía intraperitoneal (i.p.) o intravenosa (i.v.) dos horas antes de la cirugía. Se aplicó buprenorfina (Indivior Schweiz AG) por vía subcutánea (s.c.) a una dosis de 0,1 mg/kg 60 a 30 minutos antes de la cirugía. La anestesia por inhalación con isoflurano se indujo en una cámara de narcóticos (3,5–5% Vol., Gas portador: oxígeno) durante 5 min antes de la cirugía. Durante la cirugía, el animal se mantuvo bajo anestesia mediante una máscara facial con 1–2% en volumen de isoflurano/oxígeno, el caudal de gas fue de 0,8 a 1,2 L/min. Se afeitó la piel del abdomen y se desinfectó con Betaseptic (Mundipharma, Francia). Los animales se colocaron sobre una manta homeotérmica (Rothacher, Suiza) con un sistema de monitorización homeotérmica (PhysiTemp, EE. UU., Physitemp Instruments LLC, EE. UU.) y se cubrieron con una gasa estéril. La temperatura corporal se controló durante toda la cirugía mediante una sonda rectal (Physitemp Instruments LLC, EE. UU.) y se controló para permitir una temperatura corporal de 36,5–37,5°C. Todos los animales, incluidos los controles SHAM, se sometieron a nefrectomía unilateral del riñón derecho: después de la incisión/laparotomía en la línea media, el contenido abdominal se retiró hacia la izquierda para exponer el riñón derecho. Se desconectaron y ligaron el uréter derecho y los vasos sanguíneos renales, luego se extrajo el riñón derecho. Para los animales que padecieron AKI, el contenido abdominal se colocó a la derecha sobre una gasa estéril y se diseccionaron la arteria y la vena renales izquierdas para permitir el pinzamiento para la inducción de isquemia. Se utilizó una pinza de microaneurisma (B Braun, Suiza) para pinzar el pedículo renal (arteria y vena juntas usando una pinza) para bloquear el flujo sanguíneo al riñón e inducir isquemia renal. El éxito de la isquemia se confirmó mediante el cambio de color del riñón de rojo a violeta oscuro, que se produjo en unos pocos segundos. Tras la inducción de la isquemia (35–38 minutos), se retiró la pinza del microaneurisma. Se usó solución salina estéril tibia (~ 2 mL, 37°C) para lavar el contenido abdominal para rehidratar los tejidos antes del cierre de la herida. Después del lavado, se añadió i.p. 1 mL más de solución salina estéril como reemplazo de fluidos. Al iniciar la reperusión, la

herida se cerró en dos capas (músculo y piel, por separado). A continuación, los animales se mantuvieron bajo una lámpara roja caliente hasta que se recuperaron por completo. Se volvió a administrar buprenorfina 1h y 4h después de la cirugía a una dosis de 0,1 mg/kg y también se incluyó en el agua de bebida (9,091 µg/mL). Después de 24 h, los animales se sacrificaron para su análisis.

9.2 Administración de proteínas de fusión terapéuticas

Las proteínas de fusión terapéuticas FP330 (EGF–HSA–C1–C2; SEQ ID NO: 42), FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44) y FP776 (EGF–HSA–C1–C2; SEQ ID NO: 48) se probaron en el modelo AKI como se describe anteriormente a las dosis establecidas en la Tabla 9 a continuación. Para los estudios para detectar marcadores séricos y expresión de marcadores qPCR, se administró proteína de fusión FP278 2 horas antes de la cirugía. FP330 y FP776 se dosificaron i.v. 30 min antes del inicio de la lesión por reperfusión por isquemia. Para el estudio para medir la captación del agente de contraste por imágenes de resonancia magnética, la proteína de fusión FP776 se dosificó profilácticamente 30 min antes de la inducción de AKI a 1,26 mg/kg o se dosificó terapéuticamente 5 h después de la inducción de la lesión por isquemia–reperfusión a 2 mg/kg i.v.

Tabla 9: Dosificación de proteínas de fusión terapéuticas

Proteína de fusión	Dosis (mg/kg)	Vía de administración
FP278	0,16	i.p.
	0,50	
FP330	0,20	i.v.
	0,50	
	1,50	
FP776	0,20	i.v.
	0,75	
	1,26	
	2,00	

9.3 Lecturas/Análisis para la protección de AKI:

Marcadores de suero:

Se tomaron muestras de suero 24 horas después de la inducción de reperfusión por isquemia y se analizaron para determinar el contenido de creatinina sérica y nitrógeno ureico en

sangre (BUN) utilizando un analizador clínico Hitachi M40 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Axonlab, Suiza).

