

## VARIANTES DE PROGRANULINA

### REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/953,099, presentada el 23 de diciembre de 2019 y la solicitud  
5 provisional estadounidense n.º 63/091,819, presentada el 14 de octubre de 2020, cuyas descripciones se incorporan a la presente mediante referencia en su totalidad y para todos los fines.

### LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se presentó por vía  
10 electrónica ascii y se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad. dicha copia en formato ascii, creada el 14 de diciembre de 2020, tiene como nombre 102342-003920PC-1219188\_SL.txt y un tamaño de 543 756 bytes.

### ANTECEDENTES

[0003] La demencia frontotemporal (FTD) es un trastorno neurodegenerativo  
15 progresivo que representa el 5-10 % de todos los pacientes con demencia y 10-20 % de los pacientes con una aparición de demencia antes de los 65 años de edad (Rademakers et ál., *Nat Rev Neurol.* 8(8):423-34, 2012). Si bien varios genes se han vinculado a la FTD, uno de los genes mutados con mayor frecuencia en la FTD es *GRN*, que se mapea al cromosoma humano 17q21 y codifica la proteína con alto  
20 contenido de cisteína progranulina (PGRN) (también conocida como proepitelina y acrogranina). Las mutaciones con gran penetración de *GRN* se informaron por primera vez en 2006 como causa de formas autosómicas dominantes de FTD familiar (Baker et ál., *Nature.* 442(7105):916-9, 2006; Cruts et ál., *Nature.* 24 de ago 2006;442(7105):920-4; Gass et ál., *Hum Mol Genet.* 15(20):2988-3001, 2006). Las  
25 estimaciones recientes sugieren que las mutaciones de *GRN* representan el 5-20 %

de los pacientes con FTD con historial familiar positivo y 1-5 % de casos esporádicos (Rademakers et ál., *supra*).

[0004] Después de la identificación de mutaciones de GRN como una causa de FTD, niveles reducidos de progranulina y la pérdida de la función de la progranulina se han vinculado con múltiples enfermedades y trastornos neurodegenerativos, incluida la enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD) esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y trastornos neurodegenerativos causados por una enfermedad del almacenamiento lisosomal (Petkau y Leavitt. 2014. *Trends Neurosci* 37(7):388-398). Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar terapias que puedan abordar los trastornos provocados por la pérdida de la función de progranulina o niveles reducidos de granulina, o trastornos para los cuales niveles mayores de progranulina son beneficiosos.

## COMPENDIO

[0005] Se proporcionan en la presente variantes de progranulina y proteínas de fusión que comprenden una progranulina o una variante de esta, y métodos de uso de tales variantes o proteínas de fusión para el tratamiento de cualquier enfermedad donde mayores niveles de progranulina sean beneficiosos, que incluyen una enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, FTD), aterosclerosis, un trastorno asociado con TDP-43, degeneración macular asociada con la edad (AMD) o un trastorno asociado con la progranulina. Las variantes de progranulina proporcionadas en la presente tienen modificaciones o adiciones al extremo C de una progranulina de tipo salvaje. Tal como se describe en la presente, las proteínas de fusión que contienen una variante de progranulina son menos susceptibles a la escisión del extremo C en la parte de progranulina de la proteína, en comparación con proteínas de fusión que contienen la progranulina de tipo salvaje cuando la proteína se expresa de manera recombinante y s purifica a partir de células ovario de hámster chino (CHO).

[0006] En un aspecto, la descripción proporciona una variante de progranulina que

comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:2 y una secuencia definida mediante  $X_1X_2X_3$  en la posición correspondiente a los residuos 574 a 576 de la SEQ ID NO:2, donde cada uno de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  es independientemente un aminoácido y juntos no son QLL. En algunas modalidades, la variante de progranulina tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:2. En algunas modalidades, la variante de progranulina tiene al menos 98 % de identidad (por ejemplo, al menos 99 %) con la SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, la variante de progranulina comprende una secuencia que tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:2. En algunas modalidades, la variante de progranulina comprende una secuencia que tiene al menos 98 % de identidad (por ejemplo, al menos 99 %) con la SEQ ID NO: 2.

[0007] En algunas modalidades de este aspecto, la variante de progranulina comprende la secuencia:

TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTSLRHLGGPCQVDAHCSAGH  
 SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQC  
 PDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT  
 PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMP  
 NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCP  
 DGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWM  
 EKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH  
 QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQT  
 CCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLA  
 RSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAG  
 FRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRX $_1X_2X_3$  (SEQ ID NO:3),

en la que  $X_1X_2X_3$  juntos no son QLL.

[0008] En algunas modalidades,  $X_1$  es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, L, F, Y, P o V. En algunas modalidades,  $X_2$  es H, K, D, E, S, T, N, Q, G, P, A, Y, V, I, F, L o R. En algunas modalidades,  $X_3$  es L, Y o P.

[0009] En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es  $X_1IL$ ,  $X_1FL$ ,  $X_1QL$ ,  $PX_2L$ ,  $QX_2L$  o  $VX_2L$ . En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es  $X_1X_2L$  y, en algunas modalidades,  $X_2$  en  $X_1X_2L$  es A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y o V.

[0010] En modalidades particulares  $X_1X_2X_3$  es PIL, PFL, QQL, VVL o VTL. En modalidades particulares  $X_1X_2X_3$  es PPL, PYL, QQL, QHL o QRL.

[0011] En otro aspecto, la descripción proporciona una variante de progranulina que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:2 y una secuencia definida mediante  $Y_1Y_2QLL$  (SEQ ID NO:137) que es adyacente y C terminal a la posición correspondiente al residuo 576 de la SEQ ID NO:2, donde  $Y_1$  es L o está ausente, e  $Y_2$  es R o está ausente.

[0012] En algunas modalidades, la variante de progranulina comprende la secuencia:

TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTSLRHLGGPCQVDAHCSAGH  
 SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQC  
 PDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT  
 PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMP  
 NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCP  
 DGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWM  
 EKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH  
 QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQT  
 CCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFLA  
 RSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAG  
 FRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLLY $Y_1Y_2QLL$  (SEQ ID NO:55).

[0013] En algunas modalidades,  $Y_1$  es L. En algunas modalidades,  $Y_2$  es R. En algunas modalidades  $Y_1$  e  $Y_2$  están ambos ausentes.

[0014] En otro aspecto, la descripción proporciona un polipéptido que comprende una variante de progranulina que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:2 y una secuencia definida mediante  $X_1X_2X_3$  en la posición correspondiente a los residuos 574 a 576 de la SEQ ID NO:2, donde cada uno de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  es independientemente un aminoácido y juntos no son QLL. En algunas modalidades, la variante de progranulina en un polipéptido tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad con la SEQ ID NO:2. En algunas modalidades, la variante de progranulina en un polipéptido comprende una secuencia que tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad con la SEQ ID NO:2.

[0015] En algunas modalidades de este aspecto, la variante de progranulina en el polipéptido comprende la secuencia:

TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTSLRHLGGPCQVDAHCSAGH  
 SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQC  
 PDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT  
 PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMP  
 NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCP  
 DGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWM  
 EKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH  
 QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQT  
 CCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEV VSAQPATFLA  
 RSPHVGKDV ECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAG  
 FRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> (SEQ ID NO:3).

donde  $X_1X_2X_3$  no es QQL.

[0016] En algunas modalidades de este aspecto,  $X_1$  es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, L, F, Y, P o V. En algunas modalidades,  $X_2$  es H, K, D, E, S, T, N, Q, G, P, A, Y, V, I, F, L o R. En algunas modalidades,  $X_3$  es L, Y o P.

[0017] En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es  $X_1IL$ . En determinadas modalidades  $X_1$  en  $X_1IL$  puede ser R, H, K, E, P, N, F o Y (por ejemplo, R, H, K, E o P).

[0018] En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es  $X_1FL$ . En determinadas modalidades  $X_1$  en  $X_1FL$  puede ser R, H, K, D, E, S, T, N, Q, L, F, Y o P.

[0019] En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es  $X_1QL$ . En determinadas modalidades  $X_1$  en  $X_1QL$  puede ser R, H, K, D, E, N, L, F, Y o Q.

10 [0020] En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es  $PX_2L$ . En determinadas modalidades  $X_2$  en  $PX_2L$  puede ser H, K, D, E, S, T, N, Q, G, P, A, Y, V, I, F, L o R (por ejemplo, H, K, D, E, S, T, N, Q, G, P, A, Y, V, I o F).

[0021] En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es  $QX_2L$ . En determinadas modalidades  $X_2$  en  $QX_2L$  puede ser R, H, K, D, E, N, P, Y o Q.

15 [0022] En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es  $VX_2L$ . En determinadas modalidades  $X_2$  en  $VX_2L$  puede ser V o T.

[0023] En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es  $X_1X_2L$ . En determinadas modalidades  $X_2$  en  $X_1X_2L$  es A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y o V.

20 [0024] En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es PIL. En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es PFL. En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es QQL. En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es VVL. En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es VTL. En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es PPL. En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es PYL. En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es QRL. En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es QHL.

[0025] En otro aspecto, la descripción proporciona un polipéptido que comprende una variante de progranulina, donde la variante de progranulina comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:2 y una  
 5 secuencia definida mediante Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>QLL (SEQ ID NO:137) que es adyacente y C terminal a la posición correspondiente al residuo 576 de la SEQ ID NO:2, donde Y<sub>1</sub> es L o está ausente, e Y<sub>2</sub> es R o está ausente. En algunas modalidades, el polipéptido comprende una variante de progranulina que tiene la secuencia:

TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGH  
 10 SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQC  
 PDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT  
 PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMP  
 NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCP  
 DGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWM  
 15 EKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH  
 QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQT  
 CCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFLA  
 RSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAG  
 FRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLLY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>QLL (SEQ ID NO:55).

20 [0026] En algunas modalidades, Y<sub>1</sub> es L. En algunas modalidades, Y<sub>2</sub> es R. En algunas modalidades Y<sub>1</sub> e Y<sub>2</sub> están ambos ausentes.

[0027] En algunas modalidades, un polipéptido descrito en la presente comprende, además, un polipéptido Fc que está unido a la variante de progranulina. El extremo N o el extremo C del polipéptido Fc puede unirse a la variante de progranulina. En  
 25 algunas modalidades, el polipéptido Fc está unido a la variante de progranulina a través de un enlace peptídico o enlazador polipeptídico. En algunas modalidades el enlazador polipeptídico es tiene una longitud de 1 a 50 (por ejemplo, 1 a 45, 1 a 40, 1 a 35, 1 a 30, 1 a 25, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 5 a 50, 10 a 50, 15 a 50, 20 a 50, 25

a 50, 30 a 50, 35 a 50, 40 a 50, 45 a 50, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 45) aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador polipeptídico es un enlazador polipeptídico flexible, por ejemplo, un enlazador rico en glicina. En determinadas modalidades, el enlazador rico en glicina es G<sub>4</sub>S (SEQ ID NO:90) o (G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:91).

[0028] En determinadas modalidades, el polipéptido Fc comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:64-67. En determinadas modalidades, el polipéptido Fc es un polipéptido Fc modificado que se une específicamente a un receptor de transferrina (TfR; es decir, un polipéptido Fc de unión a TfR). En algunas modalidades, el polipéptido Fc (es decir, un polipéptido Fc de unión a TfR) comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO:68-87 y 129-132 (por ejemplo, SEQ ID NO:70, 75, 80, 85 y 129-132).

[0029] En modalidades particulares, el polipéptido Fc (es decir, un polipéptido Fc de unión a TfR) comprende una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO:70, 75, 80, 85 y 129-132.

[0030] En otro aspecto, la descripción proporciona una proteína de fusión que comprende: (a) una variante de progranulina descrita en la presente; (b) un primer polipéptido Fc que se une a la variante de progranulina de (a); y (c) un segundo polipéptido Fc que forma un dímero del polipéptido Fc con el primer polipéptido Fc. En algunas modalidades de este aspecto, el segundo polipéptido Fc también se une a una progranulina de tipo salvaje o una variante de progranulina descrita en la presente (es decir, un segundo polipéptido de progranulina). La variante de progranulina unida al primer polipéptido Fc y la variante de progranulina unida al segundo polipéptido Fc puede ser la misma o diferente.

[0031] En algunas modalidades, el primer polipéptido Fc está unido a la variante de progranulina a través de un enlace peptídico o enlazador polipeptídico, y/o el segundo polipéptido Fc está unido a la variante de progranulina a través de un enlace peptídico



o enlazador polipeptídico. En algunas modalidades el enlazador polipeptídico es tiene una longitud de 1 a 50 (por ejemplo, 1 a 45, 1 a 40, 1 a 35, 1 a 30, 1 a 25, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 5 a 50, 10 a 50, 15 a 50, 20 a 50, 25 a 50, 30 a 50, 35 a 50, 40 a 50, 45 a 50, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 45) aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador polipeptídico es un enlazador polipeptídico flexible, por ejemplo, un enlazador rico en glicina. En determinadas modalidades, el enlazador rico en glicina es G<sub>4</sub>S (SEQ ID NO:90) o (G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:91).

[0032] En algunas modalidades de este aspecto, el extremo C del primer polipéptido Fc se une al extremo N de la progranulina y/o el extremo C del segundo polipéptido Fc se une al extremo N de la variante de progranulina.

[0033] En algunas modalidades, el primer polipéptido Fc o el segundo polipéptido Fc se unen específicamente a un receptor de transferrina. En determinadas modalidades, el primer polipéptido Fc o el segundo polipéptido Fc comprende independientemente una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:68-87 y 129-132. En determinadas modalidades, el primer polipéptido Fc o el segundo polipéptido Fc comprende independientemente una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO:70, 75, 80, 85 y 129-132.

[0034] En algunas modalidades, cada uno del primer polipéptido Fc y el segundo polipéptido Fc comprende modificaciones que promueven la heterodimerización. Por ejemplo, el primer polipéptido Fc comprende sustituciones T366S, L368A y Y407V y el segundo polipéptidos Fc que comprende una sustitución T366W, de acuerdo con la numeración EU. En algunas modalidades, el primer polipéptido Fc comprende una sustitución T366W y el segundo polipéptido Fc comprende sustituciones T366S, L368A y Y407V, de acuerdo con la numeración EU.

[0035] En algunas modalidades, el primer polipéptido Fc y/o el segundo polipéptido Fc comprende independientemente modificaciones que reducen la función efectora. En determinadas modalidades, las modificaciones que reducen la función efectora son

sustituciones L234A y L235A, de acuerdo con la numeración EU.

[0036] En algunas modalidades, el primer polipéptido Fc comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:64-67. En algunas modalidades, el segundo polipéptido Fc comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO:68-87 y 129-132 (por ejemplo, SEQ ID NO:70, 75, 80, 85 y 129-132).

[0037] En algunas modalidades del primer aspecto, el primer polipéptido Fc comprende sustituciones T366S, L368A y Y407V, y sustituciones L234A y L235A, y el segundo polipéptido Fc comprende una sustitución T366W y sustituciones L234A y L235A, de acuerdo con la numeración EU. En algunas modalidades, el primer polipéptido Fc comprende una sustitución T366W, y sustituciones L234A y L235A, y el segundo polipéptido Fc comprende sustituciones T366S, L368A y Y407V y sustituciones L234A y L235A, de acuerdo con la numeración EU.

[0038] En algunas modalidades de este aspecto, una región bisagra o una parte de esta está unida al primer polipéptido Fc y/o al segundo polipéptido Fc.

[0039] En algunas modalidades, la  $K_D$  para la unión a sortilina de la proteína de fusión es menor que alrededor de 100 nM (por ejemplo, menos que alrededor de 95 nM, 90 nM, 85 nM, 80 nM, 75 nM, 70 nM, 65 nM, 60 nM, 55 nM, 50 nM, 45 nM o 40 nM). En algunas modalidades, la  $K_D$  para la unión a sortilina de la proteína de fusión presenta una disminución menor que 10 veces en la unión a sortilina en comparación con una proteína de fusión que comprende la SEQ ID NO:2 en el primer polipéptido. En algunas modalidades, la  $K_D$  para la unión a sortilina de la proteína de fusión presenta una disminución menor que 5 veces en la unión a sortilina en comparación con una proteína de fusión que comprende la SEQ ID NO:2 en el primer polipéptido.

[0040] En algunas modalidades, la  $EC_{50}$  para la unión a sortilina de la proteína de fusión es menor que alrededor de 25 nM (por ejemplo, menos que alrededor de 20 nM,

15 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2,5 nM, 2 nM, 1,5 nM o 1 nM). En modalidades particulares, la EC50 para la unión a sortilina de la proteína de fusión presenta una disminución menor que 10 veces en la unión a sortilina en comparación con una proteína de fusión que comprende la SEQ ID NO:2 en el primer polipéptido. En determinadas modalidades, la EC50 se mide mediante ELISA, tal como se describe en la presente (por ejemplo, como se describen en el Ejemplo 4).

[0041] En algunas modalidades, la EC50 para la unión a sortilina de la proteína de fusión descrita en la presente presenta una disminución menor que 10 veces en la unión a sortilina en comparación con una proteína de fusión de referencia que comprende (i) un primer polipéptido que comprende la SEQ ID NO:2 y (ii) un segundo polipéptido Fc que forma un dímero de polipéptido Fc con el primer polipéptido Fc.

[0042] En algunas modalidades, la EC50 para la unión a sortilina de la proteína de fusión presenta una disminución menor que 10 veces en la unión a sortilina en comparación con una proteína de fusión de referencia que comprende (i) un primer polipéptido que comprende la SEQ ID NO:108 y (ii) un segundo polipéptido Fc que forma un dímero de polipéptido Fc con el primer polipéptido Fc.

[0043] En algunas modalidades, la proteína de fusión de referencia se produce en una célula HEK. En algunas modalidades, la proteína de fusión de referencia se purifica sustancialmente tal como se describe en la presente (por ejemplo, tal como se describen en el Ejemplo 1).

[0044] En algunas modalidades, la proteína de fusión se produce en una célula de ovario de hámster chino (CHO). En modalidades particulares, más que 50 % (por ejemplo, más que 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 %) de las proteínas de fusión no se escinde en el extremo C de la parte de la variante de progranulina de la proteína de fusión. En algunas modalidades, las proteínas de fusión se purifican a partir de un medio de cultivo celular que contiene las células que expresan la proteína de fusión mediante uno o más métodos

seleccionados del grupo que consiste en: cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de columna de interacción hidrofóbica y diálisis. En algunas modalidades, la proteína de fusión se purifica sustancialmente tal como se describe en la presente (por ejemplo, tal como se describen en el Ejemplo 1).

- 5 [0045] En otro aspecto, la descripción presenta una composición farmacéutica que comprende una variante de progranulina o proteína de fusión descrita en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable.

- [0046] En otro aspecto, la descripción presenta una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de una proteína de fusión descrita en la presente y un  
10 portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, más que 50 % (por ejemplo, más que 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %) de la pluralidad de proteínas de fusión comprende un extremo C intacto en la variante de progranulina de la proteína de fusión.

- [0047] En otro aspecto, la descripción presenta un método para tratar a un sujeto que  
15 tiene una enfermedad neurodegenerativa, aterosclerosis, un trastorno asociado con TDP-43, AMD o un trastorno asociado con progranulina que comprende la administración de una variante de progranulina descrita en la presente, una proteína de fusión descrita en la presente o una composición farmacéutica descrita en la presente al sujeto. En modalidades particulares, el sujeto tiene una enfermedad  
20 neurodegenerativa.

- [0048] En otro aspecto, la descripción presenta un método para aumentar la cantidad de una progranulina o una variante de esta en un sujeto, donde el método comprende la administración de una variante de progranulina descrita en la presente, o una proteína de fusión descrita en la presente o una composición farmacéutica descrita en  
25 la presente al sujeto. En determinadas modalidades, el sujeto tiene una enfermedad neurodegenerativa, aterosclerosis, un trastorno asociado con TDP-43, AMD o un trastorno asociado con progranulina. En modalidades particulares, el sujeto tiene una

enfermedad neurodegenerativa.

[0049] En otro aspecto, la descripción presenta un método para disminuir la actividad de catepsina D en un sujeto, donde el método comprende la administración de una variante de progranulina descrita en la presente, una proteína de fusión descrita en la presente o una composición farmacéutica descrita en la presente al sujeto. En determinadas modalidades, el sujeto tiene una enfermedad neurodegenerativa, aterosclerosis, un trastorno asociado con TDP-43, AMD o un trastorno asociado con progranulina. En modalidades particulares, el sujeto tiene una enfermedad neurodegenerativa.

10 [0050] En otro aspecto, la descripción presenta un método para aumentar la degradación lisosomal o mejorar la función lisosomal en un sujeto, donde el método comprende la administración de una variante de progranulina descrita en la presente, o una proteína de fusión descrita en la presente o una composición farmacéutica descrita en la presente al sujeto. En determinadas modalidades, el sujeto tiene una  
15 enfermedad neurodegenerativa, aterosclerosis, un trastorno asociado con TDP-43, AMD o un trastorno asociado con progranulina. En modalidades particulares, el sujeto tiene una enfermedad neurodegenerativa.

[0051] En algunas modalidades de los métodos descritos en la presente, la enfermedad neurodegenerativa es demencia frontotemporal (FTD), lipofuscinosis  
20 ceroides neuronal (NCL), enfermedad de Niemann-Pick de tipo A (NPA), enfermedad de Niemann-Pick de tipo B (NPB), enfermedad de Niemann-Pick de tipo C (NPC), FTD/esclerosis lateral amiotrófica (ELA) asociada con C9ORF72, ELA esporádica, enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Gaucher o enfermedad de Parkinson. En determinadas modalidades, la enfermedad neurodegenerativa es FTD.

25 [0052] Las modalidades también se refieren a métodos para tratar la FTD en un sujeto que lo necesite, donde el método comprende administrar una variante de progranulina o proteína de fusión descrita en la presente al sujeto. En algunas

modalidades, la FTD es una FTD asociada con C9ORF72.

[0053] En algunas modalidades de los métodos anteriores, el sujeto tiene una mutación en un gen que codifica la progranulina.

[0054] En otro aspecto, la descripción presenta un polinucleótido que comprende una  
5 secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de progranulina o polipéptido  
descrito en la presente. En otro aspecto, la descripción presenta un vector que  
comprende un polinucleótido descrito en la presente. En otro aspecto, la descripción  
presenta una célula hospedadora que comprende un polinucleótido o vector descrito  
en la presente. En algunas modalidades, la célula hospedadora comprende además  
10 un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un  
segundo polipéptido Fc. En determinadas modalidades, el segundo polipéptido Fc  
tiene una secuencia seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 61 y 64-87. En  
otro aspecto, la descripción presenta un método para producir un polipéptido, que  
comprende el cultivo de una célula hospedadora en condiciones en las que se expresa  
15 el polipéptido codificado por un polinucleótido descrito en la presente.

[0055] En otro aspecto, se proporciona un método para evaluar un compuesto o  
monitorear la respuesta de un sujeto a una variante de progranulina o una proteína de  
fusión descrita en la presente, o una composición farmacéutica o régimen de  
dosificación de esta, para tratar una enfermedad o un trastorno descrito en la presente,  
20 donde el método comprende: (a) medir una abundancia de una o más especies de  
bis(monoacilglicero)fosfato (BMP) y/o glucosilesfingosina (GlcSph) en una muestra de  
prueba de un sujeto que padece de un trastorno asociado con la progranulina, donde  
la muestra de prueba o sujeto se trató con el compuesto o composición farmacéutica  
de este (por ejemplo, se trató con una proteína de fusión descrita en la presente); (b)  
25 comparar la diferencia de la abundancia entre la o las especies de BMP y/o GlcSph  
medidas en (a) y uno o más valores de referencia; y (c) determinar, a partir de la  
comparación, si el compuesto, composición farmacéutica o régimen de dosificación de  
este (por ejemplo, una proteína de fusión de descrita en la presente) mejora los niveles

de una o más especies de BMP y/o el nivel de GlcSph para el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

[0056] En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente comprenden además tratar otra muestra de prueba o sujeto con otro compuesto y  
5 seleccionar un compuesto candidato que mejore los niveles de una o más especies de BMP y/o el nivel de GlcSph.

[0057] En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente comprenden además (d) mantener o ajustar la cantidad o frecuencia de administración del compuesto (por ejemplo, una proteína de fusión descrita en la presente) a la  
10 muestra de prueba o sujeto; y (e) administrar el compuesto a la muestra de prueba o al sujeto.

[0058] En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente comprenden además administrar al sujeto una variante de progranulina descrita en la presente para mejorar los niveles de la o las especies de BMP y/o el nivel de GlcSph  
15 para el tratamiento de un trastorno asociado con la progranulina. En algunas modalidades, al menos uno o más signos o síntomas de un trastorno asociado con la progranulina mejoran después del tratamiento.

[0059] En algunas modalidades, el tratamiento comprende administrar una proteína de fusión descrita en la presente al sujeto. En algunas modalidades, el tratamiento  
20 comprende administrar una biblioteca de compuestos a múltiples sujetos o muestras de ensayo.

[0060] En algunas modalidades, se puede medir la abundancia tanto de la o las especies de BMP y la abundancia de GlcSph a partir de la misma muestra de prueba del sujeto. En otras modalidades, se pueden tomar dos muestras de prueba (por  
25 ejemplo, tomarse al mismo tiempo o en momentos diferentes) del sujeto, en las cuales una muestra de prueba puede usarse para medir la abundancia de una o más especies

de BMP, mientras que la otra muestra de prueba puede usarse para medir la abundancia de GlcSph. Las dos muestras de prueba pueden tomarse del mismo fluido, célula o tejido del sujeto (por ejemplo, sangre entera, plasma, una célula, un tejido, suero, líquido cefalorraquídeo, fluido intersticial, esputo, orina o linfa). En otras

5 modalidades, las dos muestras de prueba pueden tomarse de diferentes fluidos, células o tejidos del sujeto, por ejemplo, una muestra puede ser de plasma, mientras que la otra muestra puede ser de tejido cerebral.

[0061] En algunas modalidades, el valor de referencia se mide en una muestra de referencia obtenida de un sujeto de referencia o una población de sujetos de referencia

10 (por ejemplo, un valor promedio). En algunas modalidades, el valor de referencia es la abundancia de la o las especies de BMP medida en una muestra de referencia. En algunas modalidades, el valor de referencia es la abundancia de GlcSph medida en una muestra de referencia. En algunas modalidades, la muestra de referencia es el mismo tipo de célula, tejido o fluido que la muestra de prueba. En algunas

15 modalidades, se miden al menos dos valores de referencia de distintos tipos de célula, tejido o fluido.

[0062] En algunas modalidades, la muestra de referencia es un control sano. En algunas modalidades, el sujeto de referencia o población de sujetos de referencia no tienen un trastorno asociado con la progranulina ni un nivel menor de progranulina. En

20 modalidades particulares, el sujeto de referencia o población de sujetos de referencia no tienen ningún signo ni síntoma de tal trastorno.

[0063] En algunas modalidades, los niveles de especies de BMP son mayores en macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) que se derivan *in vitro* de células de la médula ósea de un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer un trastorno

25 asociado con la progranulina en comparación con un control sano o un control no relacionado con un trastorno asociado con la progranulina.

[0064] En algunas modalidades, los niveles de especies de BMP son menores en el



hígado, cerebro, líquido cefalorraquídeo, plasma u orina de un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer un trastorno asociado con la progranulina en comparación con un control sano o un control no relacionado con un trastorno asociado con la progranulina.

- 5 [0065] En algunas modalidades, el nivel de GlcSph aumenta, por ejemplo, en sangre entera, plasma, una célula, un tejido, suero, líquido cefalorraquídeo, fluido intersticial, esputo, orina, linfa o una combinación de estos de un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer un trastorno asociado con la progranulina en comparación con un control sano o un control no relacionado con un trastorno asociado con la progranulina. En  
10 modalidades particulares, el nivel de GlcSph aumentado puede hallarse en el plasma del sujeto.

- [0066] En algunas modalidades, el nivel de GlcSph aumenta, por ejemplo, en el lóbulo frontal y/o lóbulo temporal del cerebro de un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer un trastorno asociado con la progranulina en comparación con un control  
15 sano o un control no relacionado con un trastorno asociado con la progranulina. En modalidades particulares, el nivel de GlcSph aumentado puede hallarse en una o más regiones del lóbulo frontal, por ejemplo, el giro frontal superior, el giro frontal medio, el giro frontal inferior y/o el giro precentral.

- [0067] En algunas modalidades, el nivel de GlcSph aumenta en una célula, tal como  
20 una célula sanguínea, una célula cerebral, una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), un macrófago derivado de médula ósea (BMDM), una célula de epitelio pigmentario de la retina (RPE), un eritrocito, un leucocito, un célula neuronal, una célula microglial, una célula de la corteza cerebral, una célula de la médula espinal, una célula de la médula ósea, una célula hepática, una célula renal, una célula  
25 esplénica, una célula de pulmón, una célula del ojo, una célula de vellosidad coriónica, una célula muscular, una célula cutánea, un fibroblasto, una célula cardíaca, una célula de nódulo linfático o una combinación de estas, de un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer un trastorno asociado con la progranulina en comparación con un control

sano o un control no relacionado con un trastorno asociado con la progranulina. En algunas modalidades, el nivel de GlcSph aumentado puede hallarse en una célula sanguínea. En algunas modalidades, el nivel de GlcSph aumentado puede hallarse en una célula cerebral.