Expresión del marcador qPCR en órganos:

Los órganos (riñón, hígado, pulmón y corazón) se recogieron 24 h después de la inducción de AKI y se cortaron en trozos de 1 cm y se almacenaron en buffer ARN Later (Thermo Fisher Scientific Inc, EE. UU.) a 4°C durante la noche. Los trozos de órganos se transfirieron a buffer RLT (RNeasy Mini Kit, Qiagen, DE) que contenía Beta-mercaptoetanol 134 mM (Merck, DE) en tubos de Lysing Matrix D (MP Biomedicals FR) y se homogeneizaron utilizando el FastPrep-24 Instrument (MP Biomedicals). Posteriormente, el tejido fibroso del corazón se digirió con proteinasa K (RNeasy Mini Kit), mientras que los lisados de riñón, hígado y pulmón se centrifugaron directamente durante 3 min a máxima velocidad en una microcentrífuga (Eppendorf, DE). Los sobrenadantes se transfirieron a una columna giratoria QIAshredder (Qiagen, DE) y se centrifugaron durante 2 min. La extracción de ARN de los flujos se realizó de acuerdo con el RNeasy Mini Kit Manual, incluida la digestión de DNasa. La concentración de ARN se midió con un dispositivo Nano Drop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc). Se sometieron a transcripción inversa 2 µg de ARN por muestra de acuerdo con el Manual del kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Thermo Fisher Scientific Inc) utilizando un termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems, EE. UU.). El ADNc se combinó con agua libre de nucleasas (Thermo Fisher Scientific Inc), sonda TaqMan (TaqMan Gene Expression Assay (FAM), Thermo Fisher Scientific Inc) y TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc) en una microplaca de 384 pocillos (Placa de reacción de 384 pocillos óptica MicroAmp, Thermo Fisher Scientific Inc). La qPCR se realizó en el sistema de PCR en tiempo real ViiA 7 (Applied Biosystems, EE. UU.). Los ajustes fueron 1: 2 min, 50°C; 2: 10 min, 95°C; 3: 15 s, 95°C; 4: 1 min, 60°C. Los pasos 3 y 4 se repitieron durante 45 ciclos. El análisis de datos se realizó utilizando el software ViiA 7, el software de análisis de datos qPCR se realizó utilizando MS Excel y el software GraphPad Prism.

Captación del agente de contraste por el hígado medida por imagen por resonancia magnética (MRI)

Los métodos para realizar la MRI se adaptaron de una publicación de Egger *et al* (Egger *et al.*, (2015) J Magn Reson Imaging, 41: 829–840). Los experimentos se realizaron en un sistema de MRI Bruker Biospec 7–T (Bruker Biospin, Ettlingen, Alemania). Durante las adquisiciones de señales de MRI, los ratones se colocaron en posición supina en una cuna de plexiglás. La

temperatura corporal se mantuvo a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ utilizando una almohadilla térmica. Después de un breve período de inducción, la anestesia se mantuvo con aprox. Isoflurano al 1,4% en una mezcla de $\text{O}_2/\text{N}_2\text{O}$ (1: 2), administrado a través de un cono nasal. Todas las mediciones se realizaron en animales que respiran espontáneamente; no se aplicó activación cardíaca ni respiratoria.

Después de colocar un ratón en el escáner, se adquirieron imágenes rápidas de exploración con fines de localización. Los análisis de perfusión se realizaron utilizando un agente intravascular que contenía nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPIO) (Endorem®, Guerbet, Francia). Endorem® se inyectó por vía intravenosa como un bolo durante 1,2 s en animales con AKI (24 h después de la inducción de la enfermedad) o después de la operación simulada (animales después de 24 h de nefrectomía). Se administró un primer bolo durante 1,2 s, junto con la adquisición secuencial de imágenes ecoplanares a una resolución de 400 ms/imagen. Tras la adquisición de 25 imágenes de referencia, se inyectó un segundo bolo durante 1,2 s y se adquirieron 575 imágenes más después del bolo, lo que dio como resultado un total de 600 imágenes adquiridas en 4 min. El agente de contraste superparamagnético indujo cambios locales en la susceptibilidad que dieron como resultado una atenuación de la señal proporcional a la perfusión del riñón. Para una serie de imágenes, las intensidades de la señal se evaluaron en las regiones de interés (ROI) ubicadas en la corteza/franja externa de la médula externa. La posición, la forma y el tamaño de las ROI se eligieron cuidadosamente para asegurar que cubrieran aproximadamente la misma región, a pesar de los movimientos del riñón causados por la respiración. Las intensidades de señal medias para las imágenes previas a la inyección proporcionaron intensidades de línea de base ($S(0)$). Los índices de perfusión se determinaron a partir de los valores medios de las siguientes proporciones (Rosen et al., (1990) Magn Reson Med., 14: 249–265):

$$-\ln[S(t)/S(0)] \sim TE.V.cT(t)$$

donde TE es el tiempo de eco, V el volumen de sangre y cT la concentración de agente de contraste.

Las nanopartículas de SPIO utilizadas en el estudio tienen un diámetro medio de aproximadamente 150 nm y son absorbidas por las células de Kupffer en el hígado. Por tanto, además de la perfusión renal, la MRI también permitió monitorizar la captación de las nanopartículas en el hígado, detectando el cambio de contraste evaluado en las ROI colocadas en el hígado.

9.4 Resultados

Como se muestra en la Figura 15, las proteínas de fusión FP330 (EGF–HSA–C1–C2; SEQ ID NO: 42), FP278 (etiqueta EGF–HSA–C1–C2–His; SEQ ID NO: 44) y FP776 (EGF–HSA–C1–C2; SEQ ID NO: 48) protegió la función renal en este modelo de lesión renal aguda (AKI) cuando se administró por vía i.p. (FP278) o i.v. (FP330 y FP776). Esta protección se refleja en el bloqueo del aumento de creatinina sérica (sCr). La Figura 15A muestra que la proteína de fusión FP278 en ambas dosis probadas redujo los niveles de creatinina sérica significativamente ($p < 0,0001$) en comparación con los animales tratados con vehículo y tan eficazmente como MFG–E8 murino. Como se muestra en la Fig. 15B, la proteína de fusión FP330 protegió la función renal de una manera dependiente de la dosis e igualmente para la proteína de fusión FP776 (Fig. 15C), donde los niveles de creatinina sérica también se bloquearon de una manera dependiente de la dosis.

La función renal deteriorada también se refleja en los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN) en los ratones probados y el efecto de la proteína de fusión FP278 sobre los niveles de BUN se muestra en la Figura 16.

En resumen, como se muestra en las Figuras 15 y 16, las proteínas de fusión FP278, FP330 y FP776 protegen de forma potente contra un aumento de estos marcadores utilizados para diagnosticar clínicamente la insuficiencia renal. La eficacia observada fue confirmada por histología (no mostrada).

Además, como se muestra en la Fig. 17, una dosis única de la proteína de fusión FP278 protege los órganos distantes de la respuesta de fase aguda provocada por AKI. AKI induce una plétora de respuestas de ARNm medibles por qPCR en lisados de órganos distantes altamente perfundidos como el bazo, pulmón, hígado, corazón y cerebro. Los ARNm típicos indujeron daño seleccionado (NGAL, KIM–1), inducción de quimiocinas (no mostradas) o inducción de inducción de proteínas de respuesta de fase aguda como amiloide A sérico (SAA). Las figuras 17A y 17B ejemplifican dicha respuesta inducida por AKI (amiloide A sérico (SAA)) en el corazón y pulmón murinos que se bloqueó de forma potente y volvió a los niveles de SHAM después de una única inyección de la proteína de fusión.

La absorción del agente de contraste SPIO Endorem® por el hígado a lo largo del tiempo se muestra en la Figura 18. Los animales con AKI mostraron una absorción significativamente reducida del agente de contraste por el hígado (objetivo = células de Kupffer) en comparación con los animales simulados. El tratamiento con FP776 (dosificado profilácticamente a 1,26 mg/kg, –30 min antes de la inducción de AKI, o dosificado terapéuticamente a 2 mg/kg, +5 h después de la inducción de la lesión por reperusión por isquemia) protegido de la pérdida de la acumulación de agente de contraste en el hígado de ratones AKI. Estos resultados sugieren que en este modelo

de ratón, AKI desencadena un deterioro significativo de la depuración de partículas mediado por células de Kupffer endógenas y que AKI causa alteraciones microvasculares que impactan en la acumulación de agente de contraste de partículas de hierro en el hígado. El tratamiento con la proteína de fusión FP776 protegió de la pérdida de depuración y de las alteraciones microvasculares, e incluso aumentó la absorción del agente de contraste en ambas dosis probadas, en comparación con los animales simulados.