- 5 [0068] En algunas modalidades, el nivel de GlcSph aumenta en un tejido, tal como tejido cerebral, tejido de corteza cerebral, tejido de médula espinal, tejido hepático, tejido renal, tejido muscular, tejido cardíaco, tejido ocular, tejido retinal, un ganglio linfático, médula ósea, tejido cutáneo, tejido de vaso sanguíneo, tejido pulmonar, tejido del bazo, tejido valvular o una combinación de estos, de un sujeto que padece o tiene
- 10 riesgo de padecer un trastorno asociado con progranulina en comparación con un control sano o un control no relacionado con un trastorno asociado con progranulina. En algunas modalidades, el nivel de GlcSph aumentado puede hallarse en tejido cerebral, tal como tejido cerebral del lóbulo frontal o del lóbulo temporal del cerebro del sujeto. En modalidades particulares, el nivel de GlcSph aumentado puede hallarse
- 15 en el giro frontal superior, el giro frontal medio, el giro frontal inferior y/o el giro precentral del lóbulo frontal.

- [0069] En modalidades adicionales, el nivel de GlcSph aumenta en un endosoma, un lisosoma, una vesícula extracelular, un exosoma, una microvesícula o una combinación de estos de un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer un trastorno
- 20 asociado con la progranulina en comparación con un control sano o un control no relacionado con un trastorno asociado con la progranulina.

- [0070] En algunas modalidades, la abundancia de una especie de BMP y/o GlcSph en la muestra de prueba de un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer un trastorno asociado con la progranulina tiene una diferencia de al menos alrededor de
- 25 1,2 veces, 1,5 veces o 2 veces en comparación con un valor de referencia de un control tal como un control sano o un control no relacionado con un trastorno asociado con la progranulina. En otras modalidades, la abundancia de una especie de BMP y/o GlcSph en la muestra de prueba de un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer un

trastorno asociado con la progranulina tiene una diferencia de alrededor de 1,2 veces a alrededor de 5 veces (por ejemplo, alrededor de 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces o 5 veces) en comparación con un valor de referencia de un control tal como un control sano o un control no relacionado con un trastorno asociado con la progranulina. En algunas modalidades, la diferencia en comparación con un valor de referencia des de alrededor de 2 veces a alrededor de 3 veces (por ejemplo, alrededor de 2 veces, 2,1, veces, 2,2 veces, 2,3 veces, 2,4 veces, 2,5 veces, 2,6 veces, 2,7 veces, 2,8 veces, 2,9 veces o 3 veces). En algunas modalidades, el sujeto tiene un trastorno asociado con un nivel reducido de progranulina y/o uno o más signos o síntomas de un trastorno asociado con un nivel reducido de progranulina.

[0071] En algunas modalidades, el valor de referencia es el valor de la especie de BMP y/o el valor de GlcSph antes del tratamiento. En algunas modalidades, el sujeto recibe tratamiento para un nivel reducido de progranulina o un trastorno asociado con la progranulina, y la muestra de prueba comprende una o más muestras de ensayo previas al tratamiento que se obtienen del sujeto antes del comienzo del tratamiento y una o más muestras de ensayo posteriores al tratamiento que se obtienen del sujeto después de haber comenzado el tratamiento. En algunas modalidades, el método comprende además determinar que el sujeto responde al tratamiento cuando la abundancia de al menos una de la o las especies de BMP y/o GlcSph después del tratamiento muestra una mejora con respecto a la o las especies de BMP y/o GlcSph antes del tratamiento en comparación con un control sano.

[0072] En algunas modalidades, los métodos comprenden (a) medir una abundancia de una o más especies de BMP y/o GlcSph en una muestra de prueba obtenida de un sujeto; (b) tratar a la muestra de prueba o al sujeto con un compuesto, composición farmacéutica o régimen de dosificación de este (por ejemplo, tratar a la muestra de prueba o al sujeto con una proteína de fusión de dímero de Fc:PGRN descrita en la presente); (c) medir una abundancia de una o más especies de BMP y/o GlcSph en una muestra de prueba obtenida del sujeto tratado; (d) comparar la abundancia de la

o las especies de BMP y/o GlcSph medida en las etapas (a) y (c); y (e) determinar si el compuesto o un régimen de dosificación mejora los niveles de BMP y/o GlcSph para el tratamiento de un trastorno asociado con la progranulina.

[0073] En algunas modalidades, se obtienen dos o más muestras de ensayo posteriores al tratamiento en puntos temporales distintos después de haber comenzado el tratamiento, y el método comprende además determinar que el sujeto responde al tratamiento cuando la abundancia de al menos una de las especies de BMP medida en una muestra posterior al tratamiento es a) menor en BMDM o b) mayor en el hígado, cerebro, líquido cefalorraquídeo, plasma u orina que la abundancia de las especies de BMP correspondientes medida en la muestra previa al tratamiento. En algunas modalidades, se determina que el sujeto responde al tratamiento cuando la abundancia de al menos una de las especies de BMP medida en una muestra posterior al tratamiento es a) al menos alrededor de 1,2 veces menor en BMDM o b) al menos alrededor de 1,2 veces mayor en el hígado, cerebro, líquido cefalorraquídeo, plasma u orina que la abundancia de la o las especies de BMP correspondientes medida en la muestra previa al tratamiento.

[0074] En algunas modalidades, se obtienen dos o más muestras de ensayo posteriores al tratamiento en puntos temporales distintos después de haber comenzado el tratamiento, y el método comprende además determinar que el sujeto responde al tratamiento cuando la abundancia de GlcSph medida en una muestra posterior al tratamiento es menor, por ejemplo, en sangre entera, plasma, una célula, un tejido, suero, líquido cefalorraquídeo, fluido intersticial, esputo, orina o linfa que la abundancia en GlcSph medida en la muestra antes del tratamiento. En algunas modalidades, se determina que el sujeto responde al tratamiento cuando la abundancia de GlcSph medida en una muestra después del tratamiento es al menos 1,2 veces (por ejemplo, al menos alrededor de 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces o 10 veces) menor, por ejemplo, en sangre entera, plasma, una célula, un tejido, suero, líquido cefalorraquídeo, fluido

intersticial, esputo, orina o linfa que la abundancia de GlcSph medida en la muestra antes del tratamiento.

[0075] En algunas modalidades, el nivel mejorado de las especies de BMP y/o el nivel de GlcSph es una mejora con respecto al nivel de las especies de BMP y/o el nivel de GlcSph previo al tratamiento con respecto al valor de referencia de un control tal como un control sano o un control no relacionado con un trastorno asociado con la progranulina. En algunas modalidades, valor del nivel mejorado de las especies de BMP y/o el nivel de GlcSph es más cercano al control que el nivel de las especies de BMP y/o el nivel de GlcSph previo al tratamiento con respecto al control. En algunas modalidades, el nivel mejorado de las especies de BMP y/o el nivel de GlcSph tiene una diferencia en comparación con el control menor que 20 %, 15 %, 10 % o 5 %. En algunas modalidades, el nivel mejorado de las especies de BMP y/o el nivel de GlcSph tiene una diferencia en comparación con el control sano menor que 10 % o 5 %. En algunas modalidades, el nivel mejorado de las especies de BMP y/o el nivel de GlcSph tiene una diferencia en comparación con el control sano menor que 5 %.

[0076] En algunas modalidades, el método comprende además determinar que el sujeto responde al tratamiento cuando la abundancia de al menos una de una o más especies de BMP y/o GlcSph medida en al menos una de las muestras de ensayo posterior al tratamiento es aproximadamente igual al valor de referencia correspondiente a un control sano.

[0077] En algunas modalidades, la muestra de prueba o de referencia, o uno o más valores de referencia, comprende o se relaciona a una célula, tejido, sangre entera, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido intersticial, esputo, orina, heces, líquido de lavado broncoalveolar, linfa, semen, leche materna, líquido amniótico o una combinación de estos. En algunas modalidades, la célula es una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), un BMDM, una célula de epitelio pigmentario de la retina (RPE), una célula sanguínea, un eritrocito, un leucocito, un célula neuronal, una célula microglial, una célula cerebral, una célula de la corteza cerebral, una célula de la

médula espinal, una célula de la médula ósea, una célula hepática, una célula renal, una célula esplénica, una célula de pulmón, una célula del ojo, una célula de vellosidad coriónica, una célula muscular, una célula cutánea, un fibroblasto, una célula cardíaca, una célula de nódulo linfático o una combinación de estas. En algunas modalidades, la célula es una célula cultivada. En algunas modalidades, la célula cultivada es una célula de BMDM o RPE.

[0078] En algunas modalidades, el tejido comprende tejido cerebral, tejido de la corteza cerebral, tejido de la médula espinal, tejido hepático, tejido renal, tejido muscular, tejido cardíaco, tejido ocular, tejido retiniano, un nódulo linfático, médula espinal, tejido cutáneo, tejido de vaso sanguíneo, tejido pulmonar, tejido de bazo, tejido valvular o una combinación de estos. En algunas modalidades, la muestra de prueba y/o referencia se purifica a partir de una célula y/o un tejido y comprende un endosoma, un lisosoma, una vesícula extracelular, un exosoma, una microvesícula o una combinación de estos.

[0079] En algunas modalidades, la o las especies de BMP comprenden dos o más especies de BMP. En algunas modalidades, la o las especies de BMP comprenden BMP(16:0\_18:1), BMP(16:0\_18:2), BMP(18:0\_18:0), BMP(18:0\_18:1), BMP(18:1\_18:1), BMP(16:0\_20:3), BMP(18:1\_20:2), BMP(18:0\_20:4), BMP(16:0\_22:5), BMP(20:4\_20:4), BMP(22:6\_22:6), BMP(20:4\_20:5), BMP(18:2\_18:2), BMP(16:0\_20:4), BMP(18:0\_18:2), BMP(18:0e\_22:6), BMP(18:1e\_20:4), BMP(18:3\_22:5), BMP(20:4\_22:6), BMP(18:0e\_20:4), BMP(18:2\_20:4), BMP(18:1\_22:6), BMP(18:1\_20:4), BMP(18:0\_22:6) o una combinación de estas.

[0080] En algunas modalidades, la o las especies de BMP comprenden BMP(18:1\_18:1), BMP(18:0\_20:4), BMP(20:4\_20:4), BMP(22:6\_22:6), BMP(20:4\_22:6), BMP(18:1\_22:6), BMP(18:1\_20:4), BMP(18:0\_22:6), BMP(18:3\_22:5) o una combinación de estas.

[0081] En algunas modalidades, la muestra de prueba comprende una célula cultivada y la o las especies de BMP comprenden BMP(18:1\_18:1). En algunas modalidades, la muestra de prueba comprende plasma, tejido, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR) y/o tejido cerebral o hepático, y la o las especies de BMP comprenden BMP(22:6\_22:6). En algunas modalidades, la muestra de prueba comprende tejido hepático y la o las especies de BMP comprenden BMP(22:6\_22:6), BMP(18:3\_22:5) o una combinación de estas. En algunas modalidades, la muestra de prueba comprende LCR u orina y la o las especies de BMP comprenden BMP(22:6\_22:6). En algunas modalidades, la muestra de prueba comprende microglías y la o las especies de BMP comprenden BMP(18:3\_22:5).

[0082] En algunas modalidades, la abundancia de la o las especies de BMP y/o GlcSph se mide mediante el uso de cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). En algunas modalidades, se usa un estándar interno de BMP y/o GlcSph para medir la abundancia de la o las especies de BMP y/o GlcSph en la etapa (a) y/o determinar el valor de referencia correspondiente. En algunas modalidades, el estándar interno de BMP y/o GlcSph comprende una especie de BMP y/o GlcSph que no se encuentra presente naturalmente en el sujeto y/o el sujeto de referencia o población de sujetos de referencia. En algunas modalidades, el estándar interno de BMP comprende BMP(14:0\_14:0). En algunas modalidades, el estándar de GlcSph interno comprende una GlcSph marcada con deuterio.

[0083] En algunas modalidades, el sujeto padece o tiene riesgo de padecer un trastorno relacionado con la expresión, procesamiento, glicosilación, absorción celular, tráfico y/o función de la progranulina. En algunas modalidades, el sujeto y/o el sujeto de referencia o población de sujetos de referencia tienen un nivel reducido de progranulina y/o un trastorno asociado con un nivel reducido de progranulina, y la muestra de prueba entró en contacto con un compuesto candidato (por ejemplo, una proteína de fusión de dímero de Fc:PGRN descrita en la presente). En algunas modalidades, el sujeto y/o el sujeto de referencia o población de sujetos de referencia tienen uno o más signos o síntomas del trastorno asociado con un nivel reducido de

progranulina. En algunas modalidades, el sujeto y/o el sujeto de referencia o población de sujetos de referencia tienen una mutación en un gen de granulina (*GRN*). En algunas modalidades, la mutación en el gen *GRN* reduce la expresión y/o actividad de la progranulina. En algunas modalidades, el sujeto padece o tiene riesgo de desarrollar

5 aterosclerosis, enfermedad de Gaucher (por ejemplo, enfermedad de Gaucher de tipos 1, 2 o 3) o AMD. En algunas modalidades, el sujeto padece o tiene riesgo de desarrollar un trastorno asociado con TDP-43 (por ejemplo, AD o ELA).

[0084] En algunas modalidades, el sujeto y/o el sujeto de referencia es un ser humano, un primate no humano, un roedor, un perro o un cerdo.

10 [0085] En otro aspecto, la presente descripción proporciona un kit para monitorear el nivel de una variante de progranulina en un sujeto. En algunas modalidades, el kit comprende un estándar de BMP y/o GlcSph para medir la abundancia de una o más especies de BMP y/o GlcSph en una muestra de prueba obtenida del sujeto y/o una muestra de referencia obtenida de un sujeto de referencia o una población de sujetos

15 de referencia. En algunas modalidades, el estándar de BMP y/o GlcSph comprende una especie de BMP y/o GlcSph que no se encuentra presente naturalmente en el sujeto y/o el sujeto de referencia. En algunas modalidades, el estándar de BMP comprende BMP(14:0\_14:0). En algunas modalidades, el estándar de GlcSph es una GlcSph marcada con deuterio.

20 [0086] En algunas modalidades, el kit comprende además reactivos para obtener la muestra del sujeto y/o sujeto de referencia, procesar la muestra, medir la abundancia de la o las especies de BMP, medir la abundancia de GlcSph o una combinación de estos. En algunas modalidades, el kit comprende además instrucciones de uso.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 [0087] La FIG. 1A y la FIG. 1B muestra trazas de cromatografía que demuestran que las proteínas de fusión ilustrativas tal como se describen en la presente tienen una



pureza mayor que 98 %.

[0088] La FIG. 2 muestra una tabla que demuestra las propiedades térmicas de proteínas de fusión ilustrativas tal como se describen en la presente en diferentes amortiguadores.

- 5 [0089] La FIG. 3 incluye cromatogramas que incluyen la estabilidad de congelado-descongelado de proteínas de fusión ilustrativas tal como se describen en la presente.

[0090] La FIG. 4 es un gráfico que ilustra la unión a sortilina de las proteínas de fusión ilustrativas descritas en la presente.

- 10 [0091] La FIG. 5 es un gráfico que ilustra proteínas de fusión ilustrativas tal como se describen en la presente pueden reducir los niveles de BMP *in vitro* en células cultivadas obtenidas de la médula ósea de ratones *GRN KO/hTfR.KI*.

[0092] Las FIG. 6A-6C muestran gráficas de concentraciones de proteína de una proteína de fusión ilustrativa descrita en la presente en plasma (período de 7 días) y en el cerebro e hígado (7 días después de la dosis) de ratones *GRN KO/hTfR.KI*.

- 15 [0093] Las FIG. 7A y 7B incluyen gráficas representativas de los niveles de TREM2 en el cerebro e hígado de ratones *GRN KO/hTfR.KI* a los 7 días después de la dosis después de la administración de una proteína de fusión ilustrativa descrita en la presente.

- 20 [0094] Las FIG. 8A y 8B incluyen gráficas representativas de los niveles de BMP en el cerebro e hígado de ratones *GRN KO/hTfR.KI* a los 7 días después de la dosis después de la administración de una proteína de fusión ilustrativa descrita en la presente.

[0095] La FIG. 9 es un gráfico que ilustra que Fusión 1, tal como se describe en la presente, puede reducir el nivel de GlcSph en el cerebro de ratones *GRN KO/hTfR.KI*.

[0096] La FIG. 10 es un gráfico que ilustra que Fusión 1, tal como se describe en la presente, puede reducir el nivel de GlcSph en el cerebro de ratones *GRN* KO/hTfR.KI.

[0097] La FIG. 11 es un gráfico que ilustra que Fusión 1, tal como se describe en la presente, puede corregir los niveles de BMP di-18:1 en ratones *GRN* KO/hTfR.KI.

5 [0098] La FIG. 12 es un gráfico que ilustra que Fusión 1, tal como se describe en la presente, puede corregir los niveles de BMP di-22:6 en ratones *GRN* KO/hTfR.KI.

[0099] La FIG. 13 es un gráfico que ilustra que Fusión 1, tal como se describe en la presente, puede corregir la actividad de glucocerebrosidasa (GCase) en el cerebro de ratones *GRN* KO/hTfR.KI a niveles de tipo salvaje a las dos semanas después de la  
10 dosis.

[0100] La FIG. 14 es un gráfico de dispersión que ilustra los niveles de proteínas en el cerebro de proteínas de fusión ilustrativas descritas en la presente en ratones *GRN* KO/hTfR.KI después de ocho dosis semanales. La figura muestra media  $\pm$  SEM y valores p: ANOVA unidireccional con prueba de comparación múltiple de Dunnet; \*\*\*\*  
15  $p < 0,0001$ .

[0101] La FIG. 15 es un gráfico de dispersión que ilustra los niveles de proteínas en el hígado de proteínas de fusión ilustrativas descritas en la presente en ratones *GRN* KO/hTfR.KI después de ocho dosis semanales. La figura muestra media  $\pm$  SEM y valores p: ANOVA unidireccional con prueba de comparación múltiple de Dunnet; \*\*  
20  $p < 0,01$  y \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

[0102] La FIG. 16 es un gráfico de dispersión que ilustra los niveles de una especie de BMP representativa en los cerebros de ratones *GRN* KO/hTfR.KI después de ocho dosis semanales de proteínas de fusión ilustrativas descritas en la presente. La figura muestra media  $\pm$  SEM y valores p: ANOVA unidireccional con prueba de comparación múltiple de Dunnet; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .  
25

[0103] La FIG. 17 es un gráfico de dispersión que ilustra los niveles en LCR de una especie de BMP representativa en ratones *GRN* KO/hTfR.KI después de ocho dosis semanales de proteínas de fusión ilustrativas descritas en la presente. La figura muestra media  $\pm$  SEM y valores p: ANOVA unidireccional con prueba de comparación múltiple de Dunnet; \*  $p < 0,05$  y \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

[0104] La FIG. 18 es un gráfico de dispersión que ilustra los niveles de una especie de BMP representativa en los hígados de ratones *GRN* KO/hTfR.KI después de ocho dosis semanales de proteínas de fusión ilustrativas descritas en la presente.

[0105] La FIG. 19 es un gráfico de dispersión que ilustra los niveles en plasma de una especie de BMP representativa en ratones *GRN* KO/hTfR.KI después de ocho dosis semanales de proteínas de fusión ilustrativas descritas en la presente.

[0106] La FIG. 20 es un gráfico de dispersión que ilustra los niveles de glucosilesfingosina (GlcSph) en el cerebro en ratones *GRN* KO/hTfR.KI después de ocho dosis semanales de proteínas de fusión ilustrativas descritas en la presente. La figura muestra media  $\pm$  SEM y valores p: ANOVA unidireccional con prueba de comparación múltiple de Dunnet; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

[0107] La FIG. 21 es un gráfico de dispersión que ilustra los niveles de glucosilesfingosina (GlcSph) en el hígado en ratones *GRN* KO/hTfR.KI después de ocho dosis semanales de proteínas de fusión ilustrativas descritas en la presente.

[0108] La FIG. 22 es un gráfico de dispersión que ilustra los niveles de neurofilamento de LCR (Nf-L) en ratones *GRN* KO/hTfR.KI después de ocho dosis semanales de proteínas de fusión ilustrativas descritas en la presente.

[0109] La FIG. 23 es un gráfico de dispersión que ilustra los niveles relativos de Trem2 en el cerebro en ratones *GRN* KO/hTfR.KI después de ocho dosis semanales de proteínas de fusión ilustrativas descritas en la presente. La figura muestra los

valores medios  $\pm$  SEM y p: ANOVA unidireccional con prueba de comparación múltiple Dunnet; \*  $p < 0,05$  y \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

[0110] La FIG. 24 es un gráfico de dispersión que ilustra los niveles relativos de CD68 en el cerebro en ratones *GRN* KO/hTfR.KI después de ocho dosis semanales de proteínas de fusión ilustrativas descritas en la presente. La figura muestra media  $\pm$  SEM y valores p: ANOVA unidireccional con prueba de comparación múltiple de Dunnet; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

[0111] La FIG. 25 es un gráfico de dispersión que ilustra los niveles relativos de Iba1 en el cerebro en ratones *GRN* KO/hTfR.KI después de ocho dosis semanales de proteínas de fusión ilustrativas descritas en la presente.

[0112] La FIG. 26 es un gráfico de dispersión que ilustra los niveles relativos de GFAP en el cerebro en ratones *GRN* KO/hTfR.KI después de ocho dosis semanales de proteínas de fusión ilustrativas descritas en la presente.

[0113] La FIG. 27 es un mapa térmico que ilustra los cambios relativos en las especies de BMP y los lípidos en ratones *GRN* KO/hTfR.KI después de ocho dosis semanales de proteínas de fusión ilustrativas descritas en la presente.

[0114] Las FIG. 28-30 proporcionan gráficos de dispersión que ilustran los niveles de una especie de BMP representativa en neuronas, astrocitos y células microgliales de ratones *GRN* KO/hTfR.KI después de ocho dosis semanales de una proteína de fusión ilustrativa descrita en la presente.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### I. INTRODUCCIÓN

[0115] Aumentar los niveles de progranulina puede ser útil para tratar una cantidad de enfermedades en sujetos, en particular cuando el sujeto tiene niveles reducidos de

progranulina. Los inventores descubrieron que el extremo C de progranulina de tipo salvaje se escinde cuando se expresa en células CHO, lo que da como resultado una unión alterada a sortilina. La sortilina se une directamente a progranulina y está implicada en la absorción y tráfico de progranulina a lisosomas celulares. Para reducir esta escisión, los inventores desarrollaron variantes de progranulina que tienen modificaciones de aminoácidos en el extremo C, así como proteínas de fusión que incluyen una o más variantes de progranulina unidas a un polipéptido Fc. Específicamente, ciertas variantes descritas en la presente tienen una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia QLL en el extremo C de la progranulina de tipo salvaje o tienen aminoácidos adicionales añadidos al extremo C, en comparación con la progranulina de tipo salvaje, lo que es más importante, estas variantes de progranulina pueden mantener la unión a sortilina. Las variantes de progranulina y las proteínas de fusión descritas en la presente son, por lo tanto, adecuadas para el tratamiento de tales enfermedades, que incluyen enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, FTD), aterosclerosis, un trastorno asociado con TDP-43, AMD o un trastorno asociado con progranulina.

[0116] Además de desarrollar estas variantes de progranulina, también hemos desarrollado proteínas de fusión que contienen una variante de progranulina fusionada a una molécula Fc. En algunos casos, la proteína de fusión incluye un polipéptido Fc dimérico, donde al menos uno de los monómeros del polipéptido Fc está unido a la variante de progranulina. Los polipéptidos Fc pueden aumentar los niveles de progranulina y, en algunos casos, pueden modificarse de manera que confieran propiedades funcionales adicionales a la proteína.

[0117] Los inventores también desarrollaron proteínas de fusión que facilitan la administración de una progranulina o una variante de esta a través de la barrera hematoencefálica (BBB). Estas proteínas comprenden un polipéptido Fc y un polipéptido Fc modificado que forman un dímero, y una progranulina o una variante de esta unida a la región Fc y/o la región Fc modificada. La región Fc modificada puede unirse específicamente a un receptor de la BBB, tal como TfR. Cuando se administra

a un sujeto, la proteína de fusión se une al receptor TfR, que está presente en el endotelio que forma la BBB. La proteína de fusión puede experimentar transcitosis a través de la BBB, mediante lo cual aumenta su concentración en el cerebro, en comparación, por ejemplo, con un

- 5 [0118] La progranulina (PGRN) (también conocida como proepitelina y acrogranina) es una proteína con alto contenido de cisteína codificada por el gen *GRN*, que se mapea al cromosoma humano 17q21. La progranulina es una proteína lisosomal y una proteína secretada que consiste en siete repeticiones en tándem y media de péptidos de granulina conservados, cada uno de los cuales tiene una longitud de alrededor de
- 10 60 aminoácidos y puede liberarse mediante escisión a través de diversas proteasas (por ejemplo, elastasa) y proteasas lisosomales (por ejemplo, catepsina L) (Kao et ál., *Nat Rev Neurosci.* 18(6):325-333, 2017). Generalmente, se considera que la progranulina desempeña papeles tanto autónomos como no autónomos en la célula en el control de la inmunidad innata, así como la función de los lisosomas, donde regula
- 15 la actividad y los niveles de diversas catepsinas y otras hidrolasas (Kao et ál., *supra*). La progranulina también tiene una función neurotrófica y promueve el sobrecrecimiento de neuritas, así como la supervivencia neuronal (Kao et ál., *supra*).

## II. DEFINICIONES

- [0119] Como se usan en la presente, las formas singulares “un”, “uno” y “el” incluyen
- 20 los referentes plurales, a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, una referencia a «un polipéptido» puede incluir dos o más de dichas moléculas, y similares.

- [0120] Tal como se utilizan en la presente, los términos “alrededor de” y “aproximadamente”, cuando se utilizan para modificar una cantidad especificada en un
- 25 valor o intervalo numérico, indican que el valor numérico, así como también desviaciones razonables del valor conocido por el experto en la técnica, por ejemplo,  $\pm 20\%$ ,  $\pm 10\%$  o  $\pm 5\%$ , se encuentran dentro del significado previsto del valor

establecido.

[0121] “Progranulina” o “PRGN” se refiere a una proteína lisosomal con alto contenido de cisteína codificada por el gen *GRN*. Una progranulina puede comprender una secuencia de progranulina humana, por ejemplo, la secuencia de la SEQ ID NO:1 o 2. Una progranulina puede comprender la secuencia de la SEQ ID NO:1, donde los primeros 17 aminoácidos indican el péptido señal. Una progranulina puede ser una progranulina madura en la cual se escinde el péptido señal de 17 aminoácidos. Una progranulina madura puede comprender la secuencia de la SEQ ID NO:2. Una progranulina puede incluir una secuencia de una especie no humana, por ejemplo, ratón (n.º de acceso NP\_032201.2), rata (NP\_058809.2 o NP\_001139314.1) y chimpancé (XP\_016787144.1 o XP\_016787145.1) ya sea en una forma que contiene el péptido señal o en una forma madura.

[0122] Una “variante de progranulina” o “variante de PRGN” se refiere a una variante de secuencia de una progranulina de tipo salvaje. Una variante de progranulina puede tener funciones similares o sustancialmente las mismas funciones que las de una progranulina de tipo salvaje, por ejemplo, donde la variante de progranulina también se une a sortilina o prosaposina, regula la actividad y los niveles de diversas proteínas lisosomales (por ejemplo, catepsinas), promueve el sobrecrecimiento de neuritas y supervivencia neuronal, y/o cualquier otra función descrita en la presente.

[0123] La expresión “trastorno asociado con la progranulina” hace referencia a cualquier afección patológica relacionada con la progranulina que incluye la expresión, procesamiento, glicosilación, absorción celular, intercambio y/o función. La expresión “trastorno asociado con un nivel reducido de progranulina” hace referencia a cualquier afección patológica que sea resultado directo o indirecto de un nivel de progranulina que es insuficiente para permitir (es decir, es demasiado bajo como para permitir) la función fisiológica normal dentro de una célula, un tejido y/o un sujeto, así como los precursores de este tipo de afección. Por ejemplo, el trastorno asociado con progranulina puede estar causado por o asociado con una mutación en el gen de

progranulina (*GRN*). En algunas modalidades, el trastorno asociado con la progranulina es una enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, FTD) o un trastorno de depósito lisosomal.

[0124] La expresión “nivel de progranulina” hace referencia a la cantidad, 5 concentración y/o nivel de actividad de progranulina que está presente, ya sea en un sujeto o en una muestra (por ejemplo, una muestra obtenida de un sujeto). Un nivel de progranulina puede hacer referencia a una cantidad, concentración y/o nivel de actividad absolutos de progranulina que se encuentra presente, o puede hacer referencia a una cantidad, concentración y/o nivel de actividad relativos. La expresión 10 también hace referencia a la cantidad o concentración de una progranulina y/o ARNm de progranulina (por ejemplo, expresado de un gen *GRN*) que se encuentra presente.

[0125] La expresión “macrófago derivado de la médula ósea” o “BMDM” hace referencia a una célula de macrófago que se genera o deriva *in vitro* de una médula ósea de mamífero (por ejemplo, una médula ósea obtenida de un sujeto). A modo de 15 ejemplo no taxativo, los BMDM pueden generarse mediante cultivo de células de médula ósea no diferenciadas en presencia de una citocina tal como factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF).

[0126] Como se utiliza en el contexto de la presente descripción, un “receptor de transferrina” o “TfR” hace referencia a una proteína del receptor de transferrina 1. La 20 secuencia de polipéptidos del receptor de transferrina humana 1 se establece en la SEQ ID NO:109. También se conocen las secuencias de la proteína del receptor de transferrina 1 de otras especies (por ejemplo, chimpancé, número de acceso XP\_003310238.1; mono rhesus, NP\_001244232.1; perro, NP\_001003111.1; ganado, NP\_001193506.1; ratón, NP\_035768.1; rata, NP\_073203.1; y pollo, NP\_990587.1). La 25 expresión “receptor de transferrina” también comprende variantes alélicas de los ejemplos de las secuencias de referencia, por ejemplo, secuencias humanas, que se codifican mediante un gen en un locus cromosómico de la proteína del receptor de transferrina 1. La proteína del receptor de transferrina de longitud completa incluye una



región intracelular de extremo N corta, una región transmembrana y un dominio extracelular grande. El dominio extracelular se caracteriza por tres dominios: un dominio similar a la proteasa, un dominio helicoidal y un dominio apical.

[0127] Tal como se utiliza en la presente, la expresión “polipéptido Fc” hace referencia a la región del extremo C de un polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina de origen natural que se caracteriza por un pliegue de Ig como dominio estructural. Un polipéptido Fc contiene las secuencias de región constante que incluyen al menos el dominio CH2 y/o el dominio CH3 y pueden contener al menos parte de la región bisagra. En general, un polipéptido Fc no contiene una región variable.

[0128] Un “polipéptido Fc modificado” hace referencia a un polipéptido Fc que tiene al menos una mutación, por ejemplo, una sustitución, delección o inserción, en comparación con una secuencia de un polipéptido Fc de cadena pesada de inmunoglobulina de tipo salvaje, pero que conserva el pliegue de Ig o la estructura general del polipéptido Fc natural.

[0129] Tal como se usa en la presente, la expresión “dímero de polipéptidos Fc” hace referencia a un dímero de dos polipéptidos Fc. En algunas modalidades, los dos polipéptidos Fc se dimerizan mediante la interacción entre los dos dominios CH3. Si las regiones bisagra o partes de las regiones bisagra están presentes en los dos polipéptidos Fc, pueden formarse uno o más enlaces disulfuro entre las regiones bisagra de los dos polipéptidos Fc dimerizantes.

[0130] Un “dímero de polipéptidos Fc modificado” hace referencia a un dímero de dos polipéptidos Fc en el cual al menos un polipéptido Fc es un polipéptido Fc modificado que tiene al menos una mutación, por ejemplo, una sustitución, delección o inserción, en comparación con una secuencia de polipéptido Fc de cadena pesada de inmunoglobulina de tipo salvaje. Por ejemplo, un dímero de polipéptidos Fc modificado puede ser aquel que se une específicamente a TfR y tiene al menos un polipéptido Fc

modificado que tiene al menos una mutación, por ejemplo, una sustitución, delección o inserción, en comparación con una secuencia de polipéptido Fc de cadena pesada de inmunoglobulina de tipo salvaje.

[0131] Tal como se usan en la presente, las expresiones “dominio CH3” y “dominio CH2” hacen referencia a polipéptidos del dominio de la región constante de inmunoglobulina. Para los fines de la presente solicitud, un polipéptido de dominio CH3 hace referencia a un segmento de aminoácidos de alrededor de la posición 341 a alrededor de la posición 447 como se numera de acuerdo con el esquema de numeración EU y un polipéptido de dominio CH2 hace referencia al segmento de aminoácidos de alrededor de la posición 231 a alrededor de la posición 340 como se numera de acuerdo con el esquema de numeración EU y no incluye secuencias de región bisagra. Los polipéptidos de dominio CH2 y CH3 también pueden numerarse mediante el esquema de numeración IMGT (ImMunoGeneTics) en el que la numeración del dominio CH2 es 1-110 y la numeración del dominio CH3 es 1-107, de acuerdo con numeración de la IMGT Scientific (sitio web de IMGT). Los dominios CH2 y CH3 son parte de la región Fc de una inmunoglobulina. Una región de Fc hace referencia al segmento de aminoácidos de alrededor de la posición 231 a alrededor de la posición 447 como se numera de acuerdo con el esquema de numeración EU, pero como se utiliza en la presente, puede incluir al menos una parte de una región bisagra de un anticuerpo. Una secuencia de región bisagra ilustrativa es la secuencia bisagra de IgG1 humana EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:88).

[0132] Los términos “de tipo salvaje”, “natural” y “de origen natural”, con respecto a un dominio CH3 o CH2, se utilizan en la presente para hacer referencia a un dominio que tiene una secuencia que se produce de forma natural.

[0133] En el contexto de la presente descripción, el término “mutante”, con respecto a un polipéptido mutante o a un polinucleótido mutante, se utiliza de forma intercambiable con “variante”. Una variante con respecto a una secuencia de referencia de dominio CH3 o CH2 de tipo salvaje puede incluir variantes alélicas de

origen natural. Un dominio CH3 o CH2 de origen "artificial" hace referencia a un dominio variante o mutante que no se presenta en una célula naturalmente y que se produce mediante modificación genética, por ejemplo, mediante el uso de tecnología de modificación genética o técnicas de mutagénesis, de un polinucleótido o polipéptido de dominio CH3 o de dominio CH2 natural. Una "variante" incluye cualquier dominio que comprende al menos una mutación de aminoácidos con respecto al tipo salvaje. Las mutaciones pueden incluir sustituciones, inserciones y eliminaciones.

[0134] El término "aminoácido" hace referencia a aminoácidos sintéticos y de origen natural, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural.

[0135] Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como también los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. «Análogos de aminoácidos» hace referencia a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono  $\alpha$  que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, sulfonio metílico de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. «Miméticos de aminoácidos» hace referencia a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente a la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido de origen natural.

[0136] Los  $\alpha$ -aminoácidos de origen natural incluyen, de forma no taxativa, alanina (Ala), cisteína (Cys), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), fenilalanina (Phe), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), arginina (Arg), lisina (Lys), leucina (Leu), metionina (Met), asparagina (Asn), prolina (Pro), glutamina (Gln), serina (Ser), treonina (Thr), valina (Val), triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y combinaciones de estos. Los

estereoisómeros de los aminoácidos  $\alpha$  de origen natural incluyen, de modo no taxativo, D-alanina (D-Ala), D-cisteína (D-Cys), ácido D-aspártico (D-Asp), ácido D-glutámico (D-Glu), D-fenilalanina (D-Phe), D-histidina (D-His), D-isoleucina (D-Ile), D-arginina (D-Arg), D-lisina (D-Lys), D-leucina (D-Leu), D-metionina (D-Met), D-asparagina (D-Asn),  
5 D-prolina (D-Pro), D-glutamina (D-Gln), D-serina (D-Ser), D-treonina (D-Thr), D-valina (D-Val), D-triptófano (D-Trp), D-tirosina (D-Tyr) y combinaciones de estos.

[0137] En la presente se puede hacer referencia a los aminoácidos ya sea mediante los símbolos de tres letras comúnmente conocidos o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Biochemical Nomenclature Commission IUPAC-IUB.

10 [0138] Los términos “polipéptido” y “péptido” se utilizan de manera intercambiable en la presente para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos en una cadena simple. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como también a polímeros de aminoácidos de  
15 origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. Los polímeros de aminoácidos pueden comprender totalmente L-aminoácidos, totalmente D-aminoácidos o una mezcla de L y D-aminoácidos.

[0139] Tal como se usa en la presente, el término “proteína” hace referencia a un polipéptido o a un dímero (es decir, dos) o multímero (es decir, tres o más) de  
20 polipéptidos de cadena simple. Los polipéptidos de cadena simple de una proteína pueden unirse mediante un enlace covalente, por ejemplo, un enlace disulfuro o interacciones no covalentes.

[0140] Las expresiones “sustitución conservadora”, “mutación conservadora” o “variante modificada en forma conservadora” hacen referencia a una alteración que  
25 tiene como resultado la sustitución de un aminoácido con otro aminoácido que puede decirse que tiene un rasgo similar. Los ejemplos de categorías de los grupos de aminoácidos conservadores definidos de esta manera pueden incluir: un “grupo

cargado/polar" que incluyen Glu (ácido glutámico o E), Asp (ácido aspártico o D), Asn (asparagina o N), Gln (Glutamina o Q), Lys (Lisina o K), Arg (Arginina o R) y His (Histidina o H); un "grupo aromático" que incluye Phe (fenilalanina o F), Tyr (tirosina o Y), Trp (triptófano o W) y (histidina o H); y un "grupo alifático" que incluye Gly (glicina o G), Ala (alanina o A), Val (valina o V), Leu (leucina o L), Ile (isoleucina o I), Met (metionina o M), Ser (serina o S), Thr (treonina o T) y Cys (cisteína o C). Dentro de cada grupo, también pueden identificarse subgrupos. Por ejemplo, el grupo de aminoácidos cargados o polares puede subdividirse en subgrupos que incluyen, un "subgrupo cargado positivamente" que comprende Lys, Arg y His; un "subgrupo cargado negativamente" que comprende Gly y Asp; y un "subgrupo polar" que comprende Asn y Gln. En otro ejemplo, el grupo aromático o cíclico puede subdividirse en subgrupos que incluyen: un "subgrupo de anillo de nitrógeno" que comprende Pro, His y Trp; y un "subgrupo fenilo" que comprende Phe y Tyr. En otro ejemplo adicional, el grupo alifático puede subdividirse en subgrupos, por ejemplo, un "subgrupo no polar alifático" que comprende Val, Leu, Gly y Ala; y un "subgrupo ligeramente polar alifático" que comprende Met, Ser, Thr y Cys. Los ejemplos de categorías de mutaciones conservadoras incluyen sustituciones de aminoácidos de los aminoácidos dentro del subgrupo anterior, tales como, de forma no taxativa: Lys por Arg o viceversa, de forma tal que pueda mantenerse una carga positiva; Glu por Asp o viceversa, de forma tal que pueda mantenerse una carga negativa; Ser por Thr o viceversa, de forma tal que pueda mantenerse un -OH libre; y Gln por Asn o viceversa, de forma tal que pueda mantenerse -NH<sub>2</sub> libre. En algunas modalidades, los aminoácidos hidrofóbicos se sustituyen por aminoácidos hidrofóbicos de origen natural, por ejemplo, en el sitio activo, para preservar la hidrofobicidad.

[0141] Las expresiones "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos, hace referencia a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos, por ejemplo, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % o mayor, que son idénticos en una región específica, al compararlos y alinearlos para determinar una

correspondencia máxima en una ventana de comparación o región designada, según se mide a través de un algoritmo de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual.

[0142] En el caso de comparación de secuencias de polipéptidos, típicamente, una  
5 secuencia de aminoácidos actúa como una secuencia de referencia con la que se  
compara la secuencia candidata. Puede llevarse a cabo la alineación mediante el uso  
de diversos métodos disponibles para el experto en la técnica, por ejemplo, alineación  
visual o mediante el uso de un software disponible públicamente mediante el uso de  
10 algoritmos conocidos para lograr una alineación máxima. Dichos programas incluyen  
los programas BLAST, ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Calif.) o  
Megalign (DNASTAR). Un experto en la técnica puede determinar los parámetros a  
emplear para una alineación con el fin de lograr una alineación máxima. Para la  
comparación de secuencia de las secuencias de polipéptidos para los fines de la  
15 presente solicitud, se utiliza el algoritmo de proteína estándar para BLAST BLASTP  
para la alineación de dos secuencias de proteínas con los parámetros por defecto.

[0143] Las expresiones “corresponde a”, “determinado con referencia a” o “numerado  
con referencia a”, cuando se utilizan en el contexto de la identificación de un residuo  
de aminoácidos dado en una secuencia de polipéptidos, hace referencia a la posición  
del residuo de una secuencia de referencia específica cuando la secuencia de  
20 aminoácidos dada se alinea al máximo y se compara con la secuencia de referencia.  
Por lo tanto, por ejemplo, un residuo de aminoácidos en un polipéptido Fc modificado  
“corresponde a” un aminoácido en la SEQ ID NO:61, cuando el residuo se alinea con  
el aminoácido en la SEQ ID NO:61 cuando se alinea de forma óptima con la SEQ ID  
NO:61. El polipéptido que se alinea con la secuencia de referencia no necesita tener  
25 la misma longitud que la secuencia de referencia.

[0144] Tal como se usa en la presente, la expresión “afinidad de unión” hace  
referencia a la potencia de la interacción no covalente entre dos moléculas, por  
ejemplo, un único sitio de unión en un polipéptido y un objetivo, por ejemplo, receptor

de transferrina, al cual se une. Por lo tanto, por ejemplo, la expresión puede hacer referencia a interacciones 1:1 entre un polipéptido y su diana, a menos que se indique lo contrario o resulte claro del contexto. La afinidad de unión puede cuantificarse mediante la medición de una constante de disociación ( $K_D$ ) en equilibrio, que hace referencia a la constante de velocidad de disociación ( $k_d$ , tiempo<sup>-1</sup>) dividida entre la constante de velocidad de asociación ( $k_a$ , tiempo<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>).  $K_D$  se puede determinar mediante la medición de la cinética de formación de complejos y disociación, por ejemplo, con el uso de métodos de resonancia por plasmones superficiales (SPR), por ejemplo, un sistema Biacore™; ensayos de exclusión cinética tales como KinExA®; e interferometría BioLayer (por ejemplo, con el uso de la plataforma ForteBio® Octet®). Tal como se utiliza en la presente, «afinidad de unión» incluye no solamente las afinidades de unión formales, tales como las que reflejan las interacciones 1:1 entre un polipéptido y su diana, sino las afinidades evidentes para las cuales se calculan  $K_D$  que pueden reflejar unión ávida.

[0145] La frase “se une específicamente” o “se une selectivamente” a un objetivo, por ejemplo, el receptor de transferrina, cuando se hace referencia a un polipéptido que comprende un polipéptido Fc modificado que se une al receptor de transferrina, como se describe en la presente, hace referencia a una reacción de unión por medio de la cual el polipéptido se une al objetivo con mayor afinidad, mayor avidez y/o mayor duración que lo que se une a un objetivo estructuralmente distinto, por ejemplo, un objetivo que no se encuentra en la familia del receptor de transferrina. En modalidades típicas, el polipéptido tiene una afinidad al menos 5 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces, 100 veces, 1000 veces, 10 000 veces o mayor para un receptor de transferrina, en comparación con un objetivo no relacionado cuando se evalúa en las mismas condiciones del ensayo de afinidad. Como se utilizan en la presente, las expresiones “unión específica”, “se une específicamente” o “es específico para” un objetivo particular (por ejemplo, TfR) pueden presentarse, por ejemplo, mediante una molécula que tiene una constante de disociación  $K_D$  en equilibrio para el objetivo a la cual se une, por ejemplo, de  $10^{-4}$  M o menor, por ejemplo,  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M o  $10^{-12}$  M. En algunas modalidades, un polipéptido Fc modificado

se une específicamente a un epítipo de un receptor de transferrina que se conserva entre especies (por ejemplo, que se conserva en forma estructural entre especies), por ejemplo, que se conserva entre especies de primates no humanos y humanos (por ejemplo, que se conserva en forma estructural entre especies de primates no humanos y humanos). En algunas modalidades, un polipéptido puede unirse exclusivamente a un receptor de transferrina humano.

[0146] Los términos “tratamiento”, “tratar” y similares se utilizan en la presente generalmente para hacer referencia a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. Las expresiones “tratar” o “tratamiento” pueden hacer referencia a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o mejora de una enfermedad, lo que incluye enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo FTD, NCL, NPA, NPB, NPC, FTD/ELA asociada con C9ORF72, ELA esporádica, AD, enfermedad de Gaucher (por ejemplo, enfermedad de Gaucher de tipo 1, 2 o 3) y enfermedad de Parkinson), aterosclerosis, un trastorno asociado con TDP-43, AMD y trastornos asociados con progranulina), lo que incluye todo parámetro objetivo o subjetivo tal como la disminución, remisión, mejora de la supervivencia del paciente, aumento del tiempo o tasa de supervivencia, reducción de los síntomas o hacer que el trastorno sea más tolerable para el paciente, disminución de la velocidad de degeneración o deterioro, o mejora del bienestar físico o mental de un paciente. El tratamiento o mejor de los síntomas puede basarse en parámetros objetivos o subjetivos. El efecto del tratamiento puede compararse con un individuo o grupo de individuos que no reciban el tratamiento o con el mismo paciente antes del tratamiento o en un momento distinto durante el tratamiento.

[0147] Los términos “sujeto”, “individuo” y “paciente”, como se utilizan de forma intercambiable en la presente, hacen referencia a un mamífero, que incluye, de modo no taxativo, seres humanos, primates no humanos, roedores (por ejemplo, ratas, ratones y conejillos de indias), conejos, vacas, cerdos, caballos y otras especies de mamíferos. En una modalidad, el paciente es un ser humano.



[0148] La expresión “excipiente farmacéuticamente aceptable” hace referencia a un ingrediente farmacéutico no activo que es compatible de forma biológica y farmacológica para usarlo en seres humanos o animales, tal como, de modo no taxativo, un amortiguador, portador o conservante.

- 5 [0149] Tal como se utiliza en la presente, una “cantidad terapéutica” o “cantidad terapéuticamente eficaz” de un agente es una cantidad del agente que trata los síntomas de una enfermedad en un sujeto.

[0150] El término “administrar” hace referencia a un método de administración de agentes, compuestos o composiciones al sitio deseado de acción biológica. Estos  
10 métodos incluyen, de forma no taxativa, administración tópica, administración parenteral, administración intravenosa, administración intradérmica, administración intramuscular, administración intratecal, administración colónica, administración rectal o administración intraperitoneal. En una modalidad, los polipéptidos que se describen en la presente se administran por vía intravenosa.

### 15 III. TERAPIA DE REEMPLAZO DE PROGRANULINA

[0151] En algunos aspectos, en la presente se describen variantes de progranulina y proteínas de fusión que la comprenden. Las proteínas de fusión descritas en la presente comprenden un dímero de polipéptido Fc y una variante de progranulina. En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende  
20 además una segunda progranulina o una variante esta (por ejemplo, una progranulina de tipo salvaje o una variante de progranulina). Un polipéptido Fc en el dímero de polipéptido Fc puede contener modificaciones (por ejemplo, una o más modificaciones que promuevan la heterodimerización) o puede ser un polipéptido Fc de tipo salvaje. En algunas modalidades, uno o ambos polipéptidos Fc en el dímero de polipéptido Fc  
25 pueden contener modificaciones que tengan como resultado la unión a un receptor de la BBB, por ejemplo, un TfR. Uno o ambos polipéptidos Fc en el dímero de polipéptido Fc pueden ser un polipéptido Fc de unión a TfR. Una progranulina o una variante de

progranulina se puede unir al extremo N o al extremo C de un polipéptido Fc (por ejemplo, un polipéptido Fc de tipo salvaje o un polipéptido Fc de unión a TfR). En algunas modalidades, una progranulina o una variante de progranulina se puede unir a un polipéptido Fc (por ejemplo, un polipéptido Fc de tipo salvaje o un polipéptido Fc de unión a TfR) directamente (por ejemplo, a través de un enlace peptídico) o por medio de un enlazador. En otras modalidades, una región bisagra o una parte de esta puede estar presente en el extremo N de un polipéptido Fc (por ejemplo, un polipéptido Fc de tipo salvaje o un polipéptido Fc de unión a TfR). Si una región bisagra o una parte de esta está presente, la progranulina o la variante de progranulina puede unirse a extremo N de la región bisagra o a la parte de esta, ya sea directamente o por medio de un enlazador.

[0152] La progranulina puede ser deficiente en enfermedades neurodegenerativas. La progranulina puede ser deficiente en FTD, así como en otras enfermedades, tales como la enfermedad de Gaucher y la AD. Una progranulina o una variante de progranulina incorporada en la proteína de fusión puede unirse a la sortilina o prosaposina (por ejemplo, unirse a sortilina).

[0153] En algunas modalidades, una progranulina o una variante de progranulina que se encuentra presente en una proteína de fusión descrita en la presente, conserva al menos 25 % de su actividad en comparación con su actividad cuando no está unido a un polipéptido Fc o a un polipéptido Fc de unión a TfR. En algunas modalidades, una progranulina o una variante de progranulina que se encuentra presente en una proteína de fusión descrita en la presente, conserva al menos 10 % o al menos 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % (por ejemplo, al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 %) de su actividad en comparación con su actividad cuando no está unido a un polipéptido Fc o a un polipéptido Fc de unión a TfR.

[0154] En algunas modalidades, la fusión a un polipéptido Fc o a un polipéptido Fc de unión a TfR no disminuye la expresión ni la actividad de la progranulina o la variante

de progranulina.

#### IV. VARIANTES DE PROGRANULINA

[0155] En la presente se proporcionan variantes de progranulina que tienen modificaciones o adiciones de aminoácidos en el extremo C de una progranulina de tipo salvaje. Una variante de progranulina es una variante funcional de una progranulina de tipo salvaje que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con una progranulina de tipo salvaje madura (por ejemplo, SEQ ID NO:2) y modificaciones o adiciones de aminoácidos en el extremo C de la progranulina de tipo salvaje.

[0156] En algunas modalidades, una variante de progranulina comprende modificaciones en el extremo C de la progranulina de tipo salvaje, de modo que los últimos tres aminoácidos en el extremo C de la variante de progranulina no sean QLL. Por ejemplo, una variante de progranulina puede tener una secuencia que es al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) idéntica a la SEQ ID NO:2, donde las posiciones correspondientes a los residuos 574 a 576 de la SEQ ID NO:2 tienen una secuencia de aminoácidos definida por  $X_1X_2X_3$ , y con la condición de que  $X_1X_2X_3$  juntos no son QLL. En algunas modalidades, la variante de progranulina tiene la secuencia:

TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTSLRHLGGPCQVDAHCSAGH  
SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQC  
PDSQFECPDFSTCCVMVDGSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT  
PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMP  
NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCP  
DGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWM  
EKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH  
QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQT

CCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLA  
 RSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAG  
 FRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> (SEQ ID NO:3),

donde cada uno de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> es independiente un aminoácido, y X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> juntos no son QLL. En determinadas modalidades, X<sub>1</sub> es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, L, F, Y, P o V. En determinadas modalidades, X<sub>2</sub> es H, K, D, E, S, T, N, Q, G, P, A, Y, V, I, F, L o R. En determinadas modalidades, X<sub>3</sub> es L, Y o P.

[0157] En algunas modalidades X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> es PX<sub>2</sub>L. En determinadas modalidades X<sub>2</sub> en PX<sub>2</sub>L puede ser H, K, D, E, S, T, N, Q, G, P, A, Y, V, I, F, L o R (por ejemplo, H, K, D, E, S, T, N, Q, G, P, A, Y, V, I o F). Por ejemplo, una variante de progranulina puede tener una secuencia que tenga al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO:4-18, en la que la variante progranulina tiene PHL, PKL, PDL, PEL, PSL, PTL, PNL, PQL, PGL, PPL, PAL, PYL, PVL, PIL o PFL en el extremo C. En particular, una variante de progranulina puede tener una secuencia que tenga al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:13, en la que la variante progranulina tiene PPL en el extremo C. En algunas modalidades, una variante de progranulina tiene la secuencia de la SEQ ID NO:13. En particular, una variante de progranulina puede tener una secuencia que tenga al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:15, en la que la variante progranulina tiene PYL en el extremo C. En algunas modalidades, una variante de progranulina tiene la secuencia de la SEQ ID NO:15. En particular, una variante de progranulina puede tener una secuencia que tenga al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:17, en la que la variante progranulina tiene PIL en el extremo C. En algunas modalidades, una variante de progranulina tiene la secuencia de la SEQ ID NO:17. En particular, una variante de

5

25

[0159] En algunas modalidades X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> es VX<sub>2</sub>L. En determinadas modalidades X<sub>2</sub> en VX<sub>2</sub>L puede ser V o T. Por ejemplo, una variante de progranulina puede tener una secuencia que tenga al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 1.

95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO:28 y 29, en la que la variante progranulina tiene VVL o VTL en el extremo C. En particular, una variante de progranulina puede tener una secuencia que tenga al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:28, en la que la variante progranulina tiene VVL en el extremo C. En algunas modalidades, una variante de progranulina tiene la secuencia de la SEQ ID NO:28. En particular, una variante de progranulina puede tener una secuencia que tenga al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:29, en la que la variante progranulina tiene VTL en el extremo C. En algunas modalidades, una variante de progranulina tiene la secuencia de la SEQ ID NO:29.

[0160] En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es  $X_1IL$ . En determinadas modalidades  $X_1$  en  $X_1IL$  puede ser R, H, K, E, P, N, F o Y (por ejemplo, R, H, K, E o P). Por ejemplo, una variante de progranulina puede tener una secuencia que tenga al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO:30-33 y 17, en la que la variante progranulina tiene RIL, HIL, KIL, EIL o PIL en el extremo C.

[0161] En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es  $X_1FL$ . En determinadas modalidades  $X_1$  en  $X_1FL$  puede ser R, H, K, D, E, S, T, N, Q, L, F, Y o P. Por ejemplo, una variante de progranulina puede tener una secuencia que tenga al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO:34-45 y 18, en la que la variante progranulina tiene RFL, HFL, KFL, DFL, EFL, SFL, TFL, NFL, QFL, LFL, FFL, YFL o PFL en el extremo C.

[0162] En algunas modalidades  $X_1X_2X_3$  es  $X_1QL$ . En determinadas modalidades  $X_1$  en  $X_1QL$  puede ser R, H, K, D, E, N, L, F, Y o Q. Por ejemplo, una variante de

progranulina puede tener una secuencia que tenga al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO:46-54 y 27, en la que la variante progranulina tiene RQL, HQL, KQL, DQL, EQL, NQL, LQL, FQL, YQL o QQL en el extremo C.

[0163] En modalidades adicionales  $X_1X_2X_3$  es  $X_1X_2L$ , en el que  $X_2$  es A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y o V.

[0164] En otras modalidades, una variante de progranulina comprende aminoácidos adicionales en el extremo C en comparación con una progranulina de tipo salvaje. Por ejemplo, una variante de progranulina puede comprender los aminoácidos QLL o LRQLL (SEQ ID NO:58) añadidos al extremo C de una progranulina de tipo salvaje. Por ejemplo, una variante de progranulina puede comprender una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:2 y una secuencia definida mediante  $Y_1Y_2QLL$  (SEQ ID NO:137) que es adyacente y C terminal a la posición correspondiente al residuo 576 de la SEQ ID NO:2, donde  $Y_1$  es L o está ausente, e  $Y_2$  es R o está ausente. En algunas modalidades, la variante de progranulina comprende la secuencia:

TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTSLRHLGGPCQVDAHCSAGH  
 SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQC  
 PDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT  
 PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMP  
 NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCP  
 DGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWM  
 EKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH  
 QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQT  
 CCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLA  
 RSPHVGVDKEGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAG

FRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLLY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>QLL (SEQ ID NO:55).

[0165] En algunas modalidades, una variante de progranulina puede tener la secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:56, en la que la variante progranulina tiene los aminoácidos QLLQLL (SEQ ID NO:59) en el extremo C. En modalidades particulares, una variante de progranulina tiene la secuencia de la SEQ ID NO:56. En algunas modalidades, una variante de progranulina puede tener la secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:57, en la que la variante progranulina tiene los aminoácidos QLLLRQLL (SEQ ID NO:60) en el extremo C. En modalidades particulares, una variante de progranulina tiene la secuencia de la SEQ ID NO:57.

[0166] Una variante de progranulina descrita en la presente (por ejemplo, una variante de progranulina que tenga una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO:3-57, 111-121, 127 y 128 puede unirse al extremo N o al extremo C de un polipéptido Fc (por ejemplo, un polipéptido Fc de tipo salvaje o un polipéptido Fc modificado). En algunas modalidades, la variante de progranulina unida al polipéptido Fc puede tener una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO:13, 15, 17, 18, 19, 20 y 27-29. En algunas modalidades, la variante de progranulina se puede unir a un polipéptido Fc (por ejemplo, un polipéptido Fc de tipo salvaje o un polipéptido Fc modificado) ya sea directamente (por ejemplo, a través de un enlace peptídico) o por medio de un enlazador. Si una región bisagra o una parte de esta está presente en el extremo N de un polipéptido Fc (por ejemplo, un polipéptido Fc de tipo salvaje o un polipéptido Fc modificado), la variante de progranulina puede unirse al extremo N de la región bisagra o la parte de esta, ya sea directamente o a través de un enlazador.

[0167] Además, las variantes de progranulina descritas en la presente pueden producirse a partir de células CHO. En modalidades particulares, más del 50 % (por



ejemplo, más que 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 %) de las variantes de progranulina producidas no están truncadas en el extremo C (por ejemplo, permanecen intactas). En modalidades particulares, más del 50 % (por ejemplo, más del 55 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 %) de las

5 variantes de progranulina son capaces de unirse a sortilina con un valor de  $K_D$  que se reduce en menos de 10 veces (por ejemplo, menos de 9 veces, 8 veces, 7 veces, 6 veces o 5 veces) en relación con una progranulina de tipo salvaje (por ejemplo, progranulina de tipo salvaje producida a partir de células HEK). Las variantes de progranulina se pueden purificar a partir de un medio de cultivo celular que contenga

10 las células que expresan la variante de progranulina mediante, por ejemplo, un esquema de purificación que incluya cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de columna de interacción hidrofóbica y/o diálisis.