Ejemplos 10: Caracterización de proteínas diseñadas MFG–E8–HSA

10.2 Ensayo de adhesión de integrina αv

Las proteínas de fusión se diluyeron en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) pH 7,4 y se inmovilizaron 50 μ l de la concentración indicada por adsorción (placa de 96 pocillos, Nunc Maxisorb) durante la noche. Las placas se trataron posteriormente con PBS que contenía albúmina de suero bovino (BSA) libre de ácidos grasos al 3% a TA durante 1,5 h. Se cultivaron células de linfoma que expresan integrina $\alpha v\beta 3$ (ATCC–TIB–48 BW5147.G.1.4, ATCC, EE. UU.) en RPMI 1640 suplementado con GlutaMax, HEPES 25 mM, FBS al 10%, Pen/Estrep, piruvato de Na 1 mM, β –Mercaptoetanol 50 μ M. Las células se marcaron con 3 μ g/mL de 2',7'-bis-(2carboxietil)-5-(y-6)-carboxifluoresceína, éster acetoximetílico (BCECF AM) (Thermo Fisher Scientific Inc, EE. UU.) durante 30 min. Se resuspendieron células BW5147.G.1.4 en buffer de adhesión (TBS, BSA al 0,5%, MnCl₂ 1 mM, pH 7,4) y se dejaron adherir 50000 células/pocillo a TA durante 40 min. Las células no adherentes se eliminaron mediante lavados manuales con buffer de adhesión. La fluorescencia de las células adherentes se cuantificó utilizando un lector de placas de múltiples etiquetas Envision™ 2103, Perkin Elmer, EE.UU. El análisis de los datos se realizó con el software MS Excel y GraphPad Prism.

La adhesión de células BW5147.G.1.4 al dominio similar a EGF inmovilizado que contiene proteínas de fusión. Este hallazgo sugiere que en las condiciones experimentales probadas, el bucle RGD en el dominio similar a EGF fusionado a HSA de proteínas de fusión basadas en MFG–E8 o EDIL3/DEL–1 es accesible y permite la interacción con integrinas αv celulares. Tomados en conjunto, estos datos demuestran que las proteínas de fusión de la presente descripción se unen a integrinas celulares, apoyan la adhesión celular dependiente de integrinas e indican que en las proteínas con un inserto de dominio HSA conservan la funcionalidad.

10.3 Ensayo de eferocitosis de macrófagos y neutrófilos humanos

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de la capa leucocitaria mediante centrifugación en gradiente Ficoll (Ficoll®–Paque PLUS, GE Healthcare, Suecia) seguida de selección negativa de monocitos utilizando un kit de aislamiento Stemcell

(Stemcell 19059, Vancouver, Canadá). Los monocitos se diferenciaron en macrófagos "M0" utilizando M-CSF humano recombinante 40 ng/mL (Factor estimulante de colonias de macrófagos, R&D Systems, EE. UU.) en RPMI 1640 que contenía HEPES 25 mM, FBS al 10%, Pen/Estrep, NaPyr 1 mM, 50 μ M de β -Merc durante 5 días. Un día antes de la eferocitosis, los macrófagos se marcaron con PKH26 utilizando el kit Red Fluorescent Dye Linker (Sigma MINI26, EE. UU.). Las células se resuspendieron en RPMI 1640 que contenía HEPES 25 mM, FBS al 10%, Pen/Estrep, NaPyr 1 mM, β -Merc 50 μ M y se sembraron en placas negras de 96 pocillos (Corning, EE. UU.) A 40000 células/pocillo y se dejaron adherir durante 20h.

Neutrófilos: Se aislaron neutrófilos humanos de las capas leucocíticas mediante sedimentación de dextrano en combinación con un gradiente de densidad Ficoll™ como sigue: Se eliminó el plasma de la capa leucocitaria mediante centrifugación de la capa leucocitaria diluida. La cosecha celular se diluyó en dextrano al 1% (de Leuconostoc spp. PM 450.000–650.000; Sigma, EE.UU.) y se dejó sedimentar en hielo durante 2030 min.

Se recogieron los leucocitos del sobrenadante y en una capa Ficoll™ –Paque (GE Healthcare Suecia). Después de la centrifugación, se recogió el sedimento y se lisaron los eritrocitos restantes utilizando buffer de lisis de glóbulos rojos (RBC) (BioConcept, Suiza). Los neutrófilos se lavaron una vez en medio (RPMI 1640 + GlutaMax que contenía HEPES 25 mM, FBS al 10%, Pen/Estrep, NaPyr 0,1 mM, β -Merc 50 μ M) y se mantuvieron durante la noche a 15°C. La apoptosis/muerte celular se indujo mediante el tratamiento de neutrófilos con ligando de Superfas 1 μ g/mL (Enzo Life Sciences, Lausanne, Suiza) a 37°C durante 3 h. Los neutrófilos se tiñeron con Hoechst 33342 (Life Technologies, EE. UU.) durante 25 min y con DRAQ5 (eBioscience, Reino Unido, diluido 1: 2000) a 37°C en la oscuridad durante 5 min.

Ensayo de eferocitosis

Los macrófagos M0 se incubaron con las proteínas de fusión durante 30 min. Se agregaron neutrófilos marcados apoptóticos en una proporción de M0/neutrófilos 1: 4. Se visualizó la eferocitosis de neutrófilos apoptóticos por macrófagos aprovechando el aumento de la intensidad de fluorescencia de DRAQ5 tras la localización de neutrófilos en el compartimento lisosómico de pH bajo de los macrófagos M0.