## V. POLIPÉPTIDOS FC Y MODIFICACIONES DE ESTOS

[0168] En algunos aspectos, las proteínas de fusión descritas en la presente pueden

15 comprender una variante de progranulina y un dímero de polipéptido Fc en el que uno o ambos polipéptidos Fc del dímero contienen modificaciones de aminoácidos en relación con un polipéptido Fc de tipo salvaje. En algunas modalidades, las modificaciones de aminoácidos en un polipéptido Fc (por ejemplo, un polipéptido Fc modificado) pueden dar lugar a la unión del dímero de polipéptido Fc a un receptor de

20 BBB (por ejemplo, un TfR), promover la heterodimerización de los dos polipéptidos Fc en el dímero, modular la función del efector, ampliar la semivida en suero, influir en la glicosilación y/o reducir la inmunogenicidad en seres humanos. En algunas modalidades, los polipéptidos Fc modificados presentes en la proteína de fusión tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos alrededor de 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con respecto a un polipéptido Fc de tipo salvaje

25 correspondiente (por ejemplo, un polipéptido Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana). Se pueden encontrar ejemplos y descripciones de polipéptidos Fc modificados (por ejemplo, polipéptidos Fc de unión a TfR), por ejemplo, en la publicación de patente internacional n.º WO 2018/152326, que se incorpora a la presente mediante esta

referencia en su totalidad.

### Modificaciones del polipéptido Fc para la unión al receptor de BBB

[0169] En la presente se proporcionan proteínas de fusión que comprenden una variante de progranulina que son capaces de ser transportadas a través de la BBB.

- 5 Dicha proteína comprende un polipéptido Fc modificado que se une a un receptor de BBB. Los receptores de BBB se expresan en endotelio de BBB, así como también otros tipos de células y tejidos. En algunas modalidades, el receptor de BBB es un TfR.

- [0170] Los residuos de aminoácidos designados en diversas modificaciones Fc, que incluyen los introducidos en un polipéptido Fc modificado que se une a un receptor de BBB, por ejemplo, TfR, se numeran en la presente mediante el uso del índice de numeración EU. Cualquier polipéptido Fc, por ejemplo, un polipéptido Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, puede tener modificaciones, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos, en una o más posiciones como se describe en la presente. En algunas modalidades, el dominio que se modifica para la actividad de unión al receptor de BBB (por ejemplo, TfR) es un dominio CH3 de Ig humana, tal como un dominio CH3 de IgG1. El dominio CH3 puede ser de cualquiera del subtipo IgG, es decir, de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En el contexto de los anticuerpos IgG1, un dominio CH3 hace referencia a un segmento de aminoácidos de alrededor de la posición 341 a alrededor de la posición 447 como se numeran de acuerdo con el esquema de numeración EU.

- 20 [0171] En algunas modalidades, un polipéptido Fc modificado que se une específicamente a TfR se une al dominio apical de TfR y puede unirse a TfR sin bloquear ni inhibir de otra forma la unión de la transferrina al TfR. En algunas modalidades, la unión de transferrina a TfR no se ve sustancialmente inhibida. En algunas modalidades, la unión de transferrina a TfR es inhibida en menos de alrededor de 50 % (por ejemplo, menos de alrededor de 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %).

[0172] En algunas modalidades, un polipéptido Fc de unión al receptor de BBB (por ejemplo, TfR) presente en una proteína de fusión descrita en la presente comprende una o más, al menos una, dos o tres sustituciones; y, en algunas modalidades, al menos cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones en las posiciones de aminoácido que comprenden 266, 267, 268, 269, 270, 271, 295, 297, 298 y 299, de acuerdo con el esquema de numeración EU. En algunas modalidades, un polipéptido Fc de unión al receptor de BBB (por ejemplo, TfR) presente en una proteína de fusión descrita en la presente comprende al menos una, dos o tres sustituciones; y, en algunas modalidades, al menos cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve sustituciones en las posiciones de aminoácido que comprenden 274, 276, 283, 285, 286, 287, 288, 289 y 290, de acuerdo con el esquema de numeración EU. En algunas modalidades, un polipéptido Fc de unión al receptor de BBB (por ejemplo, TfR) presente en una proteína de fusión descrita en la presente comprende al menos una, dos o tres sustituciones; y, en algunas modalidades, al menos cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones en las posiciones de aminoácido que comprenden 268, 269, 270, 271, 272, 292, 293, 294, 296 y 300, de acuerdo con el esquema de numeración EU. En algunas modalidades, un polipéptido Fc de unión al receptor de BBB (por ejemplo, TfR) presente en una proteína de fusión descrita en la presente comprende al menos una, dos o tres sustituciones; y, en algunas modalidades, al menos cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve sustituciones en las posiciones de aminoácido que comprenden 272, 274, 276, 322, 324, 326, 329, 330 y 331, de acuerdo con el esquema de numeración EU. En algunas modalidades, un polipéptido Fc de unión al receptor de BBB (por ejemplo, TfR) presente en una proteína de fusión descrita en la presente comprende al menos una, dos o tres sustituciones; y, en algunas modalidades, al menos cuatro, cinco, seis o siete sustituciones en las posiciones de aminoácido que comprenden 345, 346, 347, 349, 437, 438, 439 y 440, de acuerdo con el esquema de numeración EU.

[0173] En algunas modalidades, un polipéptido Fc de unión al receptor de BBB (por ejemplo, TfR) presente en una proteína de fusión descrita en la presente comprende al menos una, dos o tres sustituciones; y, en algunas modalidades, al menos cuatro,

cinco, seis, siete, ocho o nueve sustituciones en las posiciones de aminoácido 384, 386, 387, 388, 389, 390, 413, 416 y 421, de acuerdo con el esquema de numeración EU. En algunas modalidades, el aminoácido en la posición 388 y/o 421 es un aminoácido aromático, por ejemplo, Trp, Phe o Tyr. En algunas modalidades, el aminoácido en la posición 388 es Trp. En algunas modalidades, el aminoácido aromático en la posición 421 es Trp o Phe. En modalidades adicionales, el polipéptido Fc de unión al receptor de BBB (por ejemplo, TfR) comprende además un o más sustituciones en las posiciones que comprenden 391, 392, 414, 415, 424 y 426, de acuerdo con el esquema de numeración EU. En algunas modalidades, la posición 414 es Lys, Arg, Gly o Pro; la posición 424 es Ser, Thr, Glu o Lys; y/o la posición 426 es Ser, Trp o Gly. En modalidades adicionales, el polipéptido Fc modificado comprende además una, dos o tres sustituciones en las posiciones que comprenden 414, 424 y 426, de acuerdo con el esquema de numeración EU. En algunas modalidades, la posición 414 es Lys, Arg, Gly o Pro; la posición 424 es Ser, Thr, Glu o Lys; y/o la posición 426 es Ser, Trp o Gly.

[0174] En algunas modalidades, el polipéptido Fc de unión al receptor de BBB (por ejemplo, TfR) tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) identidad o 100 % identidad a la secuencia de la SEQ ID NO:68 y en algunas modalidades tiene Glu en la posición 150, Tyr en la posición 154, Thr en la posición 156, Glu en la posición 157, Trp en la posición 158, Ala en la posición 159, Asn en la posición 160, Thr en la posición 183, Glu en la posición 185, Glu en la posición 186 y Phe en la posición 191, donde cada posición está numerada con referencia a SEQ ID NO:68. En modalidades particulares, el polipéptido Fc de unión al receptor de BBB (por ejemplo, TfR) tiene la secuencia de la SEQ ID NO:68. En algunas modalidades de las proteínas de fusión descritas en la presente, uno de los dos polipéptidos Fc en el dímero de polipéptido Fc puede ser un polipéptido Fc de unión al receptor de BBB (por ejemplo, TfR) y que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:68, mientras que el otro polipéptido Fc en el dímero de polipéptido Fc puede tener la secuencia de un polipéptido Fc de tipo salvaje (por ejemplo, SEQ ID NO:61). En otras modalidades de las proteínas de fusión descritas en la presente, ambos

polipéptidos Fc en el dímero de polipéptido Fc pueden ser un polipéptido Fc de unión al receptor de BBB (por ejemplo, TfR) que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:68.

[0175] En algunas modalidades, el polipéptido Fc de unión al receptor de BBB (por ejemplo, TfR) tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) identidad o 100 % identidad a la secuencia de la SEQ ID NO:78 y en algunas modalidades tiene Leu en la posición 150, Tyr en la posición 154, Thr en la posición 156, Glu en la posición 157, Trp en la posición 158, Ser en la posición 159, Ser en la posición 160, Thr en la posición 183, Glu en la posición 185, Glu en la posición 186 y Phe en la posición 191, donde cada posición está numerada con referencia a SEQ ID NO:78. En modalidades particulares, el polipéptido Fc de unión al receptor de BBB (por ejemplo, TfR) tiene la secuencia de la SEQ ID NO:78. En algunas modalidades de las proteínas de fusión descritas en la presente, uno de los dos polipéptidos Fc en el dímero de polipéptido Fc puede ser un polipéptido Fc de unión al receptor de BBB (por ejemplo, TfR) y que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:78, mientras que el otro polipéptido Fc en el dímero de polipéptido Fc puede tener la secuencia de un polipéptido Fc de tipo salvaje (por ejemplo, SEQ ID NO:61). En otras modalidades de las proteínas de fusión descritas en la presente, ambos polipéptidos Fc en el dímero de polipéptido Fc pueden ser un polipéptido Fc de unión al receptor de BBB (por ejemplo, TfR) que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:78.

## 20 Modificaciones del polipéptido Fc para la heterodimerización

[0176] En algunas modalidades, los polipéptidos Fc presentes en la proteína de fusión incluyen mutaciones de botón y ojal para promover la formación de heterodímeros y obstaculizar la formación de homodímeros. Generalmente, las modificaciones introducen una protuberancia ("botón") en la interfaz de un primer polipéptido y una cavidad correspondiente ("ojal") en la interfaz de un segundo polipéptido, de forma tal que la protuberancia puede posicionarse en la cavidad con el fin de promover la formación del heterodímero y, por lo tanto, perjudicar la formación del homodímero. Las protuberancias se construyen mediante la sustitución de cadenas

laterales cortas de aminoácidos de la interfaz del primer polipéptido con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfaz del segundo polipéptido mediante el remplazo de las cadenas laterales de aminoácidos grandes con cadenas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). En algunas modalidades, dichas mutaciones adicionales se encuentran en una posición en el polipéptido Fc que no tiene un efecto negativo en la unión del polipéptido a un receptor de BBB, por ejemplo, TfR.

[0177] En una modalidad ilustrativa de un abordaje de botón y ojal para la dimerización, la posición 366 (según el esquema de numeración EU) de uno de los polipéptidos Fc presentes en la proteína de fusión comprende un triptófano en lugar de una treonina natural. El otro polipéptido Fc en el dímero tiene una valina en la posición 407 (numerada de acuerdo con el esquema de numeración EU) en lugar de la tirosina natural. El otro polipéptido Fc puede comprender adicionalmente una sustitución en la que la treonina natural en la posición 366 (numerada de acuerdo con el esquema de numeración EU) se sustituye con una serina y una leucina natural en la posición 368 (numerada de acuerdo con el esquema de numeración EU) se sustituye con una alanina. Por lo tanto, uno de los polipéptidos Fc de una proteína de fusión descrita en la presente tiene la mutación de botón T366W y el otro polipéptido Fc tiene la mutación Y407V, que típicamente viene acompañada por las mutaciones de ojal T366S y L368A.

[0178] En algunas modalidades, uno o ambos polipéptidos Fc presentes en una proteína de fusión descrita en la presente también pueden modificarse de forma que contengan otras modificaciones para la heterodimerización, por ejemplo, modificación electrostática de residuos de contacto dentro de una interfaz CH3-CH3 que están cargados de forma natural o modificaciones del parche hidrofóbico.

[0179] Por ejemplo, en algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente puede contener un dímero de polipéptido Fc que tiene un polipéptido Fc que

tiene la mutación de botón T366W y al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:64 y el otro polipéptido Fc con mutaciones de ojal T366S, L368A y Y407V y al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:66. En determinadas modalidades, uno o ambos polipéptidos Fc en el dímero de polipéptido Fc puede ser un polipéptido Fc de unión a Tfr. En modalidades particulares, una proteína de fusión descrita en la presente puede contener un dímero de polipéptido Fc que tiene (i) un primer polipéptido Fc que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:66, donde la secuencia incluye en posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:66 Ser en la posición 136, Ala en la posición 138, y Val en la posición 177, y (ii) un segundo polipéptido Fc que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:69; donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:69 Trp en la posición 136 y, en algunas modalidades, tiene Glu en la posición 150, Tyr en la posición 154, Thr en la posición 156, Glu en la posición 157, Trp en la posición 158, Ala en la posición 159, Asn en la posición 160, Thr en la posición 183, Glu en la posición 185, Glu en la posición 186 y Phe en la posición 191. En modalidades particulares, una proteína de fusión descrita en la presente puede contener un dímero de polipéptido Fc que tiene (i) un primer polipéptido Fc que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:66, donde la secuencia incluye en posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:66 Ser en la posición 136, Ala en la posición 138, y Val en la posición 177, y (ii) un segundo polipéptido Fc que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:79; donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:79 Trp en la posición 136 y, en algunas modalidades, tiene Leu en la posición 150, Tyr en la posición 154, Thr en

la posición 156, Glu en la posición 157, Trp en la posición 158, Ser en la posición 159, Ser en la posición 160, Thr en la posición 183, Glu en la posición 185, Glu en la posición 186 y Phe en la posición 191.

[0180] En modalidades particulares, una proteína de fusión descrita en la presente puede contener (i) un primer polipéptido Fc que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:64, donde la secuencia incluye en posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:64 Trp en la posición 136, y (ii) un segundo polipéptido Fc que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:71; donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:71 Ser en la posición 136, Ala en la posición 138 y Val en la posición 177 y, en algunas modalidades, tiene Glu en la posición 150, Tyr en la posición 154, Thr en la posición 156, Glu en la posición 157, Trp en la posición 158, Ala en la posición 159, Asn en la posición 160, Thr en la posición 183, Glu en la posición 185, Glu en la posición 186 y Phe en la posición 191. En modalidades particulares, una proteína de fusión descrita en la presente puede contener (i) un primer dímero de polipéptido Fc que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:64, donde la secuencia incluye en posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:64 Trp en la posición 136, y (ii) un segundo polipéptido Fc que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:81; donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:81 Ser en la posición 136, Ala en la posición 138 y Val en la posición 177 y, en algunas modalidades, tiene Leu en la posición 150, Tyr en la posición 154, Thr en la posición 156, Glu en la posición 157, Trp en la posición 158, Ser en la posición 159, Ser en la posición 160, Thr en la posición 183, Glu en la posición 185, Glu en la posición 186 y Phe en la posición 191.



### Modificaciones de polipéptido Fc para modular la función efectora

[0181] En algunas modalidades, uno o ambos polipéptidos Fc presentes en una proteína de fusión descrita en la presente pueden comprender modificaciones que reducen la función efectora, es decir, que tienen una capacidad reducida de inducir determinadas funciones biológicas luego de unirse a un receptor de Fc expresado en una célula efectora que media la función efectora. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen, de forma no taxativa, la unión a C1q y la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), unión al receptor Fc. citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC), fagocitosis mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCP), regulación por disminución de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B. Las funciones efectoras pueden variar con la clase de anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos IgG1 e IgG3 humanos naturales pueden producir actividades de ADCC y CDC luego de la unión a un receptor Fc adecuado presente en una célula del sistema inmunitario; y una IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 humana natural puede provocar funciones de ADCP luego de la unión al receptor Fc adecuado presente en una célula inmunitaria.

[0182] En algunas modalidades, uno o ambos polipéptidos Fc presentes en una proteína de fusión descrita en la presente pueden comprender modificaciones que reducen o eliminan la función efectora. Las mutaciones del polipéptido Fc ilustrativas que reducen la función efectora incluyen, de forma no taxativa, sustituciones en un dominio CH2, por ejemplo, en las posiciones 234 y 235, de acuerdo con el esquema de numeración EU. Por ejemplo, en algunas modalidades, uno o ambos polipéptidos Fc pueden comprender residuos de alanina en las posiciones 234 y 235. Por lo tanto, uno o ambos polipéptidos Fc pueden tener sustituciones L234A y L235A (LALA).

[0183] Otras mutaciones de polipéptidos Fc que modulan una función efectora incluyen, de modo no taxativo, las siguientes: la posición 329 puede tener una mutación en la que la prolina se sustituye con una glicina, una arginina o un residuo de aminoácido lo suficientemente grande como para destruir la interfaz del receptor de

Fc/Fc $\gamma$  que se forma entre la prolina 329 de Fc y los residuos de triptófano Trp 87 y Trp 110 de Fc $\gamma$ RIII. Las sustituciones ilustrativas adicionales incluyen S228P, E233P, L235E, N297A, N297D y P331S, de acuerdo con el esquema de numeración EU. También pueden estar presentes sustituciones múltiples, por ejemplo, L234A y L235A de una región Fc de IgG1 humana; L234A, L235A y P329G de una región Fc de IgG1 humana; S228P y L235E de una región Fc de IgG4 humana; L234A y G237A de una región Fc de IgG1 humana; L234A, L235A, y G237A de una región Fc de IgG1 humana; V234A y G237A de una región Fc de IgG2 humana; L235A, G237A y E318A de una región Fc de IgG4 humana; y S228P y L236E de una región Fc de IgG4 humana, de acuerdo con el esquema de numeración EU. En algunas modalidades, uno o ambos polipéptidos Fc pueden tener una o más sustituciones de aminoácidos que modulan ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334, de acuerdo con el esquema de numeración EU.

[0184] Por ejemplo, en algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente puede contener un dímero de polipéptido Fc que tiene (i) un primer polipéptido Fc que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:67, donde la secuencia incluye en posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:67 Ala en la posición 4, Ala en la posición 5, Ser en la posición 136, Ala en la posición 138, y Val en la posición 177, y (ii) un segundo polipéptido Fc que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:70; donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:70 Ala en la posición 4, Ala en la posición 5, Trp en la posición 136 y, en algunas modalidades, tiene Glu en la posición 150, Tyr en la posición 154, Thr en la posición 156, Glu en la posición 157, Trp en la posición 158, Ala en la posición 159, Asn en la posición 160, Thr en la posición 183, Glu en la posición 185, Glu en la posición 186 y Phe en la posición 191. En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente puede contener un dímero de polipéptido Fc que tiene (i) un primer polipéptido Fc que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al

menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:67, donde la secuencia incluye en posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:67 Ala en la posición 4, Ala en la posición 5, Ser en la posición 136, Ala en la posición 138, y Val en la posición 177, y (ii) un segundo polipéptido Fc que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:80; donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:80 Ala en la posición 4, Ala en la posición 5, Trp en la posición 136 y, en algunas modalidades, tiene Leu en la posición 150, Tyr en la posición 154, Thr en la posición 156, Glu en la posición 157, Trp en la posición 158, Ser en la posición 159, Ser en la posición 160, Thr en la posición 183, Glu en la posición 185, Glu en la posición 186 y Phe en la posición 191.

[0185] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente puede contener un dímero de polipéptido Fc que tiene (i) un primer polipéptido Fc que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:65, donde la secuencia incluye en posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:65 Ala en la posición 4, Ala en la posición 5 y Trp en la posición 136, y (ii) un segundo polipéptido Fc que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:72; donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:72 Ala en la posición 4, Ala en la posición 5, Ser en la posición 136, Ala en la posición 138 y Val en la posición 177 y, en algunas modalidades, tiene Glu en la posición 150, Tyr en la posición 154, Thr en la posición 156, Glu en la posición 157, Trp en la posición 158, Ala en la posición 159, Asn en la posición 160, Thr en la posición 183, Glu en la posición 185, Glu en la posición 186 y Phe en la posición 191. En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente puede contener un dímero de polipéptido Fc que tiene (i) un primer polipéptido Fc que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad de secuencia

con la SEQ ID NO:65, donde la secuencia incluye en posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:65 Ala en la posición 4, Ala en la posición 5 y Trp en la posición 136, y (ii) un segundo polipéptido Fc que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o

5 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:82; donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:82 Ala en la posición 4, Ala en la posición 5, Ser en la posición 136, Ala en la posición 138 y Val en la posición 177 y, en algunas modalidades, tiene Leu en la posición 150, Tyr en la posición 154, Thr en la posición 156, Glu en la posición 157, Trp en la posición 158, Ser en la posición

10 159, Ser en la posición 160, Thr en la posición 183, Glu en la posición 185, Glu en la posición 186 y Phe en la posición 191.

#### Modificaciones del polipéptido Fc para extender la semivida en suero

[0186] En algunas modalidades, pueden introducirse modificaciones para potenciar la semivida en suero. Por ejemplo, en algunas modalidades, uno o ambos polipéptidos

15 Fc presentes en una proteína de fusión descrita en la presente pueden comprender una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, según el esquema de numeración EU. Por lo tanto, uno o ambos polipéptidos Fc pueden tener sustituciones M252Y, S254T y T256E. De manera alternativa, uno o ambos polipéptidos Fc pueden tener las sustituciones M428L y

20 N434S, según el esquema de numeración EU. Alternativamente, uno o ambos polipéptidos Fc pueden tener una sustitución N434S o N434A.

[0187] En algunas modalidades, se puede eliminar la lisina del extremo C expuesta de uno o ambos polipéptidos Fc (por ejemplo, el residuo Lys en la posición 447 del polipéptido Fc, de acuerdo con la numeración EU). El residuo de lisina del extremo C

25 está muy conservado en los dominios de Fc y puede eliminarse total o parcialmente mediante la maquinaria celular durante la producción de proteínas. En algunas modalidades, la eliminación de las lisinas del extremo C en los polipéptidos Fc puede mejorar la estabilidad de las proteínas de fusión.

[0188] En algunas modalidades, una región bisagra (por ejemplo, SEQ ID NO:88) o una parte de esta (por ejemplo, SEQ ID NO:89) puede unirse a un polipéptido Fc o un polipéptido Fc modificado descrito en la presente. La región bisagra puede ser de cualquier isotipo o subclase de inmunoglobulina. Una bisagra de inmunoglobulina  
 5 ilustrativa es una región bisagra IgG, tal como una región bisagra IgG1, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de bisagra de IgG1 humana EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:88) o una parte de esta (por ejemplo, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:89). En algunas modalidades, la región bisagra se encuentra en la región del extremo N del polipéptido Fc.

## 10 VI. UNIÓN ENTRE PROGRANULINAS Y POLIPÉPTIDOS FC

[0189] En algunas modalidades, un polipéptido Fc se une a la progranulina o la variante de progranulina a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador polipeptídico. En algunas modalidades, el polipéptido Fc se une a la progranulina o la variante de progranulina a través de un enlace peptídico o a través de un enlazador  
 15 polipeptídico, por ejemplo, es un polipéptido de fusión. El enlazador polipeptídico puede configurarse de forma tal que permita la rotación de la progranulina o la variante de progranulina con respecto al polipéptido Fc al que está unido; y/o es resistente a la digestión por parte de proteasas. Los enlazadores polipeptídicos pueden contener aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales o una combinación de estos. En  
 20 algunas modalidades, el enlazador polipeptídico puede ser un enlazador flexible, por ejemplo, con aminoácidos tales como Gly, Asn, Ser, Thr, Ala y similares. Estos enlazadores se diseñan mediante el uso de parámetros conocidos y pueden tener cualquier longitud y contener cualquier cantidad de unidades de repetición de cualquier longitud (por ejemplo, unidades de repetición de los residuos Gly y Ser). Por ejemplo,  
 25 el enlazador puede tener repeticiones, tales como dos, tres, cuatro, cinco o más repeticiones de Gly<sub>4</sub>-Ser (SEQ ID NO:90) o un Gly<sub>4</sub>-Ser simple (SEQ ID NO:90). En algunas modalidades, el enlazador polipeptídico puede incluir un sitio de escisión de proteasas, por ejemplo, que puede escindirse mediante una enzima presente en el sistema nervioso central. En algunas modalidades, si una región bisagra (por ejemplo,

SEQ ID NO:88) o una parte de esta (por ejemplo, SEQ ID NO:89) se une al extremo N del polipéptido Fc, el extremo C de la progranulina o la variante de esta puede unirse al extremo N de la región bisagra o la parte de esta mediante un enlace peptídico o mediante un enlace polipeptídico (por ejemplo, repeticiones de Gly<sub>4</sub>-Ser (SEQ ID NO:90) o un Gly<sub>4</sub>-Ser simple (SEQ ID NO:90)).

[0190] En algunas modalidades, la progranulina o la variante de progranulina se une al extremo N del polipéptido Fc, por ejemplo, mediante un enlazador Gly<sub>4</sub>-Ser (SEQ ID NO:90) o un enlazador (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:91). En algunas modalidades, el polipéptido Fc puede comprender una secuencia de bisagra o secuencia de bisagra parcial en el extremo N que se une al enlazador o se une directamente a la progranulina.

[0191] En algunas modalidades, la progranulina o la variante de progranulina se une al extremo C del polipéptido Fc, por ejemplo, mediante un enlazador Gly<sub>4</sub>-Ser (SEQ ID NO:90) o un enlazador (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:91). En algunas modalidades, el extremo C del polipéptido Fc está unido directamente a la progranulina.

[0192] En algunas modalidades, el enlazador polipeptídico entre el polipéptido Fc y la progranulina o la variante de progranulina puede tener 3-50, 3-25, 3-10, 3-5, 3, 5, 7, 10, 25 o 50 aminoácidos. Se conocen en la técnica enlazadores polipeptídicos adecuados (por ejemplo, como se describe en Chen et ál. *Adv. Drug Deliv Rev.* 65(10):1357-1369, 2013), y estos incluyen, por ejemplo, enlazadores polipeptídicos que contienen residuos de aminoácidos flexibles tales como glicina y serina. En determinadas modalidades, un enlazador polipeptídico puede ser un enlazador de poliglicina, por ejemplo, (Gly)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:138), en el que n es un número entero entre 1 y 10. En determinadas modalidades, un enlazador polipeptídico puede contener motivos, por ejemplo, múltiples motivos o motivos de repetición, de (GS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:139), (GGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:140), (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:133), (GGSG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:134) o (SGGG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:135), donde n es un número entero entre 1 y 10. En otras modalidades, un enlazador polipeptídico también puede contener aminoácidos

que no sean glicina y serina, por ejemplo, KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO:94), EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO:95) y GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO:96). En otras modalidades, los enlazadores polipeptídicos también pueden ser enlazadores polipeptídicos rígidos. En algunas modalidades, los enlazadores polipeptídicos rígidos pueden adoptar una conformación  $\alpha$ -helicoidal, que puede estabilizarse mediante enlaces hidrógeno entre segmentos o puentes salinos entre segmentos. Los ejemplos de enlazadores polipeptídicos rígidos incluyen, de modo no taxativo, A(EAAAK)<sub>n</sub>A (SEQ ID NO:136), donde n es un número entero entre 1 y 5, y (XP)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:141), donde X es Ala, Lys o Glu, y n es un número entero entre 1 y 10, como se describe en Chen et ál. *Adv. Drug Deliv Rev.* 65(10):1357-1369, 2013.

[0193] En algunas modalidades, la progranulina o la variante de progranulina está unida al polipéptido Fc a través de un agente de reticulación químico. Estos conjugados pueden generarse mediante el uso de reactivos de reticulación químicos y protocolos conocidos. Por ejemplo, hay una gran cantidad de agentes de reticulación químicos que son conocidos para el experto en la técnica y son útiles para la reticulación del polipéptido con un agente de interés. Por ejemplo, los agentes de reticulación son reticuladores heterobifuncionales, que se pueden usar para enlazar moléculas en etapas. Los reticuladores heterobifuncionales proporcionan la capacidad de diseñar métodos de acoplamiento más específicos para conjugar proteínas, lo que reduce de este modo las apariciones de reacciones secundarias no deseadas tales como polímeros homoproteicos. Se conoce en la técnica una amplia gama de reticuladores heterobifuncionales, que incluyen N-hidroxisuccinimida (NHS) o su análogo hidrosoluble N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS); (4-yodoacetil) aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB), 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo (SMPB), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC); 4-succinimidiloxycarbonil-a-metil-a-(2-piridilditio)-tolueno (SMPT), 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) y 6-[3-(2-piridilditio)propionato]hexanoato de succinimidilo (LC-SPDP). Los agentes de reticulación que tienen restos de N-hidroxisuccinimida pueden obtenerse como

análogos de N-hidroxisulfosuccinimida, que generalmente son más solubles en agua. Además, estos agentes de reticulación que tienen puentes disulfuro dentro de la cadena de unión pueden sintetizarse en cambio como los derivados de alquilo, para reducir la cantidad de escisión del enlazador *in vivo*. Además de los reticuladores

5 heterobifuncionales, existe una cantidad de agentes de reticulación distintos que incluyen reticuladores homobifuncionales y fotorreactivos. El subcrato de disuccinimidilo (DSS), bismaleimidoheptano (BMH) y dimetilpimelimidato.2HCl (DMP) son ejemplos de agentes de reticulación homobifuncionales útiles, y bis-[B-(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro (BASED) y N-succinimidil-6(4'-azido-2'-

10 nitrofenilamino)hexanoato (SANPAH) son ejemplos de reticuladores fotorreactivos útiles.

## VII. PROTEÍNAS DE FUSIÓN ILUSTRATIVAS

[0194] En algunos aspectos, una proteína de fusión descrita en la presente comprende un primer polipéptido Fc que está unido a una variante de progranulina; y

15 un segundo polipéptido Fc que forma un dímero de polipéptido Fc con el primer polipéptido Fc. En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende además una segunda progranulina o una variante esta (por ejemplo, una progranulina de tipo salvaje o una variante de progranulina). En algunas modalidades, el primer polipéptido Fc es un polipéptido Fc modificado y/o el segundo polipéptido Fc

20 es un polipéptido Fc modificado. En algunas modalidades, el polipéptido Fc modificado contiene una o más modificaciones que promueven su heterodimerización al otro polipéptido Fc. En algunas modalidades, el polipéptido Fc modificado contiene una o más modificaciones que reducen la función efectora. En algunas modalidades, el polipéptido Fc modificado contiene una o más modificaciones que extienden la

25 semivida en suero. En algunas modalidades, el polipéptido Fc modificado contiene una o más modificaciones que le confieren una unión a un receptor de la BBB, por ejemplo, un TfR.

[0195] En otros aspectos, una proteína de fusión descrita en la presente comprende



una primera cadena de polipéptidos que comprende un polipéptido Fc y una segunda cadena de polipéptidos que comprende un polipéptido Fc modificado que se une específicamente a un receptor de BBB (por ejemplo, TfR), por ejemplo, un polipéptido Fc de unión a TfR, que se dimeriza con el polipéptido Fc en la primera cadena de polipéptidos para formar un dímero de polipéptido Fc. En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende una variante de progranulina, que puede unirse a la primera o a la segunda cadena de polipéptidos. En determinadas modalidades, la variante de la progranulina se une al extremo N o extremo C de la primera cadena de polipéptidos por medio de un enlazador polipeptídico. En determinadas modalidades, la variante de la progranulina se une al extremo N o extremo C de la segunda cadena de polipéptidos por medio de un enlazador polipeptídico.

[0196] En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende dos variantes de progranulina. En determinadas modalidades, la primera variante de progranulina se une al extremo N de la primera cadena de polipéptidos y la segunda variante de progranulina se une al extremo N de la segunda cadena de polipéptidos. En determinadas modalidades, la primera variante de progranulina se une al extremo N de la primera cadena de polipéptidos y la segunda variante de progranulina se une al extremo C de la segunda cadena de polipéptidos. En determinadas modalidades, la primera variante de progranulina se une al extremo C de la primera cadena de polipéptidos y la segunda variante de progranulina se une al extremo N de la segunda cadena de polipéptidos. En determinadas modalidades, la primera variante de progranulina se une al extremo C de la primera cadena de polipéptidos y la segunda variante de progranulina se une al extremo C de la segunda cadena de polipéptidos.

[0197] En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende una variante de progranulina y una progranulina de tipo salvaje. En determinadas modalidades, la variante de progranulina se une al extremo N de la primera cadena de polipéptidos y la progranulina de tipo salvaje se une al extremo N de la segunda cadena de polipéptidos. En determinadas modalidades, la variante de progranulina se une al extremo N de la primera cadena de polipéptidos y la progranulina de tipo salvaje se

une al extremo C de la segunda cadena de polipéptidos. En determinadas modalidades, la variante de progranulina se une al extremo C de la primera cadena de polipéptidos y la progranulina de tipo salvaje se une al extremo N de la segunda cadena de polipéptidos. En determinadas modalidades, la variante de progranulina se une al extremo C de la primera cadena de polipéptidos y la progranulina de tipo salvaje se une al extremo C de la segunda cadena de polipéptidos. En determinadas modalidades, la progranulina de tipo salvaje se une al extremo N de la primera cadena de polipéptidos y la variante de progranulina se une al extremo N de la segunda cadena de polipéptidos. En determinadas modalidades, la progranulina de tipo salvaje se une al extremo N de la primera cadena de polipéptidos y la variante de progranulina se une al extremo C de la segunda cadena de polipéptidos. En determinadas modalidades, la progranulina de tipo salvaje se une al extremo C de la primera cadena de polipéptidos y la variante de progranulina se une al extremo N de la segunda cadena de polipéptidos. En determinadas modalidades, la progranulina de tipo salvaje se une al extremo C de la primera cadena de polipéptidos y la variante de progranulina se une al extremo C de la segunda cadena de polipéptidos.

[0198] En algunas modalidades, la  $K_D$  para la unión a sortilina de una proteína de fusión descrita en la presente es menor que alrededor de 100 nM (por ejemplo, menos que alrededor de 95 nM, 90 nM, 85 nM, 80 nM, 75 nM, 70 nM, 65 nM, 60 nM, 55 nM, 50 nM, 45 nM o 40 nM). En algunas modalidades, la  $EC_{50}$  para la unión a sortilina de una proteína de fusión descrita en la presente es menor que alrededor de 25 nM (por ejemplo, menos que alrededor de 20 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2,5 nM, 2 nM, 1,5 nM o 1 nM). En modalidades particulares, la  $EC_{50}$  para la unión a sortilina de la proteína de fusión presenta una disminución menor que alrededor de 10 veces (por ejemplo, menor que alrededor de 9 veces, 8 veces, 7 veces, 6 veces o 5 veces) en la unión a sortilina en comparación con una proteína de fusión que comprende la SEQ ID NO:2 en el primer polipéptido. En algunas modalidades, la  $EC_{50}$  para la unión a sortilina de la proteína de fusión presenta una disminución menor que alrededor de 10 veces (por ejemplo, menor que alrededor de 9 veces, 8 veces, 7 veces, 6 veces o 5 veces) en la unión a sortilina en comparación con una proteína de fusión que

comprende la SEQ ID NO:108 en el primer polipéptido. En determinadas modalidades, la EC50 se mide mediante ELISA. En la presente se describe un método ilustrativo para medir la EC50 para la unión a sortilina mediante ELISA.

[0199] En algunas modalidades, las proteínas de fusión descritas en la presente se producen en células CHO. En modalidades particulares, más que 50 % (por ejemplo, más que 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 %) de las proteínas de fusión (por ejemplo, las proteínas de fusión producidas a partir de células CHO) no se escinde en el extremo C de la parte de la variante de progranulina de la proteína de fusión.

[0200] En modalidades particulares, una proteína de fusión descrita en la presente comprende: (a) una primera cadena de polipéptidos que comprende una variante de progranulina unida a un polipéptido Fc modificado que comprende sustituciones T366S, L368A y Y407V (ojal) y sustituciones L234A y L235A (LALA); y (b) una segunda cadena de polipéptidos que comprende un polipéptido Fc modificado que se une a TfR y comprende una sustitución T366W (botón) y sustituciones L234A y L235A (LALA). La variante de progranulina puede incluir una secuencia que tenga al menos el 90 % (por ejemplo, al menos el 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO:4-54, 111-121 y 127-128, donde las posiciones 574-576 de la variante de progranulina son como se define en las SEQ ID NO: 4-54, 111-121 y 127-128. En algunas modalidades, la variante de progranulina puede incluir una secuencia que tenga al menos el 90 % (por ejemplo, al menos el 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:56, donde las posiciones 574-579 de la variante de progranulina son como se define en la SEQ ID NO:56. En algunas modalidades, la variante de progranulina puede incluir una secuencia que tenga al menos el 90 % (por ejemplo, al menos el 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:57, donde las posiciones 574-581 de la variante de progranulina son como se define en la SEQ ID NO:57. En algunas modalidades, la variante de progranulina se

puede unir al extremo N o extremo C (por ejemplo, extremo C) del polipéptido Fc modificado. En particular, se une una región bisagra o una parte de la misma en el extremo N de cada uno de los polipéptidos Fc modificados en la primera y segunda cadena de polipéptidos. En particular, se presenta un enlace polipeptídico (por ejemplo, GGGGS (SEQ ID NO:90) o GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:91)) entre la variante de progranulina y el polipéptido Fc modificado en la primera cadena de polipéptidos.

[0201] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la primera cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:98, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:98 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Val en la posición 187, Pro en la posición 811, Ile en la posición 812 y Leu en la posición 813, y (b) una segunda cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:75, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:75 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Glu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ala en la posición 169, Asn en la posición 170, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:98 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:75. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:98 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:130.

[0202] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente

comprende (a) una primera cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la primera cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:99, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:99 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Val en la posición 187, Pro en la posición 811, Phe en la posición 812 y Leu en la posición 813, y (b) una segunda cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:75, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:75 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Glu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ala en la posición 169, Asn en la posición 170, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:99 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:75. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:99 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:130.

[0203] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la primera cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:100, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:100 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Val en la posición 187, Gln en la posición 811, Gln en la posición 812 y Leu en la posición 813, y (b) una segunda cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de

identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:75, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:75 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Glu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ala en la posición 169, Asn en la posición 170, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:100 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:75. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:100 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:130.

[0204] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la primera cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:101, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:101 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Val en la posición 187, Val en la posición 811, Val en la posición 812 y Leu en la posición 813, y (b) una segunda cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:75, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:75 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Glu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ala en la posición 169, Asn en la posición 170, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:101 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:75. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de

la SEQ ID NO:101 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:130.

[0205] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la primera cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:102, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:102 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Val en la posición 187, Val en la posición 811, Thr en la posición 812 y Leu en la posición 813, y (b) una segunda cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:75, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:75 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Glu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ala en la posición 169, Asn en la posición 170, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:102 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:75. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:102 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:130.

[0206] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la primera cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:123, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID

NO:123 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Val en la posición 187, Pro en la posición 811, Pro en la posición 812 y Leu en la posición 813, y (b) una segunda cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:75, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:75 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Glu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ala en la posición 169, Asn en la posición 170, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:123 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:75. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:123 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:130.

[0207] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la primera cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:124, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:124 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Val en la posición 187, Pro en la posición 811, Tyr en la posición 812 y Leu en la posición 813, y (b) una segunda cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:75, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:75 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Glu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ala en la posición 169, Asn en la posición 170, Thr en la posición 193, Glu en la



posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:124 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:75. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:124 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:130.

[0208] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la primera cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:125, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:125 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Val en la posición 187, Gln en la posición 811, Arg en la posición 812 y Leu en la posición 813, y (b) una segunda cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:75, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:75 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Glu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ala en la posición 169, Asn en la posición 170, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:125 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:75. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:125 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:130.

[0209] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos comprende una variante de

- progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la primera cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:126, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID
- 5 NO:126 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Val en la posición 187, Gln en la posición 811, His en la posición 812 y Leu en la posición 813, y (b) una segunda cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:75, donde la
- 10 secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:75 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Glu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ala en la posición 169, Asn en la posición 170, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201. En algunas modalidades,
- 15 la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:126 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:75. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:126 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:130.
- 20 [0210] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la primera cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:98,
- 25 donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:98 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Val en la posición 187, Pro en la posición 811, Ile en la posición 812 y Leu en la posición 813, y (b) una segunda cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 % de
- 30 identidad) con la secuencia de la SEQ ID NO:85, donde la secuencia incluye en las

- posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:85 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Leu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ser en la posición 169, Ser en la posición 170, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:98 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:85. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:98 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:132.
- 5
- 10 [0211] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la primera cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:99,
- 15 donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:99 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Val en la posición 187, Pro en la posición 811, Phe en la posición 812 y Leu en la posición 813, y (b) una segunda cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de
- 20 identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:85, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:85 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Leu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ser en la posición 169, Ser en la posición 170, Thr en la posición 193, Glu en la
- 25 posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:99 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:85. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:99 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la
- 30 SEQ ID NO:132.

[0212] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la primera cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:100, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:100 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Val en la posición 187, Gln en la posición 811, Gln en la posición 812 y Leu en la posición 813, y (b) una segunda cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:85, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:85 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Leu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ser en la posición 169, Ser en la posición 170, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:100 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:85. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:100 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:132.

[0213] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la primera cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:101, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:101 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Val en la posición 187, Val en la posición 811, Val en la posición 812 y Leu en la posición 813, y (b) una segunda cadena de polipéptidos que comprende una

secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:85, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:85 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Leu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ser en la posición 169, Ser en la posición 170, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:101 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:85. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:101 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:132.

[0214] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la primera cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:102, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:102 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Val en la posición 187, Val en la posición 811, Thr en la posición 812 y Leu en la posición 813, y (b) una segunda cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:85, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:85 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Leu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ser en la posición 169, Ser en la posición 170, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201. En algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:102 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:85. En

algunas modalidades, la primera cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:102 y la segunda cadena de polipéptidos comprende la secuencia de la SEQ ID NO:132.

[0215] En modalidades particulares, una proteína de fusión descrita en la presente comprende: (a) una primera cadena de polipéptidos que comprende un polipéptido Fc modificado que se une a TfR y comprende sustituciones T366S, L368A y Y407V (ojal) y sustituciones L234A y L235A (LALA); y (b) una segunda cadena de polipéptidos que comprende una variante de progranulina unida a un polipéptido Fc modificado que comprende una sustitución T366W (botón) y sustituciones L234A y L235A (LALA). La variante de progranulina puede tener una secuencia que tenga al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO:3-57, 111-121 y 127-128. En algunas modalidades, la variante de progranulina se puede unir al extremo N o extremo C (por ejemplo, extremo C) del polipéptido Fc modificado. En particular, se une una región bisagra o una parte de la misma en el extremo N de cada uno de los polipéptidos Fc modificados en la primera y segunda cadena de polipéptidos. En particular, se presenta un enlace polipeptídico (por ejemplo, GGGGS (SEQ ID NO:90) o GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:91)) entre la variante de progranulina y el polipéptido Fc modificado en la segunda cadena de polipéptidos.

[0216] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:77, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:77 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Glu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ala en la posición 169, Asn en la posición 170, Val en la posición 187, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201, y (b) una segunda cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y

un polipéptido Fc modificado, donde la segunda cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:103, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:103

5 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Pro en la posición 811, Ile en la posición 812 y Leu en la posición 813.

[0217] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 %

10 de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:77, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:77 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Glu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ala en la posición 169, Asn en la posición 170, Val en la posición 187, Thr en la

15 posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201, y (b) una segunda cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la segunda cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:104, donde la

20 secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:104 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Pro en la posición 811, Phe en la posición 812 y Leu en la posición 813.

[0218] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que

25 tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:77, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:77 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Glu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición

168, Ala en la posición 169, Asn en la posición 170, Val en la posición 187, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201, y (b) una segunda cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la segunda cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:105, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:105 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Gln en la posición 811, Gln en la posición 812 y Leu en la posición 813.

- 10 [0219] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:77, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:77 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Glu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ala en la posición 169, Asn en la posición 170, Val en la posición 187, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201, y (b) una segunda cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la segunda cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:106, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:106 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Val en la posición 811, Val en la posición 812 y Leu en la posición 813.

[0220] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:77, donde la secuencia incluye en las



posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:77 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Glu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ala en la posición 169, Asn en la posición 170, Val en la posición 187, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201, y (b) una segunda cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la segunda cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:107, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:107 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Val en la posición 811, Thr en la posición 812 y Leu en la posición 813.

[0221] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:87, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:87 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Leu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ser en la posición 169, Ser en la posición 170, Val en la posición 187, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201, y (b) una segunda cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la segunda cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:103, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:103 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Pro en la posición 811, Ile en la posición 812 y Leu en la posición 813.

[0222] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente

comprende (a) una primera cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:87, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:87 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Leu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ser en la posición 169, Ser en la posición 170, Val en la posición 187, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201, y (b) una segunda cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la segunda cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:104, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:104 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Pro en la posición 811, Phe en la posición 812 y Leu en la posición 813.

[0223] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:87, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:87 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Leu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ser en la posición 169, Ser en la posición 170, Val en la posición 187, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201, y (b) una segunda cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la segunda cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:105, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:105 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Gln en la posición

811, Gln en la posición 812 y Leu en la posición 813.

[0224] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:87, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:87 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Leu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ser en la posición 169, Ser en la posición 170, Val en la posición 187, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201, y (b) una segunda cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la segunda cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:106, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:106 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Val en la posición 811, Val en la posición 812 y Leu en la posición 813.

[0225] En algunas modalidades, una proteína de fusión descrita en la presente comprende (a) una primera cadena de polipéptidos que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %) de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:87, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:87 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Ser en la posición 146, Ala en la posición 148, Leu en la posición 160, Tyr en la posición 164, Thr en la posición 166, Glu en la posición 167, Trp en la posición 168, Ser en la posición 169, Ser en la posición 170, Val en la posición 187, Thr en la posición 193, Glu en la posición 195, Glu en la posición 196 y Phe en la posición 201, y (b) una segunda cadena de polipéptidos comprende una variante de progranulina y un polipéptido Fc modificado, donde la segunda cadena de polipéptidos comprende una secuencia que tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 95 %, 98 % o 99 %)

de identidad o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO:107, donde la secuencia incluye en las posiciones numeradas con referencia a la SEQ ID NO:107 Ala en la posición 14, Ala en la posición 15, Trp en la posición 146, Val en la posición 811, Thr en la posición 812 y Leu en la posición 813.

## 5 VIII. PROPIEDADES DE UNIÓN

[0226] Las proteínas de fusión descritas en la presente pueden tener una amplia gama de afinidades de unión. Por ejemplo, en algunas modalidades, una proteína tiene una afinidad para un receptor de la BBB, por ejemplo, un TfR, dentro del intervalo de 1 pM a 10  $\mu$ M. En algunas modalidades, la afinidad para TfR se encuentra en el  
10 intervalo de 1 nM a 5  $\mu$ M, o de 10 nM a 1  $\mu$ M.

[0227] Se conocen en la técnica métodos para analizar la afinidad de unión, la cinética de unión y la reactividad cruzada para analizar la unión a un receptor de la BBB, por ejemplo, TfR. Estos métodos incluyen, de forma no taxativa, ensayos de unión de fase sólida (por ejemplo, ensayo ELISA), inmunoprecipitación, resonancia por  
15 plasmones superficiales (por ejemplo, Biacore™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ)), ensayos de exclusión cinética (por ejemplo, KinExA®), citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), interferometría BioLayer (por ejemplo, Octet® (FortéBio, Inc., Menlo Park, CA)) y análisis de transferencia Western. En algunas modalidades, se utiliza ELISA para determinar la afinidad de unión y/o la  
20 reactividad cruzada. Se conocen en la técnica los métodos para llevar a cabo ensayos ELISA y también se describen en la sección de Ejemplos más adelante. En algunas modalidades, se utiliza resonancia de plasmones superficiales (SPR) para determinar la afinidad de unión, las cinéticas de unión y/o la reactividad cruzada. En algunas modalidades, se utilizan los ensayos de exclusión cinética para determinar la afinidad  
25 de unión, las cinéticas de unión y/o la reactividad cruzada. En algunas modalidades, se utilizan los ensayos de interferometría BioLayer para determinar la afinidad de unión, las cinéticas de unión y/o la reactividad cruzada. evaluación de los efectos de las proteínas de fusión

[0228] La actividad de las proteínas de fusión descritas en la presente que comprenden una progranulina o una variante de esta puede evaluarse mediante el uso de diversos ensayos, que incluyen ensayos que miden la actividad *in vitro* o *in vivo*. Como se describe en los Ejemplos, la absorción celular de las proteínas de fusión descritas en la presente puede evaluarse mediante el uso de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) e inmunotinción con anticuerpos contra progranulina humana y Fc humana. Los efectos celulares provocados por la mutación de *GRN* (por ejemplo, mayor actividad de catepsina D y niveles elevados de ARNm de genes lisosomales tales como *Ctsl*, *Tmem106b* y *Psap*) pueden evaluarse nuevamente después de haber tratado a las células con las proteínas de fusión descritas en la presente (Ejemplos 6 y 7). Pueden usarse en estos ensayos sondas fluorgénicas y técnicas de qPCR. Finalmente, pueden determinarse las propiedades farmacocinéticas y la absorción en el cerebro de las proteínas de fusión descritas en la presente mediante el uso de ratones de tipo salvaje y/o transgénicos, como se muestra en los Ejemplos 9 y 10.

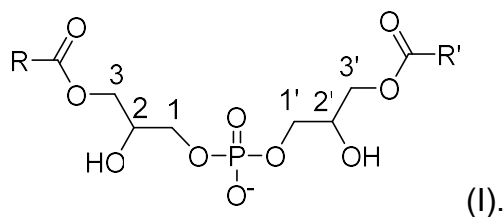
[0229] Para muestras celulares, el ensayo puede incluir alterar las células y abrir microvesículas. La alteración de las células puede lograrse mediante el uso de congelamiento/descongelamiento y/o sonicación. En algunas modalidades, se evalúa una muestra de tejido. Una muestra de tejido puede evaluarse mediante el uso de múltiples ciclos de congelamiento/descongelamiento, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más, que se llevan a cabo antes de la etapa de sonicación para garantizar que se abran las microvesículas.

[0230] Las muestras que pueden evaluarse a través de los ensayos descritos en la presente incluyen, por ejemplo, cerebro, hígado, riñón, pulmón, bazo, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo (LCR) y orina. En algunas modalidades, pueden evaluarse las muestras de LCR de un paciente que recibe una proteína de fusión que comprende una progranulina o una variante de esta como se describe en la presente.

## IX. BIS(MONOACILGLICERO)FOSFATO (BMP)

[0231] Se proporcionan en la presente métodos para monitorear los niveles de progranulina o una variante de progranulina (por ejemplo, en una muestra, en una célula, en un tejido y/o en un sujeto), donde la determinación del nivel de progranulina o la variante de progranulina comprende medir la abundancia de BMP (por ejemplo, en la muestra, célula, tejido y/o sujeto).

[0232] El BMP es un glicerofosfolípido con carga negativa (por ejemplo, al pH presente normalmente dentro de endosomas y lisosomas tardíos) que tiene la estructura que se representa en la Fórmula I:



Las moléculas de BMP comprenden dos cadenas laterales de ácido graso. R y R' en la Fórmula I representan cadenas alifáticas saturadas o insaturadas seleccionadas de manera independiente, cada una de las cuales contiene típicamente 14, 16, 18, 20 o 22 átomos de carbono. Cuando una cadena lateral de ácido graso es insaturada, puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más enlaces dobles carbono-carbono. Además, una molécula de BMP puede contener uno o dos sustituyentes de éter de alquilo, donde el oxígeno de carbonilo de una o ambas cadenas laterales de ácido graso se reemplaza con dos átomos de hidrógeno. La nomenclatura que se usa en la presente para describir una especie particular de BMP hace referencia a una especie que tiene dos cadenas laterales de ácido graso, donde las estructuras de las cadenas laterales de ácido graso se indican dentro de paréntesis en el formato de BMP (por ejemplo, BMP(18:1\_18:1)). Los números siguen el formato estándar de notación de ácidos grasos de la cantidad de "átomos de carbono de ácido graso:cantidad de enlaces dobles". Se usa un prefijo "e-" para indicar la presencia de un sustituyente de éter de

alquilo, donde el oxígeno de carbonilo de la cadena lateral de ácido graso se reemplaza con dos átomos de hidrógeno. Por ejemplo, la “e” de “BMP(16:0e\_18:0)” denota que la cadena lateral que tiene 16 átomos de carbono es un sustituyente de éter de alquilo.

[0233] En algunas modalidades de los métodos de la presente descripción, se mide la abundancia de una única especie de BMP. En algunas modalidades, se mide la abundancia de dos o más especies de BMP. En algunas modalidades, se mide la abundancia de al menos dos, tres, cuatro, cinco o más de las especies de BMP de la Tabla 1. Cuando se mide la abundancia de dos o más especies de BMP, puede utilizarse cualquier combinación de especies distintas de BMP.

10 [0234] En algunas modalidades, puede sumarse la abundancia de más de una especie de BMP, y la abundancia total se compara con un valor de referencia. Por ejemplo, se puede sumar la abundancia de una o más especies de BMP (por ejemplo, las especies de BMP enumeradas en la Tabla 1), y luego se puede comparar la abundancia total con un valor de referencia.

15 Tabla 1. Especies de BMP

| <b>Nombre</b>  | <b>Átomos de carbono<br/>totales :<br/>insaturaciones<br/>totales</b> | <b>Nombre</b>   | <b>Átomos de carbono<br/>totales :<br/>insaturaciones<br/>totales</b> | <b>Nombre</b>  | <b>Átomos de carbono<br/>totales :<br/>insaturaciones<br/>totales</b> |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------|
| BMP(14:0_14:0) | BMP(28:0)                                                             | BMP(16:0e_20:5) | BMP(36:5)                                                             | BMP(18:3_20:3) | BMP(38:6)                                                             |
| BMP(14:0_16:0) | BMP(30:0)                                                             | BMP(16:0e_22:4) | BMP(38:4)                                                             | BMP(18:3_20:4) | BMP(38:7)                                                             |
| BMP(14:0_16:1) | BMP(30:1)                                                             | BMP(16:0e_22:6) | BMP(38:6)                                                             | BMP(18:3_20:5) | BMP(38:8)                                                             |
| BMP(14:0_18:0) | BMP(32:0)                                                             | BMP(16:1e_14:0) | BMP(30:1)                                                             | BMP(18:3_22:4) | BMP(40:7)                                                             |

| <b>Nombre</b>  | <b>Átomos de carbono<br/>totales :<br/>insaturaciones totales</b> | <b>Nombre</b>   | <b>Átomos de carbono<br/>totales :<br/>insaturaciones totales</b> | <b>Nombre</b>   | <b>Átomos de carbono<br/>totales :<br/>insaturaciones totales</b> |
|----------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------|
| BMP(14:0_18:1) | BMP(32:1)                                                         | BMP(16:1e_16:0) | BMP(32:1)                                                         | BMP(18:3_22:5)  | BMP(40:8)                                                         |
| BMP(14:0_18:2) | BMP(32:2)                                                         | BMP(16:1e_18:0) | BMP(34:1)                                                         | BMP(18:3_22:6)  | BMP(40:9)                                                         |
| BMP(14:0_18:3) | BMP(32:3)                                                         | BMP(16:1e_18:1) | BMP(34:2)                                                         | BMP(18:0e_14:0) | BMP(32:0)                                                         |
| BMP(14:0_20:1) | BMP(34:1)                                                         | BMP(16:1e_18:2) | BMP(34:3)                                                         | BMP(18:0e_16:0) | BMP(34:0)                                                         |
| BMP(14:0_20:2) | BMP(34:2)                                                         | BMP(16:1e_18:3) | BMP(34:4)                                                         | BMP(18:0e_18:0) | BMP(36:0)                                                         |
| BMP(14:0_20:3) | BMP(34:3)                                                         | BMP(16:1e_20:3) | BMP(36:4)                                                         | BMP(18:0e_18:1) | BMP(36:1)                                                         |
| BMP(14:0_20:4) | BMP(34:4)                                                         | BMP(16:1e_20:4) | BMP(36:5)                                                         | BMP(18:0e_18:2) | BMP(36:2)                                                         |
| BMP(14:0_20:5) | BMP(34:5)                                                         | BMP(16:1e_20:5) | BMP(36:6)                                                         | BMP(18:0e_18:3) | BMP(36:3)                                                         |
| BMP(14:0_22:4) | BMP(36:4)                                                         | BMP(16:1e_22:4) | BMP(38:5)                                                         | BMP(18:0e_20:3) | BMP(38:3)                                                         |
| BMP(14:0_22:5) | BMP(36:5)                                                         | BMP(16:1e_22:6) | BMP(38:7)                                                         | BMP(18:0e_20:4) | BMP(38:4)                                                         |
| BMP(14:0_22:6) | BMP(36:6)                                                         | BMP(18:0_18:0)  | BMP(36:0)                                                         | BMP(18:0e_20:5) | BMP(38:5)                                                         |
| BMP(16:0_16:0) | BMP(32:0)                                                         | BMP(18:0_18:1)  | BMP(36:1)                                                         | BMP(18:0e_22:4) | BMP(40:4)                                                         |
| BMP(16:0_16:1) | BMP(32:1)                                                         | BMP(18:0_18:2)  | BMP(36:2)                                                         | BMP(18:0e_22:6) | BMP(40:6)                                                         |



| <b>Nombre</b>  | <b>Átomos de carbono<br/>totales :<br/>insaturaciones totales</b> | <b>Nombre</b>  | <b>Átomos de carbono<br/>totales :<br/>insaturaciones totales</b> | <b>Nombre</b>   | <b>Átomos de carbono<br/>totales :<br/>insaturaciones totales</b> |
|----------------|-------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------|
| BMP(16:0_18:0) | BMP(34:0)                                                         | BMP(18:0_18:3) | BMP(36:3)                                                         | BMP(18:1e_14:0) | BMP(32:1)                                                         |
| BMP(16:0_18:1) | BMP(34:1)                                                         | BMP(18:0_20:1) | BMP(38:1)                                                         | BMP(18:1e_16:0) | BMP(34:1)                                                         |
| BMP(16:0_18:2) | BMP(34:2)                                                         | BMP(18:0_20:2) | BMP(38:2)                                                         | BMP(18:1e_18:0) | BMP(36:1)                                                         |
| BMP(16:0_18:3) | BMP(34:3)                                                         | BMP(18:0_20:3) | BMP(38:3)                                                         | BMP(18:1e_18:1) | BMP(36:2)                                                         |
| BMP(16:0_20:1) | BMP(36:1)                                                         | BMP(18:0_20:4) | BMP(38:4)                                                         | BMP(18:1e_18:2) | BMP(36:3)                                                         |
| BMP(16:0_20:2) | BMP(36:2)                                                         | BMP(18:0_20:5) | BMP(38:5)                                                         | BMP(18:1e_18:3) | BMP(36:4)                                                         |
| BMP(16:0_20:3) | BMP(36:3)                                                         | BMP(18:0_22:4) | BMP(40:4)                                                         | BMP(18:1e_20:3) | BMP(38:4)                                                         |
| BMP(16:0_20:4) | BMP(36:4)                                                         | BMP(18:0_22:5) | BMP(40:5)                                                         | BMP(18:1e_20:4) | BMP(38:5)                                                         |
| BMP(16:0_20:5) | BMP(36:5)                                                         | BMP(18:0_22:6) | BMP(40:6)                                                         | BMP(18:1e_20:5) | BMP(38:6)                                                         |
| BMP(16:0_22:4) | BMP(38:4)                                                         | BMP(18:1_18:1) | BMP(36:2)                                                         | BMP(18:1e_22:4) | BMP(40:5)                                                         |
| BMP(16:0_22:5) | BMP(38:5)                                                         | BMP(18:1_18:2) | BMP(36:3)                                                         | BMP(18:1e_22:6) | BMP(40:7)                                                         |
| BMP(16:0_22:6) | BMP(38:6)                                                         | BMP(18:1_18:3) | BMP(36:4)                                                         | BMP(20:3_20:3)  | BMP(40:6)                                                         |
| BMP(16:1_16:1) | BMP(32:2)                                                         | BMP(18:1_20:1) | BMP(38:2)                                                         | BMP(20:3_20:4)  | BMP(40:7)                                                         |