La eferocitosis se cuantificó utilizando un sistema de análisis de alto contenido de campo amplio ImageXpress Micro XLS (Molecular DEVICES. CA, EE. UU.). Los macrófagos se identificaron mediante fluorescencia PKH26. El índice de eferocitosis (IE, mostrado como %) se calculó como la proporción de macrófagos que contienen al menos un evento de neutrófilos apoptóticos ingeridos (DRAQ5high) con respecto al número total de macrófagos. El análisis de los

datos se realizó con el software MS Excel y GraphPad Prism.

En la Figura 13D se muestra el efecto de la proteína de fusión FP114 y FP133 (EGF–HSA–C1 derivada de MFG–E8 SEQ ID NO: xxx) sobre el rescate y promoción de la eferocitosis de neutrófilos moribundos por macrófagos humanos tratados con LPS. Las proteínas de fusión aumentan la internalización de neutrófilos humanos moribundos marcados con pHrodo en macrófagos sobre la ya alta capacidad de eferocitosis de los macrófagos M0. En la Figura 13E se muestra que la proteína de fusión FP147 recombinante (EGF_EGF_EGF_HSA_C1 derivado de EDIL/DEL–1) puede rescatar la eferocitosis alterada por endotoxina (lipopolisacárido) de neutrófilos moribundos por macrófagos humanos. En general, los datos muestran el hallazgo sorprendente de que las proteínas de fusión derivadas de MFGE8 o EDIL3/DEL–1 truncadas en C2 promueven la eferocitosis con una eficacia nM baja in vitro.

Ejemplo 11: Protección de ratones contra AKI

11.1 Modelo de lesión renal aguda

Se adquirieron ratones hembra C57BL/6 (18–22 g) de Charles River (Francia) y se alojaron en una instalación de temperatura controlada en jaulas protegidas con filtro con ciclos de luz/oscuridad de 12 h. Los animales se manipularon respetando estrictamente las leyes federales suizas y los Principios de cuidado de animales de laboratorio de NIH. La proteína de fusión terapéutica bajo prueba se administró por vía intraperitoneal (i.p.) o intravenosa (i.v.) dos horas antes de la cirugía. Se aplicó buprenorfina (Indivior Schweiz AG) por vía subcutánea (s.c.) a una dosis de 0,1 mg/kg 60 a 30 minutos antes de la cirugía. La anestesia por inhalación con isoflurano se indujo en una cámara de narcóticos (3,5–5% Vol., gas portador: oxígeno) durante 5 min antes de la cirugía. Durante la cirugía, el animal se mantuvo bajo anestesia mediante una máscara facial con 1–2% en volumen de isoflurano/oxígeno, el caudal de gas fue de 0,8–1,2 L/min. Se afeitó la piel del abdomen y se desinfectó con Betaseptic (Mundipharma, Francia). Los animales se colocaron sobre una manta homeotérmica (Rothacher, Suiza) con un sistema de monitorización homeotérmica (PhysiTemp, EE. UU., Physitemp Instruments LLC, EE. UU.) y se cubrieron con una gasa estéril. La temperatura corporal se controló durante toda la cirugía mediante una sonda rectal (Physitemp Instruments LLC, EE. UU.) y se controló para permitir una temperatura corporal de 36,5–37,5°C. Todos los animales, incluidos los controles SHAM, se sometieron a nefrectomía unilateral del riñón derecho: después de la incisión/laparotomía en la línea media, el contenido abdominal se retiró hacia la izquierda para exponer el riñón derecho. Se desconectaron y ligaron

el uréter derecho y los vasos sanguíneos renales, luego se extrajo el riñón derecho. Para los animales que experimentaron AKI, el contenido abdominal se colocó a la derecha sobre una gasa estéril y se diseccionaron la arteria y la vena renales izquierdas para permitir el pinzamiento para la inducción de isquemia. Se utilizó una pinza de microaneurisma (B Braun, Suiza) para pinzar el pedículo renal (arteria y vena juntas utilizando una pinza) para bloquear el flujo sanguíneo al riñón e inducir isquemia renal. El éxito de la isquemia se confirmó mediante el cambio de color del riñón de rojo a violeta oscuro, que se produjo en unos pocos segundos. Tras la inducción de la isquemia (35–38 minutos), se retiró la pinza del microaneurisma. Se utilizó solución salina estéril tibia (~ 2 mL, 37°C) para lavar el contenido abdominal para rehidratar los tejidos antes del cierre de la herida. Después del lavado, se agregó i.p. 1 mL adicional de solución salina estéril como reemplazo de fluidos. Al iniciar la reperusión, la herida se cerró en dos capas (músculo y piel, por separado). A continuación, los animales se mantuvieron bajo una lámpara roja caliente hasta que se recuperaron por completo. Se volvió a administrar buprenorfina 1h y 4h después de la cirugía a una dosis de 0,1 mg/kg y también se incluyó en el agua de bebida (9,091 µg/mL). Después de 24 h, los animales se sacrificaron para su análisis. Las proteínas de fusión terapéuticas FP135 (EGF–HSA–C1; SEQ ID NO: x) se ensayaron en el modelo de AKI y se dosificaron a 1,5 mg/kg i.v. 30 min antes del inicio de la lesión por reperusión por isquemia. Se tomaron muestras de suero 24 horas después de la inducción de reperusión por isquemia y se analizaron para determinar el contenido de creatinina sérica y nitrógeno ureico en sangre (BUN) utilizando un analizador clínico Hitachi M40 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Axonlab, Suiza).

Ejemplos 12: EGF_HSA_C1 protege en el modelo de fibrosis hepática (modelo CCL4)

La fibrosis hepática es una respuesta de curación de heridas a varios tipos de agresiones. Si progresa, puede conducir a cirrosis hepática y más tarde a carcinoma hepatocelular (CHC). Las causas comunes de la fibrosis hepática en los países industrializados son el abuso de alcohol, las infecciones por hepatitis viral y los síndromes metabólicos debidos a la obesidad, la resistencia a la insulina y la diabetes.

La agresión prolongada da como resultado la inflamación y el depósito de proteínas de la matriz extracelular (MEC) por parte de células similares a miofibroblastos que son básicamente células estrelladas hepáticas activadas (HSC). Estas células producen actina de músculo liso alfa (α SMA) y depositan colágenos de tipo I y III, además de producir metaloproteinasas de matriz (MMP) e inhibidores tisulares (TIMP). A medida que la enfermedad se vuelve crónica, la

composición de la ECM cambia de colágenos tipo IV y VI, glicoproteínas y proteoglicanos a colágenos tipo I y III y fibronectina.

El hígado puede regenerarse si la lesión no es grave, por lo que los hepatocitos adultos vecinos son capaces de reemplazar las células apoptóticas o necróticas. La resolución de la fibrosis ocurre cuando las HSC activadas experimentan apoptosis o vuelven a un fenotipo más inactivo.

Existen varios modelos *in vivo* disponibles que intentan imitar varios aspectos de la enfermedad. El modelo de fibrosis hepática debe poder reflejar varias características patológicas y moleculares de la enfermedad humana, además de ser fácil de configurar y con buena reproducibilidad. Los modelos de fibrosis inducida por sustancias químicas son los más cercanos a estas características ideales, siendo una de ellas el modelo de fibrosis hepática con tetracloruro de carbono (CCl₄) en roedores. Tras la inyección intraperitoneal repetida de esta hepatoxina, se desarrolla una fibrosis hepática que demuestra una buena semejanza con la fibrosis hepática humana. Además, la retirada de la agresión da como resultado la resolución de la fibrosis y, por tanto, el modelo es reversible.

En la primera fase, la enzima CYP2E1 metaboliza CCl₄ para proporcionar el radical libre triclorometilo que contribuye a una reacción de fase aguda caracterizada por daño de las membranas lipídicas y orgánulos internos de los hepatocitos que finalmente conducen a la necrosis. La fibrosis hepática aguda mediada por CCl₄ se caracteriza entonces por la activación de las células de Kupffer y la inducción de una respuesta inflamatoria, que da como resultado la secreción de citocinas, quimiocinas y otros factores proinflamatorios. Esto a su vez atrae y activa monocitos, neutrófilos y linfocitos, lo que contribuye aún más a la necrosis hepática seguida de una fuerte respuesta regenerativa que da como resultado una proliferación sustancial de hepatocitos y células hepáticas no parenquimatosas alrededor de 48 horas después de la primera aplicación de CCl₄. La fibrosis histológica y las fibras cicatriciales aparecen 2 a 3 semanas después en una segunda fase de la enfermedad. Se puede observar una tercera fase con fibrosis extensa y acumulación masiva de grasa hepática y niveles séricos aumentados de triglicéridos y AST después de 4 a 6 semanas de lesión de CCl₄. La resolución completa de la fibrosis hepática inducida por CCl₄ en ratones se observa normalmente dentro de varias semanas después de la retirada de la toxina CCl₄. Un fármaco con la propiedad de acelerar la resolución de la fibrosis sería de particular relevancia para los pacientes con enfermedades establecidas. Por ejemplo en los pacientes con EHNA (esteatohepatitis no alcohólica) enfermedad renal crónica o esclerodermia que han establecido fibrosis, la demostración de la resolución de la fibrosis podría convertirse en un criterio de valoración clínico primario importante y puede permitir no solo detener la enfermedad

sino también restaurar la función orgánica. (Yanguaset al 2016 . Experimental models of liver fibrosis. Arch Toxicol. 2016; 90: 1025–1048. doi: 10.1007/s00204-015-1543-4.)