| <b>Nombre</b>       | <b>Átomos de carbono<br/>totales :<br/>insaturaciones totales</b> | <b>Nombre</b>  | <b>Átomos de carbono<br/>totales :<br/>insaturaciones totales</b> | <b>Nombre</b>  | <b>Átomos de carbono<br/>totales :<br/>insaturaciones totales</b> |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------|
| BMP(16:1_18:0)      | BMP(34:1)                                                         | BMP(18:1_20:2) | BMP(38:3)                                                         | BMP(20:3_20:5) | BMP(40:8)                                                         |
| BMP(16:1_18:1)      | BMP(34:2)                                                         | BMP(18:1_20:3) | BMP(38:4)                                                         | BMP(20:3_22:4) | BMP(42:7)                                                         |
| BMP(16:1_18:2)      | BMP(34:3)                                                         | BMP(18:1_20:4) | BMP(38:5)                                                         | BMP(20:3_22:5) | BMP(42:8)                                                         |
| BMP(16:1_18:3)      | BMP(34:4)                                                         | BMP(18:1_20:5) | BMP(38:6)                                                         | BMP(20:3_22:6) | BMP(42:9)                                                         |
| BMP(16:1_20:1)      | BMP(36:2)                                                         | BMP(18:1_22:4) | BMP(40:5)                                                         | BMP(20:4_20:4) | BMP(40:8)                                                         |
| BMP(16:1_20:2)      | BMP(36:3)                                                         | BMP(18:1_22:5) | BMP(40:6)                                                         | BMP(20:4_20:5) | BMP(40:9)                                                         |
| BMP(16:1_20:3)      | BMP(36:4)                                                         | BMP(18:1_22:6) | BMP(40:7)                                                         | BMP(20:4_22:4) | BMP(42:8)                                                         |
| BMP(16:1_20:4)      | BMP(36:5)                                                         | BMP(18:2_18:2) | BMP(36:4)                                                         | BMP(20:4_22:5) | BMP(42:9)                                                         |
| BMP(16:1_20:5)      | BMP(36:6)                                                         | BMP(18:2_18:3) | BMP(36:5)                                                         | BMP(20:4_22:6) | BMP(42:10)                                                        |
| BMP(16:1_22:4)      | BMP(38:5)                                                         | BMP(18:2_20:1) | BMP(38:3)                                                         | BMP(20:5_20:5) | BMP(40:10)                                                        |
| BMP(16:1_22:5)      | BMP(38:6)                                                         | BMP(18:2_20:2) | BMP(38:4)                                                         | BMP(20:5_22:4) | BMP(42:9)                                                         |
| BMP(16:1_22:6)      | BMP(38:7)                                                         | BMP(18:2_20:3) | BMP(38:5)                                                         | BMP(20:5_22:5) | BMP(42:10)                                                        |
| BMP(16:0e_14:0<br>) | BMP(40:0)                                                         | BMP(18:2_20:4) | BMP(38:6)                                                         | BMP(20:5_22:6) | BMP(42:11)                                                        |

| <b>Nombre</b>   | <b>Átomos de carbono<br/>totales :<br/>insaturaciones totales</b> | <b>Nombre</b>  | <b>Átomos de carbono<br/>totales :<br/>insaturaciones totales</b> | <b>Nombre</b>  | <b>Átomos de carbono<br/>totales :<br/>insaturaciones totales</b> |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------|
| BMP(16:0e_16:0) | BMP(32:0)                                                         | BMP(18:2_20:5) | BMP(38:7)                                                         | BMP(22:4_22:4) | BMP(44:8)                                                         |
| BMP(16:0e_18:0) | BMP(34:0)                                                         | BMP(18:2_22:4) | BMP(40:6)                                                         | BMP(22:4_22:5) | BMP(44:9)                                                         |
| BMP(16:0e_18:1) | BMP(34:1)                                                         | BMP(18:2_22:5) | BMP(40:7)                                                         | BMP(22:4_22:6) | BMP(44:10)                                                        |
| BMP(16:0e_18:2) | BMP(34:2)                                                         | BMP(18:2_22:6) | BMP(40:8)                                                         | BMP(22:6_22:6) | BMP(44:12)                                                        |
| BMP(16:0e_18:3) | BMP(34:3)                                                         | BMP(18:3_18:3) | BMP(36:6)                                                         |                |                                                                   |
| BMP(16:0e_20:3) | BMP(36:3)                                                         | BMP(18:3_20:1) | BMP(38:4)                                                         |                |                                                                   |
| BMP(16:0e_20:4) | BMP(36:4)                                                         | BMP(18:3_20:2) | BMP(38:5)                                                         |                |                                                                   |

[0235] En algunos casos, una o más especies de BMP pueden expresarse de forma diferencial (por ejemplo, más o menos abundantes) en un tipo de muestra en comparación con otra, tal como, por ejemplo, muestras de base celular (por ejemplo,

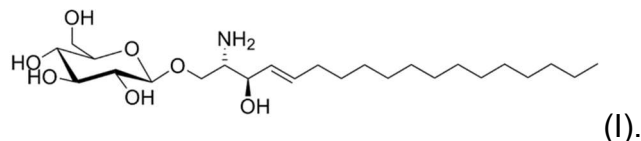
células cultivadas) en comparación con muestras de base tisular o sanguínea. Por consiguiente, en algunas modalidades, la selección de la o las especies de BMP (es decir, para la medición de la abundancia) depende del tipo de muestra. En algunas modalidades, la o las especies de BMP comprenden BMP(18:1\_18:1), por ejemplo, cuando una muestra (por ejemplo, una muestra de prueba y/o una muestra de referencia) incluye BMDM. En otras modalidades, la o las especies de BMP comprenden BMP(20:4\_20:4), por ejemplo, cuando una muestra comprende tejido (por ejemplo, tejido cerebral, tejido hepático) o plasma, orina o LCR. En otras modalidades, la o las especies de BMP comprenden BMP(22:6\_22:6), por ejemplo, cuando una muestra comprende tejido (por ejemplo, tejido cerebral, tejido hepático) o plasma, orina o LCR.

[0236] En algunas modalidades, se usa un estándar interno de BMP (por ejemplo, BMP(14:0\_14:0)) para medir la abundancia de una o más especies de BMP en una muestra y/o determinar un valor de referencia (por ejemplo, medir la abundancia de una o más especies de BMP en una muestra de referencia). Por ejemplo, puede agregarse una cantidad conocida del estándar interno de BMP a una muestra (por ejemplo, una muestra de prueba y/o una muestra de referencia) para que funcione como punto de calibración, de forma tal que se pueda determinar la cantidad de una o más especies de BMP presentes en la muestra. En algunas modalidades, un reactivo utilizado en la extracción o aislamiento de BMP de una muestra (por ejemplo, metanol) está “adicionado” con el estándar interno de BMP. Típicamente, el estándar interno de BMP es uno que no se produzca de forma natural en el sujeto.

#### X. GLUCOSILESFINGOSINA (GLCSPH)

[0237] Se proporcionan en la presente métodos para monitorear los niveles de progranulina o una variante de progranulina (por ejemplo, en una muestra, en una célula, en un tejido y/o en un sujeto), donde la determinación del nivel de progranulina o la variante de progranulina comprende medir la abundancia de glucosilesfingosina (GlcSph) (por ejemplo, en la muestra, célula, tejido y/o sujeto).

[0238] GlcSph es un lisoglicoesfingolípido que tiene la estructura representada en la Fórmula I:



[0239] GlcSph es un sustrato de glucocerebrosidasa (GCasa) y se halló que se acumula en células y tejidos de pacientes con la enfermedad de Gaucher humana y modelos de ratón que presentan actividad reducida de la GCasa. La acumulación de GlcSph está implicada con las patologías viscerales y neuronales observadas en la enfermedad de Gaucher.

[0240] En algunas modalidades, la abundancia de GlcSph puede compararse con un valor de referencia. En algunas modalidades, un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer un trastorno asociado a la progranulina tiene un nivel aumentado de GlcSph en comparación con el valor de referencia, por ejemplo, la abundancia de GlcSph en la muestra de prueba del sujeto puede ser al menos de 1,2 veces (por ejemplo, alrededor de 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces, 10 veces) el valor de referencia. En algunas modalidades, el valor de referencia es el nivel de GlcSph en una muestra de prueba del sujeto que padece o tiene riesgo de padecer un trastorno asociado a la progranulina antes de que el sujeto reciba tratamiento.

[0241] En algunas modalidades de los métodos, el valor de referencia se mide en una muestra de referencia obtenida de un sujeto de referencia o una población de sujetos de referencia. El sujeto de referencia o la población de sujetos de referencia puede ser un sujeto de control sano o una población de sujetos de control sanos. El sujeto de referencia o población de sujetos de referencia puede ser un sujeto o población de sujetos que no tienen un trastorno asociado con la progranulina ni un

nivel menor de progranulina. En algunas modalidades, después de que el sujeto que padece o tiene riesgo de padecer un trastorno asociado a la progranulina recibe tratamiento, el nivel de GlcSph en una muestra de prueba del sujeto puede mejorar con respecto al nivel de GlcSph en una muestra de prueba del sujeto antes de que el

5 sujeto recibiera cualquier tratamiento. En algunas modalidades, el nivel mejorado de GlcSph está más cerca del valor de referencia (por ejemplo, el valor de referencia medido en una muestra de referencia obtenida de un sujeto de control sano o una población de sujetos de control sanos) que el nivel de GlcSph en el sujeto que padece o tiene riesgo de padecer un trastorno asociado a la progranulina antes de que el sujeto

10 reciba tratamiento, por ejemplo, el nivel mejorado de GlcSph está dentro de alrededor de 20 %, 15 %, 10 % o 5 % del nivel de referencia. En algunas modalidades, el nivel mejorado de GlcSph es sustancialmente igual que el nivel de referencia.

[0242] En algunos casos, en sujetos que padecen o tienen riesgo de padecer un trastorno asociado a la progranulina, el aumento del nivel de GlcSph en comparación

15 con un valor de referencia se puede encontrar en, por ejemplo, sangre entera, plasma, una célula, un tejido, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido intersticial, esputo, orina, linfa o una combinación de estos. En modalidades particulares, el nivel de GlcSph aumentado puede hallarse en el plasma del sujeto. En algunas modalidades de los métodos de la descripción, la muestra de prueba tomada del sujeto que padece o tiene

20 riesgo de padecer un trastorno asociado a la progranulina o uno o más valores de referencia puede comprender o relacionarse con el plasma.

[0243] Además, en sujetos que padecen o tienen riesgo de padecer un trastorno asociado a la progranulina, el aumento del nivel de GlcSph en comparación con un valor de referencia se puede encontrar en el cerebro del sujeto, por ejemplo, en el

25 lóbulo frontal y/o el lóbulo temporal del cerebro. En modalidades particulares, la GlcSph aumentada puede hallarse en una o más regiones del lóbulo frontal, por ejemplo, el giro frontal superior, el giro frontal medio, el giro frontal inferior y/o el giro precentral.

[0244] La muestra de prueba tomada del sujeto que padece o tiene riesgo de padecer un trastorno asociado a la progranulina utilizada en los métodos descritos en la presente puede comprender una célula, tal como una célula sanguínea, una célula cerebral, una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), un macrófago derivado de médula ósea (BMDM), una célula de epitelio pigmentario de la retina (RPE), un eritrocito, un leucocito, un célula neuronal, una célula microglial, una célula de la corteza cerebral, una célula de la médula espinal, una célula de la médula ósea, una célula hepática, una célula renal, una célula esplénica, una célula de pulmón, una célula del ojo, una célula de vellosidad coriónica, una célula muscular, una célula cutánea, un fibroblasto, una célula cardíaca, una célula de nódulo linfático o una combinación de estas. En algunas modalidades, la muestra de prueba comprende una célula sanguínea. En algunas modalidades, la muestra de prueba comprende una célula cerebral.

[0245] La muestra de prueba tomada del sujeto que padece o tiene riesgo de padecer un trastorno asociado a la progranulina utilizada en los métodos descritos en la presente puede comprender un tejido, tal como tejido cerebral, tejido de la corteza cerebral, tejido de la médula espinal, tejido hepático, tejido renal, tejido muscular, tejido cardíaco, tejido ocular, tejido retiniano, un nódulo linfático, médula espinal, tejido cutáneo, tejido de vaso sanguíneo, tejido pulmonar, tejido de bazo, tejido valvular o una combinación de estos. En algunas modalidades, la muestra de prueba comprende tejido cerebral, tal como tejido cerebral del lóbulo frontal o del lóbulo temporal del cerebro del sujeto. En modalidades particulares, el tejido cerebral utilizado en la muestra de prueba puede ser del giro frontal superior, del giro frontal medio, del giro frontal inferior y/o del giro precentral.

[0246] La muestra de prueba tomada del sujeto que padece o tiene riesgo de padecer un trastorno asociado a la progranulina puede comprender un endosoma, un lisosoma, una vesícula extracelular, un exosoma, una microvesícula o una combinación de estos.

[0247] En algunas modalidades, un estándar interno de GlcSph se utiliza para medir

la abundancia de GlcSph en una muestra de prueba de un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer un trastorno asociado a progranulina y/o determinar un valor de referencia (por ejemplo, medir la abundancia de GlcSph en una muestra de referencia). Por ejemplo, puede agregarse una cantidad conocida del estándar interno de GlcSph a una muestra (por ejemplo, una muestra de prueba y/o una muestra de referencia) para que funcione como punto de calibración, de forma tal que se pueda determinar la cantidad de GlcSph que está presente en la muestra. En algunas modalidades, un reactivo utilizado en la extracción o aislamiento de GlcSph de una muestra (por ejemplo, metanol) está “adicionado” con el estándar interno de GlcSph. Típicamente, el estándar interno de GlcSph es uno que no se produce de forma natural en el sujeto. En algunas modalidades, la GlcSph interna es una GlcSph marcada con deuterio, tal como GlcSph(d5) utilizada en los ejemplos.

## XI. MONITOREO DE LAS RESPUESTAS AL TRATAMIENTO

[0248] En un aspecto, la presente descripción proporciona métodos para monitorear los niveles de progranulina o los niveles de la variante de progranulina en un sujeto (por ejemplo, un sujeto objetivo). En otros aspectos, se proporcionan métodos para monitorear la respuesta de un sujeto a una variante de progranulina o una proteína de fusión descrita en la presente, o una composición farmacéutica o régimen de dosificación de esta, para tratar una enfermedad o un trastorno (por ejemplo, cualquiera descrito en la presente).

[0249] Típicamente, la abundancia de cada una de la o las especies de BMP y/o GlcSph en una muestra de ensayo se compara con uno o más valores de referencia (por ejemplo, un valor de referencia correspondiente). En algunas modalidades, un valor de BMP y/o un valor de GlcSph se mide antes del tratamiento y en uno o más puntos temporales después del tratamiento. El valor de abundancia tomado en un punto temporal posterior puede compararse con el valor previo al tratamiento, así como con un valor de control, tal como el de un control sano o enfermo, para determinar cómo responde el sujeto a la terapia. El o los valores de referencia pueden ser de



distintas células, tejidos o fluidos correspondientes a la célula, tejido o fluido de la muestra de prueba.

[0250] En algunas modalidades, el valor de referencia es la abundancia de la o las especies de BMP que se mide en una muestra de referencia. En algunas modalidades, el valor de referencia es la abundancia de GlcSph que se mide en una muestra de referencia. El valor de referencia puede ser un valor de abundancia medido (por ejemplo, valor de abundancia medido en la muestra de referencia) o puede derivarse o extrapolarse a partir de un valor de abundancia medido. En algunas modalidades, el valor de referencia es un intervalo de valor, por ejemplo, cuando los valores de referencia se obtienen de múltiples muestras o una población de sujetos. Además, el valor de referencia puede presentarse como un único valor (por ejemplo, un valor de abundancia medido, un valor promedio o la mediana de un valor) o un intervalo de valores, con o sin una desviación estándar o estándar de error.

[0251] Cuando se obtienen dos o más muestras de prueba (por ejemplo, de un sujeto), los momentos en los que se obtienen pueden estar separados por alrededor de 1, 12, 24 o más horas; alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días; alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más semanas; o incluso más. Cuando se obtienen tres o más muestras de ensayo, los intervalos temporales entre el momento en que se obtiene cada muestra de prueba pueden ser todos iguales, pueden ser distintos, o una combinación de estos.

[0252] En algunas modalidades, tanto la primera muestra de prueba como la segunda muestra de prueba se obtienen de un sujeto (por ejemplo, un sujeto objetivo) después de haber sido tratado, es decir, la primera muestra de prueba se obtiene del sujeto en un punto temporal anterior durante el tratamiento que la segunda muestra de prueba. En algunas modalidades, la primera muestra de prueba se obtiene antes de haber tratado al sujeto para el trastorno asociado con un nivel reducido de progranulina (es decir, una muestra de prueba previa al tratamiento) y la segunda muestra de prueba se obtiene después de haber tratado al sujeto para el trastorno asociado con

un nivel reducido de progranulina (es decir, una muestra de prueba después del tratamiento). En algunas modalidades, se obtiene del sujeto más de una (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) muestra de prueba previa o posterior al tratamiento. Además, no es necesario que la cantidad de muestras de ensayo previas y posteriores al tratamiento obtenidas sea la misma.

[0253] En algunas modalidades, puede determinarse que el sujeto no responde al tratamiento cuando la abundancia de la especie de BMP medida se encuentra a menos de alrededor de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o 20 % del valor de referencia que se tomó en una muestra de referencia del sujeto antes de que el sujeto recibiera cualquier tratamiento.

[0254] En algunas modalidades, puede determinarse que el sujeto responde al tratamiento cuando la abundancia de la especie de BMP medida se encuentra a menos de alrededor de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o 20 % del valor de referencia que se tomó en una muestra de referencia de un sujeto de control sano.

[0255] En algunas modalidades, puede determinarse que el sujeto no responde al tratamiento cuando la abundancia de GlcSph medida se encuentra a menos de alrededor de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o 20 % del valor de referencia que se tomó en una muestra de referencia del sujeto antes de que el sujeto recibiera cualquier tratamiento.

[0256] En algunas modalidades, puede determinarse que el sujeto responde al tratamiento cuando la abundancia de GlcSph medida se encuentra a menos de alrededor de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o 20 % del valor de referencia que se tomó en una muestra de referencia de un sujeto de control sano.

- [0257] Cuando un sujeto (por ejemplo, un sujeto objetivo) no responde al tratamiento (por ejemplo, para un trastorno asociado con un nivel reducido de progranulina), en algunas modalidades, se altera (por ejemplo, aumenta) la dosificación de uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, progranulina) y/o se altera el intervalo de dosificación (por ejemplo, se reduce el tiempo entre las dosis). En algunas modalidades, cuando un sujeto no responde al tratamiento, se selecciona un agente terapéutico distinto. En algunas modalidades, cuando un sujeto no responde al tratamiento, se interrumpen uno o más agentes terapéuticos.

## XII. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE BMP Y GLCSPH

- 10 [0258] En algunas modalidades, pueden utilizarse anticuerpos para detectar y/o medir la abundancia de una o más especies de BMP y/o GlcSph. En algunas modalidades, pueden detectarse las especies de BMP unidas al anticuerpo, tal como mediante microscopía o ELISA. En algunas modalidades, pueden detectarse la GlcSph unida al anticuerpo, tal como mediante microscopía o ELISA.
- 15 [0259] En otras modalidades, se utiliza espectrometría de masa (MS) para detectar y/o medir la abundancia de una o más especies de BMP y/o GlcSph de acuerdo con métodos de la presente descripción. La espectrometría de masa es una técnica en la cual se ionizan los compuestos, y los iones resultantes se clasifican según su relación de masa con respecto a carga (abreviado  $m/Q$ ,  $m/q$ ,  $m/Z$  o  $m/z$ ). Una muestra (por ejemplo, que comprende una molécula de BMP y/o una molécula de GlcSph), que puede estar presente en forma gaseosa, líquida o sólida, se ioniza, y luego se aceleran los iones resultantes a través de un campo eléctrico y/o magnético, lo que provoca que se separen de acuerdo con sus relaciones de masa con respecto a carga. Los iones finalmente golpean un detector de iones y se genera un espectrograma de masas. Las relaciones de masa con respecto a carga de los iones detectados, junto con su abundancia relativa, pueden usarse para identificar el o los compuestos originales, a veces al correlacionar masas conocidas (por ejemplo, de moléculas completas o intactas) con las masas de los iones detectados y/o mediante el reconocimiento de
- 20
- 25

patrones que se detectan en el espectrograma de masas.

[0260] En algunas modalidades, la o las especies de BMP y/o GlcSph pueden detectarse mediante MS simple, que utiliza un único analizador de masas (por ejemplo, cuadrupolo). En algunas modalidades, la o las especies de BMP y/o GlcSph pueden detectarse mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) que utiliza una serie de analizadores de masas (por ejemplo, tres analizadores de masas) para llevar a cabo múltiples rondas de espectrometría de masas, que típicamente tienen una etapa intermedia de fragmentación de moléculas.

[0261] Pueden usarse varios métodos para la fragmentación, que incluyen, de modo no taxativo, disociación inducida por colisión (CID), disociación por captura de electrones (ECD), disociación por transferencia de electrones (ETD), disociación multifotónica por infrarrojos (IRMPD), disociación por radiación infrarroja de cuerpos negros (BIRD), disociación por desprendimiento de electrones (EDD) y disociación inducida por la superficie (SID).

[0262] Pueden usarse espectrómetros de masas en tándem para llevar a cabo distintos tipos de experimentos, que incluyen barridos completos, barridos de iones producto, barridos de iones precursores, barridos de pérdidas neutras y barridos de monitoreo de reacción selectiva (o múltiple) (SRM o MRM). En un experimento de barrido completo, se analiza el intervalo de masa completo (o una parte de este) de ambos analizadores de masas (por ejemplo, Q1 y Q3) y el segundo analizador de masas (por ejemplo, Q2) no contiene ningún gas de colisión. Esto permite la detección de todos los iones contenidos en una muestra. En un experimento de barrido de iones producto, se selecciona una relación de masa con respecto a carga específica para el primer analizador de masas (por ejemplo, Q1), el segundo analizador de masas (por ejemplo, Q2) se rellena con un gas de colisión para fragmentar los iones que tienen la relación de masa con respecto a carga seleccionada, y luego se analiza el intervalo de masas completo (o una parte de este) del tercer analizador de masas (por ejemplo, Q3). Esto permite la detección de todos los fragmentos de iones de un precursor

seleccionado. En un experimento de barrido de iones precursores, se analiza el intervalo de masas completo (o una parte de este) del primer analizador de masas (por ejemplo, Q1), el segundo analizador de masas (por ejemplo, Q2) se rellena con gas de colisión para fragmentar los iones que se encuentran dentro del intervalo de barrido, y se selecciona una relación de masa con respecto a carga específica para el tercer analizador de masas (por ejemplo, Q3). Al correlacionar el tiempo entre la detección de un ion producto y la relación de masa con respecto a carga particular que se seleccionó justo antes de su detección, este tipo de experimento puede permitir al usuario determinar qué iones precursores pueden haber generado el ion producto de interés. En un experimento de barrido de pérdida neutra, se explora el intervalo de masas completo (o una parte de este) del primer analizador de masas (por ejemplo, Q1), el segundo analizador de masas (por ejemplo, Q2) se rellena con gas de colisión para fragmentar todos los iones dentro del intervalo de exploración, y el tercer analizador de masas (por ejemplo, Q3) se analiza a lo largo de un intervalo específico que corresponde a la pérdida inducida por la fragmentación de una sola masa específica que se produjo para cada posible ion dentro del intervalo de barrido de precursores. Este tipo de experimento permite la identificación de todos los precursores que perdieron un grupo químico de interés en particular (por ejemplo, un grupo metilo) en común. En un experimento de MRM, se selecciona una relación de masa con respecto a carga específica para el primer analizador de masas (por ejemplo, Q1), el segundo analizador de masas (por ejemplo, Q2) se rellena con gas de colisión, y el tercer analizador de masas (por ejemplo, Q3) se fija para otra relación de masa con respecto a carga específica. Este tipo de experimento permite la detección muy específica de moléculas que se conoce que se fragmentan en los productos que se buscan en el tercer analizador de masas. Los métodos de MS y MS/MS se describen adicionalmente en Grebe et ál. *Clin. Biochem. Rev.* (2011) 32:5-31, que se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad a todos los efectos.

[0263] Además, las técnicas de MS y MS/MS pueden acoplarse con técnicas de cromatografía líquida (LC) o cromatografía de gases (GC). Estos métodos de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), cromatografía líquida-

espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía de gases-espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) permiten una mejor resolución de masas y una mejor determinación de masas en comparación con lo que es posible típicamente con MS o MS/MS solas.

[0264] La cromatografía líquida hace referencia a un proceso en el que uno o más componentes de una solución de fluidos se retrasa de manera selectiva a medida que el fluido se filtra de manera uniforme a través de una columna de una sustancia dividida finamente, o a través de pasajes capilares. El retardo es resultado de la distribución de los componentes de la mezcla entre una o más fases estacionarias y el fluido a granel (es decir, fase móvil), a medida que el fluido se mueve en relación con la o las fases estacionarias. La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), a veces denominada también “cromatografía líquida de presión elevada”, es una variante de LC en la que se aumenta el grado de separación al forzar la fase móvil bajo presión a través de una fase estacionaria, típicamente una columna muy compacta.

[0265] Además, la cromatografía líquida de rendimiento ultraelevado (UHPLC), también conocida como “cromatografía líquida de presión ultraelevada” o “cromatografía líquida de rendimiento ultraelevado (UPLC)”, es una variante de la HPLC que se lleva a cabo mediante el uso de presiones mucho mayores que las de las técnicas tradicionales de HPLC.

[0266] La cromatografía de gases hace referencia a un método para separar y/o analizar compuestos que pueden vaporizarse sin descomponerse. La fase móvil es un gas portador que típicamente es un gas inerte (por ejemplo, helio) o un gas no reactivo (por ejemplo, nitrógeno), y la fase estacionaria es típicamente un líquido microscópico o capa polimérica colocada sobre un soporte sólido inerte dentro de un tubo de vidrio o metal que funciona como la “columna”. A medida que los compuestos gaseosos de interés interactúan con la fase estacionaria dentro de la columna, se retrasan de forma diferenciada y se eluyen de la columna en momentos distintos. Los compuestos

separados pueden introducirse luego en el espectrómetro de masas.

[0267] En algunas modalidades, se usan métodos a base de anticuerpos para detectar y/o medir la abundancia de una o más especies de BMP y/o GlcSph. Los ejemplos no taxativos de métodos adecuados incluyen técnicas de ELISA, inmunofluorescencia y radioinmunoensayo (RIA). Se conocen en la técnica los métodos para llevar a cabo técnicas de ELISA, inmunofluorescencia y RIA.

[0268] Es posible utilizar cualquier cantidad de tipos de muestras como muestra de prueba y/o muestra de referencia en métodos de la presente descripción, siempre y cuando la muestra comprenda BMP y/o GlcSph en una cantidad suficiente para detección, de forma tal que pueda medirse la abundancia. Los ejemplos no taxativos incluyen células, tejidos, sangre (por ejemplo, sangre entera, plasma, suero), fluidos (por ejemplo, líquido cefalorraquídeo, orina, líquido de lavado broncoalveolar, linfa, semen, leche materna, líquido amniótico), heces, esputo o cualquier combinación de estos. Los ejemplos no taxativos de tipos de células adecuadas incluyen BMDM, células sanguíneas (por ejemplo, PBMC, eritrocitos, leucocitos), células neuronales (por ejemplo, células cerebrales, células de la corteza cerebral, células de la médula espinal), células de la médula ósea, células hepáticas, células renales, células esplénicas, células pulmonares, células oculares (por ejemplo, células retinianas tales como células RPE), células de vellosidad coriónica, células musculares, células cutáneas, fibroblastos, células cardíacas, células de nódulo linfático o una combinación de estas. En algunas modalidades, la muestra comprende una parte de una célula. En algunas modalidades, la muestra se purifica a partir de una célula o tejido. Los ejemplos no taxativos de muestras purificadas incluyen endosomas, lisosomas, vesículas extracelulares (por ejemplo, exosomas, microvesículas) y combinaciones de estos.

[0269] En algunas modalidades, la muestra (por ejemplo, muestra de prueba y/o muestra de referencia) comprende una célula que es una célula cultivada. Los ejemplos no taxativos incluyen células de RPE y BMDM. Los BMDM pueden

obtenerse, por ejemplo, al obtener una muestra que comprende PBMC y cultivar los monocitos contenidos en esta.