Modelo de fibrosis hepática CCL4:

Inducción de la enfermedad:

Se inyectó CCL₄ por vía intraperitoneal 3 veces por semana durante 6 semanas en ratones macho BALB/c de 8–12 semanas de edad a una dosis de 500 µL/kg recién diluidos en aceite de oliva. Países Bajos). Se administró CCL₄ durante un total de 6 semanas para inducir fibrosis hepática. El tratamiento con EGF_HSA_C1 (FP135) se inició después de 4 semanas o 5 semanas o 6 semanas de tratamiento con CCL₄. Se aplicó EGF_HSA_C1 (FP135) a 0,8 mg/kg 3 veces por semana por vía intraperitoneal hasta la finalización del experimento (3 días después de la cesación de CCL₄).

Lecturas:

Se midieron las enzimas hepáticas como ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) como una evaluación del daño hepático en muestras de suero obtenidas al detener CCL₄ (día 0) y después de 3 días al final del experimento. Se analizaron ALT y AST utilizando un analizador clínico Hitachi M40 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Axonlab, Suiza).

Para cuantificar el contenido de colágeno en el hígado de los animales, se realizó un ensayo de hidroxiprolina de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando el ensayo de colágeno total (QuickZyme Biosciences, Países Bajos). La expresión de los genes de colágeno COL1A1 y COL1A2 por qPCR se realizó como se describe en la sección 9.3.

La ecoelastografía se utilizó como un método no invasivo confiable y reproducible para evaluar la elasticidad del hígado (rigidez) y se ha demostrado que se correlaciona positivamente con la fibrosis hepática (Li, R., Ren, X., Yan, F. *et al.* Liver fibrosis detection and staging: a comparative study of T1p MR imaging and 2D real-time shear-wave elastography. *Abdom Radiol* **43**, 1713–1722 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00261-017-1381-3>). Además, esta técnica se utiliza en la clínica y puede ayudar a traducir mejor el resultado de los datos preclínicos a la enfermedad hepática humana con fibrosis. La rigidez del hígado se determinó mediante una evaluación de la elastografía de ondas de corte basada en ultrasonidos (SWE): SWE se realizó con un dispositivo Aixplorer® (Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, Francia). Para las adquisiciones, los ratones se anestesiaron con isoflurano (~ 1,5%) y se colocaron sobre una almohadilla térmica. La sonda de ultrasonido (modelo SL25–15, SuperSonic Imagine, ancho de banda 25 MHz, número de elementos 256) se colocó en un soporte y se acercó al hígado para las

evaluaciones. La sonda permitió una penetración suficiente de las ondas para adquisiciones tanto en modo B como SWE.

Para minimizar los artefactos de movimiento debidos a la respiración, se adquirieron elastogramas al espirar. Se adquirieron tres elastogramas por ratón y punto de tiempo. A continuación, se extrajo la rigidez media de los tres elastogramas. El examen de ultrasonido duró aproximadamente 5 min.

Ejemplo 13 Generación de MFG-E8 truncado en C2 (EGF-C1) y fusión HSA (EGF-HSA-C1); expresión y purificación.

Métodos para la generación de las proteínas descritas en el presente documento se describen a continuación.

El ADN se sintetizó en GeneArt (Regensburg, Alemania) y se clonó en un vector de expresión de mamífero utilizando técnicas de clonación basadas en la ligadura de enzimas de restricción. El plásmido resultante se transfectó en células HEK293T para la expresión transitoria de proteínas. En resumen, los vectores se transfectaron en células HEK293T adaptadas a la suspensión utilizando polietilenimina (PEI; Cat# 24765 Polysciences, Inc.). Normalmente, se transfectaron 100 mL de células en suspensión a una densidad de 1-2 Mio de células por mL con ADN que contenía 100 µg de vector de expresión que codifica la proteína de interés. A continuación, los vectores de expresión recombinantes se introdujeron en las células huésped y el constructo se produjo mediante el cultivo adicional de las células durante un período de 7 días para permitir la secreción en el medio de cultivo (HEK, medio libre de suero) suplementado con ácido plurónico al 0,1 %, glutamina 4 mM y antibiótico 0,25 µg/mL.

A continuación, los constructos producidos se purificaron a partir del sobrenadante libre de células mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC) o cromatografía de captura anti-HSA.

Cuando la proteína marcada con his fue capturada por IMAC, el medio acondicionado filtrado se mezcló con resina IMAC (GE Healthcare), equilibrada con NaPO₄ 20 mM, NaCl 0,5 Mn, imidazol 20 mM, pH 7,0. La resina se lavó tres veces con 15 volúmenes de columna de NaPO₄ 20 mM, NaCl 0,5 Mn, imidazol 20 mM, pH 7,0 antes de eluir la proteína con 10 volúmenes de columna de buffer de elución (NaPO₄ 20 mM, NaCl 0,5 Mn, imidazol 500 mM, pH 7,0).

Cuando la proteína se capturó mediante cromatografía anti-HSA, el medio acondicionado filtrado se mezcló con resina anti-HSA (matriz de afinidad Capture Select Human Albumin, Thermo), equilibrada con PBS, pH 7,4. La resina se lavó tres veces con 15 volúmenes de columna

de PBS, pH 7,4 antes de eluir la proteína con 10 volúmenes de columna de buffer de elución (citrato 50 mM, NaCl 90 mM, pH 2,5) y se neutralizó el pH usando TRIS 1 M pH 10,0.

Finalmente, las fracciones eluidas se pulieron mediante cromatografía de exclusión por tamaño (HiPrep Superdex 200, 16/60, GE Healthcare Life Sciences).

Se siguió el contenido de agregación durante el proceso de purificación mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño (Superdex 200 Increment 3,2/300 GL, GE Healthcare Life Sciences).

El nivel de agregación después del paso de captura y el rendimiento de la expresión después de la purificación de MFG-E8 truncado en C2 y la fusión HSA se muestran en la Tabla 10. La fusión HSA de MFG-E8 truncado en C2 muestra una mejora de al menos 40 veces en la expresión con respecto a MFG-E8 truncado en C2. Además, la fusión HSA de MFG-E8 truncado en C2 muestra al menos 4 veces menos agregación en comparación con MFG-E8 truncado en C2. Estos datos sugieren que la fusión HSA de MFG-E8 truncado en C2 exhibe mejores propiedades de producción en comparación con MFG-E8 truncado en C2. En consecuencia, la fusión de HSA parece tener mejor capacidad de desarrollo para su uso como fármaco.

Tabla 10: Nivel de agregación después del paso de captura y rendimiento de expresión después de la purificación de las proteínas EGF-C1 y EGF-HSA-C1

	SEQ ID	Agregación después del paso de captura (%)	Rendimiento de expresión después de la captura y pulido (mg/L)
EGF_C1	115	46,7	0,275
EGF_HSA_C1	73	10,8	11,575

Ejemplo 14: Dispersión de luz dinámica (DLS) de MFG-E8 truncado en C2 (EGF-C1) y fusión HSA (EGF-HSA-C1)

La propensión a la agregación de MFG-E8 truncado en C2 y la fusión HSA se midió mediante dispersión de luz dinámica (DLS, Wyatt). Se aplicó la dispersión dinámica de la luz para medir los coeficientes de difusión traslacional de la proteína en solución mediante la cuantificación de las fluctuaciones dinámicas en la luz dispersada. Como indicador de la formación de agregados, se midió el radio hidrodinámico bajo tensión térmica a una concentración de 3 mg/mL, utilizando

un lector de placas DynaPro™ (Wyatt Technology Europe GmbH, Dernbach, Alemania) combinado con el software DYNAMICS (versión 7.1.0.25, Wyatt). La solución de proteína se midió en una placa de 384 pocillos (placa de 384 pocillos redondos, poliestirol, Thermo Scientific, Langenselbold, Alemania).

Como se muestra en la Figura 23, el MFG-E8 truncado C2 muestra un radio hidrodinámico general más alto en comparación con la fusión HSA (5 nm frente a 80 nm a 25°C). Además, el MFG-E8 truncado en C2 muestra un fuerte aumento del radio hidrodinámico a partir de los 45°C, lo que indica una fuerte formación de agregación, mientras que la fusión HSA conserva el mismo radio hidrodinámico hasta al menos los 55°C. Estos datos sugieren que la fusión HSA de MFG-E8 truncado en C2 es más estable y exhibe mejores propiedades biofísicas en comparación con MFG-E8 truncado en C2. En consecuencia, la fusión de HSA parece tener mejor capacidad de desarrollo para su uso como fármaco.

En conjunto, estos datos demuestran que las proteínas de fusión de la presente descripción, por ejemplo con un inserto de dominio HSA, son funcionales y eficaces y, por lo tanto, se pueden utilizar como agentes terapéuticos.

Se entiende que los ejemplos y modalidades descritos en este documento son solo para fines ilustrativos y que se sugerirán a los expertos en la técnica diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos y se incluirán dentro del espíritu y alcance de la presente solicitud y alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas aquí se incorporan en el presente documento como referencia para todos los propósitos.