[0270] Los ejemplos no taxativos de tipos de muestras de tejido adecuadas incluyen tejido neuronal (por ejemplo, tejido cerebral, tejido de la corteza cerebral, tejido de la médula espinal), tejido hepático, tejido renal, tejido muscular, tejido cardíaco, tejido ocular (por ejemplo, tejido retiniano), nódulos linfáticos, médula espinal, tejido cutáneo, tejido de vasos sanguíneos, tejido pulmonar, tejido de bazo, tejido valvular o una combinación de estos. En algunas modalidades, una muestra de prueba y/o una muestra de referencia comprende tejido cerebral o tejido hepático. En algunas modalidades, una muestra de prueba y/o referencia comprende plasma.

### XIII. ÁCIDOS NUCLEICOS, VECTORES Y CÉLULAS HOSPEDADORAS

[0271] Las cadenas de polipéptidos contenidas en las proteínas de fusión descritas en la presente se preparan típicamente mediante el uso de métodos recombinantes. Por consiguiente, en algunos aspectos, la descripción proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica cualquiera de las variantes de progranulina, polipéptidos o proteínas de fusión, tal como se describen en la presente, y las células hospedadoras en las cuales se introducen los ácidos nucleicos que se usan para replicar los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos y/o para expresar los polipéptidos. En algunas modalidades, la célula hospedadora es eucariota, por ejemplo, una célula humana.

[0272] En otro aspecto, se proporcionan polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica las cadenas de polipéptidos y variantes de progranulina descritas en la presente. Los polinucleótidos pueden ser de cadena simple o de cadena doble. En algunas modalidades, el polinucleótido es ADN. En modalidades particulares, el polinucleótido es ADNc. En algunas modalidades, el polinucleótido es ARN.



[0273] La descripción proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO:98-108 y 123-126. También se proporciona en la presente un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifican una variante de progranulina que tiene la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO:3-57, 111-121, 127 y 128.

[0274] En algunas modalidades, el polinucleótido se incluye dentro de una construcción de ácido nucleico. En algunas modalidades, la construcción es un vector replicable. En algunas modalidades, el vector se selecciona de un plásmido, un vector viral, un fagémido, un vector cromosómico de levadura y un vector de mamífero no episomal.

[0275] En algunas modalidades, el polinucleótido se enlaza en forma operativa a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en una construcción de expresión. En una serie de modalidades, las construcciones de expresión de ácido nucleico se adaptan para su uso como biblioteca de expresión superficial. En algunas modalidades, la biblioteca se adapta para expresión superficial en levaduras. En algunas modalidades, la biblioteca se adapta para la expresión superficial en fagos. En otra serie de modalidades, las construcciones de expresión de ácidos nucleicos se adaptan para la expresión del polipéptido en un sistema que permita el aislamiento del polipéptido en cantidades de miligramos o gramos. En algunas modalidades, el sistema es un sistema de expresión de células de mamíferos. En algunas modalidades, el sistema es un sistema de expresión celular de levaduras.

[0276] Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los siguientes tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariotas, tales como *E. coli*. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt,

pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para la transfección de células eucariotas. De manera alternativa, se pueden usar derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus Epstein-Barr (derivados de pHEBo, pREP y p205) para la expresión transitoria de polipéptidos en células eucariotas. En algunas modalidades, puede ser deseable expresar el polipéptido recombinante con el uso de un sistema de expresión en baculovirus. Los ejemplos de tales sistemas de expresión en baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac. Los sistemas de expresión adicionales incluyen adenovíricos, virus adenoasociados y otros sistemas de expresión viral.

[0277] Los vectores pueden transformarse en cualquier célula hospedadora adecuada. En algunas modalidades, las células hospedadoras, por ejemplo, células de bacterias o levaduras, se pueden adaptar para su uso como una biblioteca de expresión superficial. En algunas células, los vectores se expresan en células hospedadoras para expresar cantidades relativamente grandes del polipéptido. Tales células hospedadoras incluyen células de mamífero, células de levaduras, células de insectos y células procariotas. En algunas modalidades, las células son células de mamífero, tales como células CHO, células de riñón de hámster bebé (BHK), células NS0, células Y0, células HEK293, células COS, células Vero o células HeLa. En modalidades particulares, las células son células CHO.

[0278] Es posible cultivar una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que codifica una o más variantes de progranulina para una proteína de fusión descrita en la presente en condiciones adecuadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido. Los polipéptidos pueden secretarse y aislarse de una mezcla de células y medio que contiene los polipéptidos. Alternativamente, el polipéptido se puede retener en el citoplasma o en una fracción de membrana y se pueden recolectar y lisar las células y el polipéptido aislado con un método deseado.

#### XIV. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y KITS

[0279] En otros aspectos, se proporcionan composiciones farmacéuticas y kits que comprenden una variante de progranulina o una proteína de fusión de acuerdo con la descripción.

##### 5 Composiciones farmacéuticas

[0280] Una orientación para la preparación de formulaciones para utilizar en la descripción puede hallarse en cualquier cantidad de manuales de preparaciones y formulaciones farmacéuticas que conocen los expertos en la técnica.

[0281] En algunas modalidades, una composición farmacéutica comprende una variante de progranulina o proteína de fusión descrita en la presente y comprende además uno o más portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye cualquier solvente, medio de dispersión o recubrimiento que sea compatible fisiológicamente y que no interfiera con la actividad del agente activo ni la inhiba de otra forma.

15 [0282] La variante de progranulina o proteína de fusión se puede formular para administración parenteral por inyección. Normalmente, una composición farmacéutica para su uso en la administración *in vivo* es estéril, por ejemplo, esterilización por calor, esterilización por vapor, filtración estéril o irradiación.

20 [0283] Las dosificaciones y la concentración deseada del fármaco de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden variar en función del uso particular previsto.

##### Equipos

[0284] En algunas modalidades, se proporciona un kit para utilizar en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, FTD, NCL, NPA, NPB, NPC,

FTD/ELA asociada con C9ORF72, ELA esporádica, AD, enfermedad de Gaucher (por ejemplo, enfermedad de Gaucher de tipo 2 y 3) y enfermedad de Parkinson), aterosclerosis, un trastorno asociado con TDP-43 y AMD y un trastorno asociado con la progranulina) que comprende una proteína de fusión descrita en la presente.

- 5 [0285] En algunas modalidades, el kit comprende además uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, en algunas modalidades, el kit comprende una variante de progranulina o proteína de fusión descrita en la presente y comprende además uno o más agentes terapéuticos adicionales para usar en el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno descrito en la presente (por ejemplo, una
- 10 enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, FTD)). En algunas modalidades, el kit comprende adicionalmente materiales instructivos que contienen directrices (es decir, protocolos) para la puesta en práctica de los métodos descritos en la presente (por ejemplo, instrucciones para usar el kit para administrar una proteína de fusión que comprende la variante de progranulina). Si bien los materiales instructivos comprenden
- 15 típicamente materiales escritos o impresos, no se limitan a estos. La presente descripción contempla cualquier medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Dichos medios incluyen, de modo no taxativo, medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD-ROM) y similares. Dichos medios pueden
- 20 incluir direcciones a sitios de internet que proporcionan dichos materiales instructivos.

## XV. INDICACIONES

- [0286] En algunas modalidades, las variantes de progranulina y las proteínas de fusión descritas en la presente se utilizan para tratar una enfermedad neurodegenerativa o enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, las proteínas
- 25 de fusión descritas en la presente pueden utilizarse para tratar una o más enfermedades neurodegenerativas que se seleccionan del grupo que consiste en AD, tauopatía primaria asociada con la edad, demencia de cuerpos de Lewy, parálisis supranuclear progresiva (PSP), FTD, FTD con Parkinson vinculada al cromosoma 17,

demencia con granos argirófilos, ELA, ELA/complejo de parkinsonismo-demencia de Guam (ELA-PDC), degeneración corticobasal, encefalopatía traumática crónica, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, demencia familiar británica, demencia familiar danesa, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, tauopatía glial globular, parkinsonismo guadalupiano con demencia, PSP guadalupiano, enfermedad de Hallevorden-Spatz, leucoencefalopatía difusa hereditaria con esferoides (HDLS), miositis por cuerpos de inclusión, atrofia multisistémica, distrofia miotónica, enfermedad de Nasu-Hakola, demencia con predominio de ovillos neurofibrilares, NPC, degeneración palido-ponto-nigral, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, parkinsonismo posencefálico, angiopatía amiloide cerebral causada por proteínas priónicas, gliosis subcortical progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda y demencia solo con ovillos.

[0287] Varias enfermedades neurodegenerativas pueden ser provocadas o vincularse con trastornos de depósito lisosomal caracterizados por la acumulación de macromoléculas no digeridas o parcialmente digeridas, lo que finalmente da como resultado una alteración celular y de organismos, así como anomalías clínicas. Los trastornos de depósito lisosomal se definen por el tipo de sustrato acumulado, y pueden clasificarse como trastornos de depósito de colesterol, esfingolipidosis, oligosacaridosis, mucopolidosis, mucopolisacaridosis, trastornos de depósito de lipoproteínas, lipofuscinosis ceroides neuronales y otros. En algunos casos, los trastornos de depósito lisosomal también incluyen deficiencias o defectos en proteínas que dan como resultado la acumulación de macromoléculas, tales como proteínas necesarias para la modificación postraduccion normal de enzimas lisosomales o proteínas importantes para el intercambio lisosomal correcto. Los ejemplos de enfermedades neurodegenerativas que pueden ser provocadas o vincularse con trastornos de depósito lisosomal incluyen, por ejemplo, FTD, NCL, NPA, NPB, NPC, FTD/ELA asociada con C9ORF72, ALS esporádica, AD, enfermedad de Gaucher (por ejemplo, enfermedades de Gaucher de tipo 2 y 3) y enfermedad de Parkinson. En algunas modalidades, las variantes de progranulina y las proteínas de fusión descritas

en la presente se utilizan para tratar una enfermedad neurodegenerativa causada por o vinculada a trastornos de almacenamiento lisosomal, que incluyen, por ejemplo, cualquiera de las enfermedades neurodegenerativas anteriores.

5 [0288] Algunos ejemplos de otros trastornos son la aterosclerosis, un trastorno asociado con TDP-43 y la AMD. Estos trastornos pueden beneficiarse de la administración de las variantes de progranulina o de las proteínas de fusión descritas en la presente.

10 [0289] En algunas modalidades, las variantes de progranulina y las proteínas de fusión descritas en la presente se utilizan para tratar la FTD. La FTD es un trastorno neurodegenerativo progresivo. La FTD incluye un espectro de enfermedades clínica, patológica y genéticamente heterogéneas que presentan la intervención selectiva de los lóbulos frontal y temporal (Gazzina et ál., *Eur J Pharmacol.* 817:76-85, 2017). Las manifestaciones clínicas de la FTD incluyen alteraciones del comportamiento y la personalidad, déficits ejecutivos frontales y disfunción lingüística. En función de la  
15 diversidad de fenotipos clínicos, se han identificado distintas presentaciones, tales como variantes conductuales de FTD (bvFTD) y afasia progresiva primaria (PPA), que puede ser PPA de variante no fluente/agramática (avPPA) o PPA de variante semántica (svPPA). Estas presentaciones clínicas también se superponen con parkinsonismo atípico, tal como síndrome corticobasal (CBS), parálisis supranuclear  
20 progresiva (PSP) y ELA (Gazzina et ál., *Eur J Pharmacol.* 817:76-85, 2017). La FTD se asocia con diversos rasgos característicos neuropatológicos, que incluyen la patología de tau en neuronas y astrocitos o inclusiones de ubiquitina citoplasmática en las neuronas. La proteína de unión a ADN de activación en trans con un peso molecular de 43 kDa (TDP-43) es la patología de proteína ubiquitinada más prominente que se  
25 acumula en la mayoría de los casos de FTD, así como en la ELA (Petkau y Leavitt, *supra*). La FTD es una causa significativa de la demencia temprana, donde hasta el 80 % de los casos se presenta entre los 45 y 64 años. La enfermedad también presenta un componente familiar significativo, donde alrededor de 30-50 % de los casos informa un historial familiar de la enfermedad (Petkau y Leavitt, *supra*).

[0290] En algunas modalidades, las variantes de progranulina y las proteínas de fusión descritas en la presente se utilizan para tratar un trastorno relacionado con una mutación en *GRN* o asociado con esta. Si bien varios genes se han vinculado a la FTD, uno de los genes mutados con mayor frecuencia en la FTD es *GRN*, que se mapea al cromosoma humano 17q21 y codifica la proteína rica en cisteína progranulina (también conocida como proepitelina y acrogranina). Las estimaciones recientes sugieren que las mutaciones de *GRN* representan el 5-20 % de los pacientes con FTD con historial familiar positivo y 1-5 % de casos esporádicos (Rademakers et ál., *supra*). Se desconocen los mecanismos moleculares y celulares precisos que subyacen a la neurodegeneración y los procesos de la enfermedad en la FTD asociada a *GRN*, aunque la caracterización fenotípica de ratones con inactivación de *GRN* combinada con análisis histológicos del cerebro de los pacientes sugiere que tanto la inflamación como las anomalías lisosomales son fundamentales para la enfermedad (Kao et ál., *Nat Rev Neurosci.* 18(6):325-333, 2017). De hecho, se encuentra presente una gliosis masiva en las regiones corticales de los pacientes (Lui et al., *Cell.* 165(4):921-35, 2016) y se ha detectado lipofusina, un pigmento lisosomal que denota un trastorno lisosomal, en el ojo y corteza de los portadores de *GRN* mutada que incluyen pacientes e individuos presintomáticos (Ward et ál., *Sci Transl Med.* 9(385), 2017).

[0291] Se han informado y mapeado en el gen más de setenta mutaciones de enfermedades de *GRN*, donde dan como resultado alelos de pérdida confirmada o prevista de la función (LOF) (Ji et ál. *J Med Genet.* 54:145–154, 2017). La mayoría de las mutaciones heterocigotas unidas a la FTD provocan una reducción de alrededor de 50 % del nivel de ARNm principalmente como resultado de la disminución de ARNm sin sentido y una reducción comparable del nivel de proteína de progranulina (Petkau y Leavitt, *supra*; Kao et ál., *supra*). También se hallan niveles menores de progranulina en la sangre (suero) y líquido cefalorraquídeo (LCR) de los portadores, incluso individuos presintomáticos (Finch et ál., *Nat Rev Neurosci.* 18(6):325-333, 2017; Goossens et ál., *Alzheimers Res Ther.* 10(1):31, 2018; Meeter et ál., *Dement Geriatr Cogn Dis Extra.* 6(2):330-340, 2016). Por lo tanto, se considera que la haploinsuficiencia es el mecanismo principal de la enfermedad en la FTD asociada con

*GRN*, lo que sugiere que los abordajes terapéuticos que elevan los niveles de progranulina en los portadores pueden retrasar la edad de la aparición, así como la evolución de la FTD (Petkau y Leavitt, *supra*; Kao et ál., *supra*). Este concepto se ve respaldado por estudios genéticos humanos que indican que una variante del gen

5 *TMEM106B* potencia los niveles de progranulina un 25 % y retrasa la edad de la aparición de la FTD asociada con *GRN* 13 años (Nicholson y Rademakers, *Acta Neuropathol.* 132(5):639-651, 2016).

[0292] También se han informado mutaciones homocigotas de *GRN*, aunque los portadores presentan un fenotipo clínico muy diferente conocido como NCL

10 (enfermedad de Batten; incidencia 1-2,5 en 100 000 nacidos vivos; Cotman et ál., *Curr Neurol Neurosci Rep.* 13(8):366, 2013), que es un trastorno de depósito lisosomal (Smith et ál., *Am J Hum Genet.* 90(6):1102-7, 2012; Almeida et ál., *Neurobiol Aging.* 41:200.e1-200.e5, 2016). *GRN* es, de hecho, uno de los 14 genes neuronales de lipofuscinosis ceroides (*CLN*) que se ha informado que están vinculados con la NCL y

15 *GRN* también se conoce como *CLN11* (Kollmann et ál., *Biochim Biophys Acta.* 1832(11):1866-81, 2013). Las variantes de progranulina o proteínas de fusión descritas en la presente pueden presentar propiedades antiinflamatorias y potencian la función lisosomal, cualquiera de los cuales puede ser favorable en la NCL. En algunas modalidades, las variantes de progranulina y las proteínas de fusión descritas en la

20 presente se pueden utilizar para tratar la NCL.

[0293] Los pacientes con enfermedad de Gaucher que portan mutaciones homocigotas en el gen *GBA* tienen niveles menores de progranulina en su suero (Jian et ál., *EBioMedicine* 11:127–137, 2016). Los pacientes con enfermedad de Parkinson con mutaciones heterocigotas en *GBA* también pueden tener niveles menores de

25 progranulina. En algunas modalidades, las variantes de progranulina y las proteínas de fusión descritas en la presente pueden usarse para tratar la enfermedad de Gaucher o la enfermedad de Parkinson.

[0294] Determinadas variantes de *GRN* se han vinculado a la AD (Rademakers et ál.,



*supra*; Brouwers et ál., *Neurology*. 71(9):656-64, 2008; Lee et ál., *Neurodegener Dis*. 8(4):216-20, 2011; Viswanathan et ál., *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 150B(5):747-50, 2009) y la patología de TDP-43 es común en el cerebro de pacientes con AD (Youmans y Wolozin, *Exp Neurol*. 237(1):90-5, 2012). También se ha  
5 demostrado que la administración de genes de progranulina disminuye la carga amiloide en modelos de ratón de AD (van Kampen y Kay, *PLoS One*. 12(8):e0182896, 2017). Por lo tanto, en algunas modalidades, las variantes de progranulina y las proteínas de fusión descritas en la presente se pueden utilizar para tratar la AD.

[0295] NPA y NPB son el resultado de mutaciones en el gen que codifica la  
10 esfingomielinasa ácida (SMPD1). La NPC es el resultado de mutaciones en los genes implicados en el transporte de colesterol, es decir, NPC1 y NPC2 (Kolter y Sandhoff, *Annu Rev Cell Dev Biol*. 21:81-103, 2005; Kobayashi et ál., *Nat Cell Biol*. 1(2):113-8, 1999). En algunas modalidades, las variantes de progranulina y las proteínas de fusión descritas en la presente pueden usarse para tratar NPA, NPB y/o NPC.

[0296] La vasta mayoría de casos de ELA presenta la patología de TDP-43, que  
15 también se comparte con los pacientes que portan mutaciones de *GRN* (Petkau y Leavitt, *Trends Neurosci*. 37(7):388-98, 2014; Rademakers et ál., *Nat Rev Neurol*. 8(8):423-34, 2012). Entre todos los casos de ELA, las expansiones de repeticiones de GGGGCC dentro del gen de C9ORF72 son la causa más común de ELA y una causa  
20 significativa de FTD. Las frecuencias de mutación promedio informadas en poblaciones de América del Norte y Europa son de 37 % para ELA familiar, 6 % para ELA esporádica, 21 % para FTD familiar y 6 % para pacientes con FTD esporádica (Rademakers et ál., *supra*). Además, la variante *TMEM106B* que es protectora en FTD asociada con *GRN* también es protectora en pacientes con FTD que presentan  
25 expansiones de repeticiones en el gen de C9ORF72 (van Blitterswijk et ál., *Acta Neuropathol*. 127(3):397-406, 2014). En algunas modalidades, las variantes de progranulina y las proteínas de fusión descritas en la presente pueden usarse para reducir la patología de TDP-43 en ELA/FTD asociada con C9ORF72, por ejemplo, al promover la función lisosomal y/o disminuir la inflamación.

[0297] La AMD es una enfermedad degenerativa y una causa principal de ceguera en el mundo desarrollado. Provoca daño a la mácula, un pequeño punto cerca del centro de la retina y la parte del ojo necesaria para una visión central nítida. Los cambios degenerativos en el ojo y la pérdida de la visión pueden ser causados por una  
5 función deteriorada de los lisosomas y acumulaciones de proteínas dañinas detrás de la retina (Viiri et ál., *PLoS One*. 8(7):e69563, 2013). A medida que evoluciona la enfermedad, se dañan las células sensoriales de la retina en el área de la visión central, lo que lleva a la pérdida de la visión central. En algunas modalidades, las variantes de progranulina y las proteínas de fusión descritas en la presente se pueden  
10 utilizar para tratar la AMD.

## XVI. MÉTODOS TERAPÉUTICOS

[0298] Una variante de progranulina o proteína de fusión descrita en la presente puede usarse de forma terapéutica para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, FTD, NCL, NPA, NPB, NPC, FTD/ELA asociada con  
15 C9ORF72, ALS esporádica, AD, enfermedad de Gaucher (por ejemplo, enfermedad de Gaucher de tipo 2 y 3) y enfermedad de Parkinson), aterosclerosis, un trastorno asociado con TDP-43, AMD o un trastorno asociado con la progranulina.

[0299] Una variante de progranulina o proteína de fusión descrita en la presente puede administrarse a un sujeto en una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz. Las  
20 dosificaciones pueden variar según diversos factores, que incluyen la frecuencia de la dosis, la vía de administración elegida, la formulación de la composición, la respuesta del paciente, la gravedad de la afección, el peso del sujeto y el criterio del médico tratante. La dosificación puede aumentar o disminuir con el tiempo, como sea necesario para un paciente individual. En algunas modalidades, se le administra a un  
25 paciente inicialmente una dosis baja, que luego se aumenta a una dosificación eficaz tolerable para el paciente.

[0300] En diversas modalidades, una variante de progranulina o proteína de fusión

descrita en la presente se administra mediante cualquier vía. En algunas modalidades, la proteína se administra mediante administración parenteral. En algunas modalidades, la proteína se administra por vía intravenosa. En algunas modalidades, la proteína se administra mediante administración intraperitoneal.

## 5 XVII. EJEMPLOS

[0301] La presente descripción se tratará en mayor detalle a través de ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos solamente y no pretenden limitar la descripción de manera alguna. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente diversos parámetros no fundamentales que se pueden  
10 cambiar o modificar para obtener esencialmente los mismos resultados. Se ha intentado garantizar la exactitud de las cifras utilizadas (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero pueden encontrarse presentes algunos errores y desvíos experimentales. La práctica de la presente descripción empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química de proteínas, bioquímica,  
15 técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de técnica. Dichas técnicas se explican en su totalidad en la bibliografía. Además, será evidente para el experto en la técnica que los métodos de modificación genética aplicados a determinadas bibliotecas también pueden aplicarse a otras bibliotecas descritas en la presente.

Ejemplo 1. Expresión y purificación de la proteína de fusión de dímero de Fc:PGRN  
20 recombinante.

[0302] Para expresar las proteínas de fusión recombinantes de dímero Fc:PGRN, las construcciones se expresaron mediante transfección transitoria de células K1 de ovario de hámster chino (CHO) con inactivación de glutamina sintetasa (GS) (Horizon  
Discovery) mediante el uso de PEIMax (MW 40 000, Linear, Polysciences) en una  
25 relación 1:4 de ADN ( $\mu$ g) con respecto a PEI ( $\mu$ L). Inicialmente se cultivaron y se transfectaron células en BalanCD Transfectory CHO (Irvine Scientific) a 37 °C. Después de la transfección, la temperatura del cultivo celular se cambió a 32 °C, y la

duración del cultivo se mantuvo en un 5 % de CO<sub>2</sub> y 80 % de humedad en un agitador orbital (Infors Multitron). El día 1 del cultivo se añadió un alimento nutritivo, BalanCD CHO Feed 4 (Irvine Scientific), al 20 % del volumen inicial de cultivo. Después de 7 días, la proteína se recogió por centrifugación, seguida por filtración mediante el uso de un filtro PES de 0,22 µm.

[0303] Para proteínas de fusión expresadas en células HEK, en Expi293 (Thermo-Fisher), se transfectaron células con una densidad de  $2 \times 10^6$  células/mL con Expifectamine™ 293/complejo de ADN y plásmido de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermo-Fisher). Después de la transfección, se incubaron las células a 37 °C con una atmósfera humidificada de 6-8 % de CO<sub>2</sub> en un agitador orbital (Infors HT Multitron). Al día uno después de la transfección, se agregaron al cultivo los potenciadores de transfección 1 y 2 de Expifectamine™. Se cosechó el sobrenadante del medio mediante centrifugado después de 96 horas después de la transfección. El sobrenadante aclarado se complementó con inhibidor de proteasa sin EDTA (Roche) y se almacenó a -80 °C.

[0304] Para la purificación de la proteína de fusión recombinante, el sobrenadante de medio aclarado se cargó en una columna de afinidad de proteína A HiTrap MabSelect Prisma (GE Healthcare Life Sciences) y se lavó con amortiguador PBS Triton X-100 al 0,5 % (v/v) pH 7,4 con NaCl 0,5 M). La proteína de fusión se eluyó en amortiguador de citrato 50 mM, con NaCl 100 mM, pH 3,5-3,6. El eluato de la columna de afinidad se cargó (1) en una columna de desalado HiTrap® (GE Healthcare Life Sciences) para el intercambio de amortiguadores en tándem en un amortiguador final de 1x PBS o (2) se neutralizó mediante la adición de amortiguador de arginina-succinato (arginina 1 M, ácido succínico 685 mM, pH 5,0) para ajustar el pH del eluato. Para determinadas proteínas de fusión, el eluato de la columna de afinidad se trató posteriormente mediante carga en una columna de intercambio catiónico (SP HP, HiTrap™) y lavado de la columna con NaCl 200 mM, pH 5,0. La proteína de fusión se eluyó de la columna al aplicar un gradiente de solución de NaCl (200 mM a 500 mM) sobre 20 volúmenes de columna. Las fracciones que contenían >95 % de proteína se agruparon. Se añadió

- sulfato de amonio a las fracciones agrupadas a una concentración final de alrededor de 1 M, después de lo cual la solución se cargó en una columna de interacción hidrófoba (Butyl HP, HiTrap™). La columna se lavó con sulfato de amonio 1 M en amortiguador citrato 0,1 M, pH 6,0, y la proteína se eluyó al aplicar un gradiente de sulfato de amonio (1 M a 0) sobre 20 volúmenes de columna. Se combinaron fracciones agrupadas que contenían >95 % de proteína y se dializaron en amortiguador de fosfato sodio 10 mM que contenía sacarosa al 6 %. Se obtuvo proteína purificada en fosfato de sodio 10 mM, sacarosa al 6 %, pH 6,5. Las Tablas 2 y 3 muestran las secuencias de proteínas de fusión ilustrativas.
- 10 [0305] Las FIG. 1A y 1B incluyen datos representativos que indican que las proteínas de fusión se purificaron hasta una pureza superior a 98 %.

Tabla 2. Secuencias de proteínas de fusión de dímero de Fc:PGRN

| <b>Dímero de Fc:PGRN</b> | <b>Primer polipéptido Fc</b> | <b>Segundo polipéptido Fc-PGRN</b> |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| Fusión 1                 | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 98                      |
| Fusión 2                 | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 99                      |
| Fusión 3                 | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 100                     |
| Fusión 4                 | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 101                     |
| Fusión 5                 | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 102                     |
| Fusión 6                 | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID NO: 98                      |
| Fusión 7                 | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID NO: 99                      |

| <b>Dímero de Fc:PGRN</b> | <b>Primer polipéptido Fc</b> | <b>Segundo polipéptido Fc-PGRN</b> |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| Fusión 8                 | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID NO: 100                     |
| Fusión 9                 | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID NO: 101                     |
| Fusión 10                | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID NO: 102                     |
| Fusión 11                | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID NO: 108                     |
| Fusión 32                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 123                     |
| Fusión 34                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 124                     |
| Fusión 36                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 125                     |
| Fusión 37                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 126                     |

Tabla 3 Secuencias adicionales de proteínas de proteínas de fusión de dímero de Fc:PGRN

| <b>Dímero de Fc:PGRN</b> | <b>Primer polipéptido Fc</b> | <b>Segundo polipéptido Fc-PGRN</b> |                  |                         |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------|-------------------------|
|                          |                              | <b>Bisagra parcial + Fc</b>        | <b>Enlazador</b> | <b>Variante de PGRN</b> |
| Fusión 12                | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 111          |
| Fusión 13                | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO:       | SEQ ID NO:              |

| <b>Dímero de Fc:PGRN</b> | <b>Primer polipéptido Fc</b> | <b>Segundo polipéptido Fc-PGRN</b> |                  |                         |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------|-------------------------|
|                          |                              | <b>Bisagra parcial + Fc</b>        | <b>Enlazador</b> | <b>Variante de PGRN</b> |
|                          |                              |                                    | 91               | 112                     |
| Fusión 14                | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 113          |
| Fusión 15                | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 114          |
| Fusión 16                | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 115          |
| Fusión 17                | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 116          |
| Fusión 18                | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 117          |
| Fusión 19                | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 118          |
| Fusión 20                | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 119          |
| Fusión 21                | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 120          |

| <b>Dímero de Fc:PGRN</b> | <b>Primer polipéptido Fc</b> | <b>Segundo polipéptido Fc-PGRN</b> |                  |                         |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------|-------------------------|
|                          |                              | <b>Bisagra parcial + Fc</b>        | <b>Enlazador</b> | <b>Variante de PGRN</b> |
| Fusión 22                | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 121          |
| Fusión 23                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 4            |
| Fusión 24                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 5            |
| Fusión 25                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 6            |
| Fusión 26                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 7            |
| Fusión 27                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 8            |
| Fusión 28                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 9            |
| Fusión 29                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 10           |
| Fusión 30                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO:       | SEQ ID NO:              |



| <b>Dímero de Fc:PGRN</b> | <b>Primer polipéptido Fc</b> | <b>Segundo polipéptido Fc-PGRN</b> |                  |                         |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------|-------------------------|
|                          |                              | <b>Bisagra parcial + Fc</b>        | <b>Enlazador</b> | <b>Variante de PGRN</b> |
|                          |                              |                                    | 91               | 11                      |
| Fusión 31                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 12           |
| Fusión 32                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 13           |
| Fusión 33                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 14           |
| Fusión 34                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 15           |
| Fusión 35                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 16           |
| Fusión 36                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 19           |
| Fusión 37                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 20           |
| Fusión 38                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 21           |

| <b>Dímero de Fc:PGRN</b> | <b>Primer polipéptido Fc</b> | <b>Segundo polipéptido Fc-PGRN</b> |                  |                         |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------|-------------------------|
|                          |                              | <b>Bisagra parcial + Fc</b>        | <b>Enlazador</b> | <b>Variante de PGRN</b> |
| Fusión 39                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 22           |
| Fusión 40                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 23           |
| Fusión 41                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 24           |
| Fusión 42                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 25           |
| Fusión 43                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 26           |
| Fusión 44                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 30           |
| Fusión 45                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 31           |
| Fusión 46                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 32           |
| Fusión 47                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO:       | SEQ ID NO:              |

| <b>Dímero de Fc:PGRN</b> | <b>Primer polipéptido Fc</b> | <b>Segundo polipéptido Fc-PGRN</b> |                  |                         |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------|-------------------------|
|                          |                              | <b>Bisagra parcial + Fc</b>        | <b>Enlazador</b> | <b>Variante de PGRN</b> |
|                          |                              |                                    | 91               | 33                      |
| Fusión 48                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 34           |
| Fusión 49                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 35           |
| Fusión 50                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 36           |
| Fusión 51                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 37           |
| Fusión 52                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 38           |
| Fusión 53                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 39           |
| Fusión 54                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 40           |
| Fusión 55                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 41           |

| <b>Dímero de Fc:PGRN</b> | <b>Primer polipéptido Fc</b> | <b>Segundo polipéptido Fc-PGRN</b> |                  |                         |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------|-------------------------|
|                          |                              | <b>Bisagra parcial + Fc</b>        | <b>Enlazador</b> | <b>Variante de PGRN</b> |
| Fusión 56                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 42           |
| Fusión 57                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 43           |
| Fusión 58                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 44           |
| Fusión 59                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 45           |
| Fusión 60                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 46           |
| Fusión 61                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 47           |
| Fusión 62                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 48           |
| Fusión 63                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 49           |
| Fusión 64                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO:       | SEQ ID NO:              |

| <b>Dímero de Fc:PGRN</b> | <b>Primer polipéptido Fc</b> | <b>Segundo polipéptido Fc-PGRN</b> |                  |                         |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------|-------------------------|
|                          |                              | <b>Bisagra parcial + Fc</b>        | <b>Enlazador</b> | <b>Variante de PGRN</b> |
|                          |                              |                                    | 91               | 50                      |
| Fusión 65                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 51           |
| Fusión 66                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 52           |
| Fusión 67                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 53           |
| Fusión 68                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 54           |
| Fusión 69                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 56           |
| Fusión 70                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 57           |
| Fusión 71                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 127          |
| Fusión 72                | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 110                     | SEQ ID NO: 91    | SEQ ID NO: 128          |

Ejemplo 2. Análisis de espectrometría de masa descendente de escisión en el extremo C de proteínas de fusión de dímero de Fc:PGRN

[0306] Las proteínas de fusión de dímero de Fc:PGRN intactas expresadas y purificadas a partir de células CHO se midieron mediante mapeo de péptidos o por espectrometría de masas descendente mediante el uso de un Thermo Ultimate 3000 UHPLC acoplado al espectrómetro de masas Exactive plus EMR. Para comparación, también se evaluó una proteína de fusión que contenía una secuencia de PGRN de tipo salvaje (Fusión 11) expresada en células HEK293 o células CHO.

*Análisis de espectrometría de masas descendente*

[0307] Para el análisis se inyectaron aproximadamente 10 µg de muestra en amortiguador PBS o amortiguador de formulación (amortiguador fosfato 10 mM, pH 6,5, sacarosa al 6 %). La cromatografía líquida (LC) se realizó con una columna Thermo MabPAC RP (4 µm, 2,1 x 50 mM, N/P 88648) a una temperatura de columna de 55 °C y mediante el uso de una fase móvil (A) de 0,1 ácido trifluoroacético (TFA) en H<sub>2</sub>O y una fase móvil (B) de acetonitrilo a una velocidad de flujo de 0,3 mL/minuto. El gradiente comenzó en el 20 % (B) y aumentó hasta el 70 % (B) antes de regresar al 20 % (B). La detección se llevó a cabo mediante el uso de UV/Vis a 214 nm y 280 nm. El espectrómetro de masas EMR se utilizó con dos barridos de análisis de fragmentación total de iones (AIF).

[0308] Primer ajuste de AIF: intervalo de barrido 350-5000 m/z. CE: 25. CID en fuente 90 ev. Ajuste de resolución: 17 500 y 3e6 objetivo AGC, IT máximo: 200 ms. Microbarridos: 1.

[0309] Segundo ajuste de AIF: intervalo de barrido 350-5000 m/z. CE: 200. CID en fuente 90 ev. Ajuste de resolución: 35 000 y 1e6 objetivo AGC, IT máximo: 200 ms. Microbarridos: 5.

[0310] Condiciones de la fuente de ionización por electrospray (ESI): Velocidad de flujo de gas envolvente: 25, tasa de gas auxiliar: 4. Tensión de pulverización de 3 kV, temperatura capilar de 325 °C, nivel de RF de lente S 125. Temperatura del calentador de gas auxiliar 300 °C. Modo EMR activado. Ajuste de presión del gas de captura 2,0.

- 5 [0311] La reacción de fase gaseosa descendente indujo la escisión en el extremo C de la PGRN entre los aminoácidos del ácido aspártico (D) y prolina (P) (que corresponden a la posición 569 y la posición 570 de la SEQ ID NO:2), lo que generó péptidos intactos de 7 aminoácidos de longitud con secuencias correspondientes a las distintas secuencias del extremo C de las diferentes variantes de progranulina. Los
- 10 péptidos escindidos representaron pérdida secuencial del extremo C. Los picos XIC del péptido se extrajeron mediante el uso de 20 ppm (partes por millón), y el área bajo curva (AUC) se utilizó para calcular el porcentaje de proteína intacta en comparación con a la proteína total.

#### *Análisis de mapeo de péptidos*

- 15 [0312] Para preparar las muestras, se incubaron aproximadamente 40 µg de muestra en bicarbonato 50 mM (pH 7,8) con AspN (New England Biolabs, n.º de cat. P8014S) a una relación enzima:proteína de 1:40 (p/p) durante 30 minutos a 37 °C. Se añadió ácido fórmico (1 %) para inactivar la reacción y la muestra se transfirió a viales de LCMS para su análisis. Los análisis de mapeo de péptidos se realizaron mediante
- 20 cromatografía líquida en UHPLC Vanquish (Thermo Scientific, CA, EUA) acoplada a UV/Vis y espectrómetro de masas de ionización por electrospray Q Exactive Orbitrap (Thermo Scientific, CA, EUA). Para cada análisis, se inyectaron 25 µL de muestra en una columna CSH C18 1,7 µm, 2,1×150 mm (Waters) mediante el uso de una velocidad de flujo de 0,20 mL/min a 40°C en un modo de ionización positiva. La fase
- 25 móvil A consistía en agua con ácido fórmico al 0,1 %, mientras que la fase móvil B consistía en acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %. El gradiente se inició en 1 % (B) y aumentó en tres etapas de 1 % a 10 % (B), de 10 % a 40 % (B) y de 40 % a 70 % (B) durante un período de 50 minutos antes de volver a 1 % (B). La traza UV/Vis se registró

a longitudes de onda de 280 y 214 nm, y los datos se recogieron mediante la adquisición de MS-ddMS2 completa en modo positivo. Las áreas pico se utilizaron para calcular los porcentajes de péptidos intactos y escindidos.

[0313] La Tabla 4 muestra que más de 95 % de Fusión 1 tiene un extremo C intacto y más de 80 % de Fusión 2 tiene un extremo C intacto. La presencia de proteína de fusión recortada (por ejemplo, proteína de fusión faltante entre 1 y 3 aminoácidos en el extremo C) fue inferior al 5 % (Fusión 1) e inferior a 20 % (Fusión 2). En la Tabla 4, “-L,” “-IL,” “-PIL,” “-FL,” y “-PFL” se refiere a los aminoácidos terminales que se escinden de las proteínas de fusión. Los datos para proteínas de fusión adicionales se pueden encontrar en las Tablas 8A y 8B. Como punto de referencia, alrededor de 95 % de la proteína de fusión que contenía PGRN de tipo salvaje (Fusión 11) se mantuvo intacta cuando se expresó en células HEK, mientras que el 7 % de Fusión 11 se mantuvo intacta cuando se expresó en células CHO.

Tabla 4

|         | <b>Fusión 1 (PIL)</b> |                         |         | <b>Fusión 2 (PFL)</b> |                         |
|---------|-----------------------|-------------------------|---------|-----------------------|-------------------------|
|         | Conteos de<br>área    | % a de<br>área relativa |         | Conteos de<br>área    | % a de área<br>relativa |
| Intacto | 50114249              | 95,6                    | Intacto | 41831754              | 80,3                    |
| -L      | 2206596               | 4,2                     | -L      | 9100294               | 17,5                    |
| -IL     | 12728                 | 0,0                     | -FL     | 529791                | 1,0                     |
| -PIL    | 76847                 | 0,1                     | -PFL    | 608392                | 1,2                     |



### Ejemplo 3. Estabilidad térmica y estabilidad de congelado y descongelado

[0314] La estabilidad térmica de las proteínas de fusión se midió mediante un instrumento Prometheus (NanoTemper). La fluorescencia intrínseca se utiliza para controlar la proteína durante el aumento progresivo de la temperatura con el fin de generar un perfil de fusión ( $T_m$ ,  $T_{inicio}$ ). Los resultados de Fusión 1 y Fusión 2 se ilustran en la FIG. 2.

[0315] Las proteínas de fusión también fueron sometidas a análisis de congelado y descongelado. Brevemente, una muestra de proteína se incubó en hielo seco durante alrededor de 10 minutos, después de lo cual la muestra se transfirió a temperatura ambiente y se incubó durante 30 minutos. El ciclo de congelado y descongelado se repitió cinco veces, tras lo cual las muestras se llevaron a 4 °C y se analizaron mediante SEC-HPLC (columna Waters BEH SEC, 200 Å 1,7 µm, 30 cm, con una fase móvil de 2x PBS con etanol al 10 % (v/v), 0,2 mL/min de velocidad de flujo). Los resultados de Fusión 1 y Fusión 2 se ilustran en la FIG. 3.

[0316] Los resultados obtenidos para Fusión 1 y Fusión 2 (FIG. 2 y 3) indican que las dos proteínas de fusión tenían una buena estabilidad térmica y una buena estabilidad de congelado y descongelado.

### Ejemplo 4. Unión recombinante de la proteína de fusión de dímero de Fc:PGRN a sortilina

[0317] Todos los experimentos de resonancia de plasmones superficiales (SPR) se llevaron a cabo en un instrumento GE Healthcare Biacore 8K con un chip sensor CM5 de serie S y amortiguador de ejecución HBS-EP+ a 25 °C. Para medir la afinidad de unión de las proteínas de fusión de dímero de Fc:PGRN con sortilina, las proteínas de fusión se capturaron con un chip sensor que se inmovilizó con un kit de captura de anticuerpos humanos de GE Healthcare (para la sortilina humana) o una proteína A de chip sensor Biacore™ (para la sortilina de cynomolgus y de ratón, Cytiva, n.º

29127555). Se usaron parámetros cinéticos de múltiples ciclos con una serie de concentración de 3 veces de analito de sortilina dentro del intervalo de 0,4 nM – 100 nM, permitiendo un tiempo de contacto de 300 segundos, un tiempo de disociación de 600 segundos y una velocidad de flujo 30 µL/min. Se usó un modelo de parámetros cinéticos 1:1 para evaluar la cinética de unión de la unión a sortilina. Los datos de unión de Biacore de las proteínas de fusión de dímero de Fc:PGRN a la sortilina se muestran en las Tablas 5-7 a continuación. El analito de la sortilina se obtuvo de la siguiente manera: sortilina humana (R&D Systems); sortilina de ratón (R&D Systems); sortilina de cynomolgus (interna, basad en UniProt A0A2K5VHG2).

- 10 [0318] Tal como se ilustra en la Tabla 5, Fusión 1 mostró una mayor afinidad por la sortilina humana en relación con Fusión 2. Con respecto a una proteína de fusión que contiene PGRN de tipo salvaje (Fusión 11) expresada en células HEK, Fusión 1 mostró una menor pérdida de afinidad de unión para la sortilina humana (aproximadamente 3 veces) que Fusión 2 (aproximadamente 14 veces). La pérdida de la afinidad de unión a la sortilina humana parece ser el resultado de una cinética de disociación más rápida tanto para Fusión 1 como para Fusión 2 en relación con la proteína de fusión de PGRN de tipo salvaje. Con respecto a la proteína de fusión de PGRN de tipo salvaje (Fusión 11) expresada en células HEK, Fusión 1 mostró aproximadamente la misma afinidad de unión a la sortilina de ratón y una afinidad de unión alrededor de 2 a 3 veces más débil para la sortilina de cynomolgus.

Tabla 5. Unión a sortilina humana

| <b>Proteína de fusión</b> | <b>k<sub>a</sub> (1/Ms)</b> | <b>k<sub>d</sub> (1/s)</b> | <b>K<sub>D</sub> (M)</b> | <b>Diferencia de proporción de Fusión 11 (HEK)</b> |
|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------|
| Fusión 11 (HEK)           | 1,08E+05                    | 1,66E-03                   | 1,53E-08                 | 1,0                                                |
| Fusión 1 (CHO)            | 9,59E+04                    | 4,66E-03                   | 4,85E-08                 | 3,2                                                |
| Fusión 2 (CHO)            | 8,50E+04                    | 1,82E-02                   | 2,14E-07                 | 14,0                                               |

Tabla 6. Unión a sortilina de ratón

| <b>Proteína de fusión</b> | <b>k<sub>a</sub> (1/Ms)</b> | <b>k<sub>d</sub> (1/s)</b> | <b>K<sub>D</sub> (M)</b> |
|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Fusión 11 (HEK)           | 3,87 x 10 <sup>4</sup>      | 2,94 x 10 <sup>-3</sup>    | 7,61 x 10 <sup>-8</sup>  |
| Fusión 1 (CHO)            | 2,03 x 10 <sup>5</sup>      | 1,38 x 10 <sup>-2</sup>    | 6,38 x 10 <sup>-8</sup>  |

Tabla 7. Unión a sortilina de mono cynomolgus

| <b>Proteína de fusión</b> | <b>k<sub>a</sub> (1/Ms)</b> | <b>k<sub>d</sub> (1/s)</b> | <b>K<sub>D</sub> (M)</b> |
|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Fusión 11 (HEK)           | 5,38 x 10 <sup>4</sup>      | 1,43 x 10 <sup>-3</sup>    | 2,65 x 10 <sup>-8</sup>  |
| Fusión 1 (CHO)            | 4,49 x 10 <sup>4</sup>      | 2,96 x 10 <sup>-3</sup>    | 6,58 x 10 <sup>-8</sup>  |

- [0319] La unión a sortilina de proteínas de fusión adicionales se analizó mediante SPR (descrito *supra*) o mediante un ensayo ELISA colorimétrico estándar que midió la unión de proteínas de fusión de dímero de Fc:PGRN a la sortilina inmovilizada. Para

la medición mediante ELISA, la sortilina recombinante marcada con His (R&D Systems, n.º de cat. 3154-ST-050) se inmovilizó en una placa de 96 pocillos recubierta de níquel. Las proteínas de fusión que contenían una mezcla de proteínas intactas y escindidas en el extremo C (“ % intactas” en las Tablas 8A y 8B) se diluyeron en

5 BSA/TBST al 3 % y se añadieron a los pocillos recubiertos en diluciones en serie. Después de la incubación con las proteínas de fusión a temperatura ambiente durante dos horas, los pocillos se lavaron con TBST. Las proteínas de fusión enlazadas se detectaron por incubación a temperatura ambiente durante una hora con un anticuerpo anti-IgG humana (anticuerpo HRP de cabra anti-IgG humana, Jackson

10 ImmunoResearch, n.º de cat. 109-035-088) diluido en BSA/TBST al 3 %. Después de la incubación con el anticuerpo de detección, los pocillos se lavaron con TBST y se incubaron con la solución de TMB (SurModics, n.º de cat. TMBW-1000-01) durante cinco minutos. La reacción de desarrollo se detuvo con una solución de detención de 450 nM (SurModics, n.º de cat. LSTP-1000-01), y la absorbancia se midió a 450 nm

15 mediante el uso de un lector de placas BioTek Synergy (Modelo Neo2). Los resultados de las proteínas de fusión ejemplares se presentan en las Tablas 8A y 8B. Todas las proteínas de fusión enumeradas en las Tablas 8A y 8B se expresaron a partir de células CHO, excepto cuando se indica.

Tabla 8A

| <b>Proteína de fusión</b> | <b>QLL reemplazado por</b> | <b>% intactas (MS descendente)</b> | <b>% intactas (mapeo de péptidos)</b> | <b>EC50 de sortilina (nM) (ELISA)</b> | <b>Diferencia de proporción en EC50</b> |
|---------------------------|----------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|
| Fusión 11 (HEK)           | ---                        | 95 %                               | ---                                   | 2,8                                   | 1,0                                     |
| Fusión 11 (CHO)           | ---                        | 7 %                                | ---                                   | 60±12,7                               | 21,0                                    |

| <b>Proteína de fusión</b> | <b>QLL reemplazado por</b> | <b>% intactas (MS descendente)</b> | <b>% intactas (mapeo de péptidos)</b> | <b>EC50 de sortilina (nM) (ELISA)</b> | <b>Diferencia de proporción en EC50</b> |
|---------------------------|----------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|
| Fusión 6                  | PIL                        | 98 %                               | ---                                   | 13,5                                  | 4,8                                     |
| Fusión 7                  | PFL                        | 87 %                               | ---                                   | 14,3                                  | 5,1                                     |
| Fusión 8                  | QQL                        | 59 %                               | ---                                   | 19,1                                  | 6,8                                     |
| Fusión 9                  | VVL                        | 39 %                               | ---                                   | 18,6                                  | 6,6                                     |
| Fusión 10                 | VTL                        | 29 %                               | ---                                   | 23,9                                  | 8,5                                     |
| Fusión 12                 | NIL                        | 3 %                                | ---                                   | 34,4                                  | 12,3                                    |
| Fusión 13                 | LLL                        | < 1 %                              | ---                                   | 56,5                                  | 20,2                                    |
| Fusión 14                 | PLL                        | < 1 %                              | ---                                   | 55                                    | 19,6                                    |
| Fusión 15                 | PRL                        | < 1 %                              | ---                                   | 120                                   | 42,9                                    |
| Fusión 16                 | YIL                        | ---                                | 0,6 %                                 | > 100                                 | > 50                                    |
| Fusión 17                 | VLL                        | ---                                | 2,5 %                                 | > 100                                 | > 50                                    |
| Fusión 18                 | VIV                        | ---                                | 35 %                                  | > 100                                 | > 50                                    |
| Fusión 19                 | FIL                        | ---                                | 4,4 %                                 | > 100                                 | > 50                                    |

| <b>Proteína de fusión</b> | <b>QLL reemplazado por</b> | <b>% intactas (MS descendente)</b> | <b>% intactas (mapeo de péptidos)</b> | <b>EC50 de sortilina (nM) (ELISA)</b> | <b>Diferencia de proporción en EC50</b> |
|---------------------------|----------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|
| Fusión 20                 | MLL                        | ---                                | 0,7 %                                 | > 100                                 | > 50                                    |
| Fusión 21                 | QLLG (SEQ ID NO:142)       | 0 %                                | ---                                   | > 100                                 | > 50                                    |
| Fusión 22                 | QLLGK (SEQ ID NO:143)      | 0 %                                | ---                                   | > 100                                 | > 50                                    |

Tabla 8B

| <b>Proteína de fusión</b> | <b>QLL reemplazado por</b> | <b>% intactas (mapeo de péptidos)</b> | <b>K<sub>D</sub> de sortilina (M) (SPR)</b> | <b>Diferencia de proporción en K<sub>D</sub></b> |
|---------------------------|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Fusión 11 (HEK)           | ---                        | 85,8 %                                | 9,70E-09                                    | 1,0                                              |
| Fusión 1                  | PIL                        | 91,0 %                                | 3,27E-08                                    | 3,4                                              |
| Fusión 23                 | PHL                        | ---                                   | 5,18E-08                                    | 5,3                                              |
| Fusión 24                 | PKL                        | 38,0 %                                | 1,10E-08                                    | 1,1                                              |

| <b>Proteína de fusión</b> | <b>QLL reemplazado por</b> | <b>% intactas (mapeo de péptidos)</b> | <b>K<sub>D</sub> de sortilina (M) (SPR)</b> | <b>Diferencia de proporción en K<sub>D</sub></b> |
|---------------------------|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Fusión 25                 | PDL                        | ---                                   | 4,88E-08                                    | 5,0                                              |
| Fusión 26                 | PEL                        | 51,4 %                                | 2,98E-08                                    | 3,1                                              |
| Fusión 27                 | PSL                        | ---                                   | 7,96E-08                                    | 8,2                                              |
| Fusión 28                 | PTL                        | ---                                   | 5,51E-08                                    | 5,7                                              |
| Fusión 29                 | PNL                        | ---                                   | 1,04E-07                                    | 10,7                                             |
| Fusión 31                 | PGL                        | ---                                   | 4,67E-08                                    | 4,8                                              |
| Fusión 32                 | PPL                        | 89,70 %                               | 9,30E-09                                    | 1,0                                              |
| Fusión 34                 | PYL                        | 77,8 %                                | 2,62E-08                                    | 2,7                                              |
| Fusión 35                 | PVL                        | ---                                   | 4,57E-08                                    | 4,7                                              |
| Fusión 36                 | QRL                        | 64,7 %                                | 1,24E-08                                    | 1,3                                              |
| Fusión 37                 | QHL                        | 62,6 %                                | 1,17E-08                                    | 1,2                                              |
| Fusión 38                 | QKL                        | 62,7 %                                | 1,57E-08                                    | 1,6                                              |

| <b>Proteína de fusión</b> | <b>QLL reemplazado por</b> | <b>% intactas (mapeo de péptidos)</b> | <b>K<sub>D</sub> de sortilina (M)<br/>(SPR)</b> | <b>Diferencia de proporción en K<sub>D</sub></b> |
|---------------------------|----------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Fusión 39                 | QDL                        | ---                                   | 4,04E-08                                        | 4,2                                              |
| Fusión 41                 | QNL                        | 36,5 %                                | 2,68E-08                                        | 2,8                                              |
| Fusión 42                 | QPL                        | ---                                   | 6,25E-08                                        | 6,4                                              |
| Fusión 52                 | EFL                        | 0,00 %                                | 6,84E-09                                        | 0,7                                              |
| Fusión 54                 | TFL                        | 0,0 %                                 | 1,66E-08                                        | 1,7                                              |
| Fusión 60                 | RQL                        | 0,10 %                                | 7,75E-09                                        | 0,8                                              |
| Fusión 62                 | KQL                        | 2,4 %                                 | 1,91E-08                                        | 2,0                                              |
| Fusión 68                 | YQL                        | 0,60 %                                | 8,81E-09                                        | 0,9                                              |
| Fusión 70                 | QLLLRQLL<br>(SEQ ID NO:60) | 5,0 %                                 | 1,19E-08                                        | 1,2                                              |

[0320] Las Fusiones 30, 33, 40, 43-51, 53, 55-59, 61, 62-67, 69, 71, y 72 mostraron una unión a sortilina baja o nula, medida por SPR.



[0321] Fusión 1 y Fusión 2 también se analizaron mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) para verificar la unión al TfR humano. Los experimentos de resonancia de plasmones superficiales (SPR) se realizaron en un instrumento Biacore 8K de GE Healthcare con chip sensor serie S CM5 y amortiguador de ejecución HBS-EP+ a 25 °C. Para medir la afinidad de unión de las proteínas de fusión para hTfR, el chip sensor se inmovilizó con estreptavidina y se capturó AviTag-hTfR biotinilado. Se usaron parámetros cinéticos de ciclo único con una serie de concentración de 3 veces de analito de proteína de fusión dentro del intervalo de 25 nM – 2 µM, permitiendo un tiempo de contacto de 80 segundos, un tiempo de disociación de 180 segundos y una velocidad de flujo 30 µL/min. Se usó un modelo de afinidad de estado estable para demostrar que las proteínas de fusión pueden unirse a hTfR con una afinidad de alrededor de 50 nM a 150 nM.

#### Ejemplo 5. Ensayo funcional *in vitro*

[0322] Se derivaron BMDM *in vitro* de médula ósea de ratones *GRN* KO/hTfR.KI (descritos a continuación) mediante el uso de un método similar al de Trouplin et ál. *J. Vis. Exp.* 2013 (81) 50966, pero se agregó M-LCR recombinante directamente al medio de cultivo celular para inducir la diferenciación. Los BMDM se trataron durante 48 horas con titulación semilogarítmica de Fusión 11, Fusión 1 y Fusión 2. Se extrajeron lípidos celulares a través de la adición de metanol con una mezcla de estándar interno y se midió la abundancia de BMP mediante cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS/MS) en un Q-trap 6500 (SCIEX). Los *GRN* KO/hTfR.KI BMDM tuvieron un aumento de aproximadamente 2,5 veces en BMP 36:2 en relación con los *GRN* WT/hTfR.KI BMDM. Tanto Fusión 1 como Fusión 2 rescataron la acumulación de BMP de forma dependiente de la dosis con una eficacia comparable (FIG. 5). En relación con una proteína de fusión que contiene PGRN de tipo salvaje (Fusión 11), Fusión 1 ilustra una potencia *in vitro* muy similar.

### Cromatografía líquida-espectrometría de masas

[0323] Se llevaron análisis de BMP mediante cromatografía líquida (sistema Shimadzu Nexera X<sub>2</sub>, Shimadzu Scientific Instrument, Columbia, MD, EUA) acoplada a espectrometría de masas por electrospray (Sciex 6500+ QTRAP, Sciex, Framingham, MA, EUA). Para cada análisis, se inyectaron 5 µL de muestra en una columna de 1,7 µm de amida BEH, 2,1×150 mm (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA) con una velocidad de flujo de 0,40 mL/min a 55 °C. La fase móvil A consistió en agua con formiato de amonio 10 mM + ácido fórmico al 0,1 %. La fase móvil B consistió en acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %. El gradiente se programó de la siguiente manera: 0,0–1,0 min. a 95 % de B; 1,0–7,0 min. a 50 % de B; 7,0–7,1 min. a 95 % de B; y 7,1–12,0 min. a 95 % de B. Se llevó a cabo una ionización por electrospray en el modo de ion negativo con la siguiente configuración: gas cortina a 25; gas de colisión a medio; voltaje de aspersion de iones a -4500; temperatura a 600; gas de fuente de iones 1 a 50; gas de fuente de iones 2 a 60; energía de colisión a -50, CXP a -15; DP a -60; EP a -10; tiempo de permanencia a 20 ms. La adquisición de datos se llevó a cabo mediante el uso de Analyst 1.6.3 (Sciex) en el modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) con parámetros de adquisición similares a los descritos anteriormente (Ulman et ál. 2020. Sci Transl Med 12(545):eaay1163). Las especies de BMP se detectaron mediante el uso de los parámetros de transición de MRM. Las especies de BMP se cuantificaron mediante el uso de BMP(14:0\_14:0) como estándar interno. Las especies de BMP se identificaron en función de sus tiempos de retención y propiedades de MRM. La cuantificación se llevó a cabo mediante el uso de MultiQuant 3.02 (Sciex) después de la corrección de superposición isotópica. Las especies de BMP se normalizaron ya sea a una cantidad total de proteína, peso del tejido o volumen de biofluidos. La concentración de proteínas se midió con el ensayo de ácido bicinconínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL, EUA).

[0324] Se usaron transiciones  $m/z$  de ion precursor (Q1)  $[M-H]^-$  y producto (Q3) para medir las especies de BMP. Se utilizan abreviaturas en la presente para hacer referencia a especies con dos cadenas laterales, donde las estructuras de las cadenas

laterales de ácido graso se indican dentro de paréntesis en el formato de BMP (por ejemplo, BMP(18:1\_18:1)). Los números siguen el formato estándar de notación de ácidos grasos de la cantidad de átomos de carbono de ácido graso:cantidad de enlaces dobles. De manera alternativa, puede hacerse referencia a la especie de BMP de forma genérica de acuerdo con la cantidad total de átomos de carbono:cantidad total de enlaces dobles; las especies que tienen valores similares pueden distinguirse según sus valores Q1 y Q3.

Ejemplo 6. Las proteínas de fusión cruzan la BBB y corrigen los criterios de valoración farmacodinámicos relevantes en ratones *GRN* KO/hTfR.KI

[0325] Fusión 1 (Tabla 2) se inyectó a través de la vena de la cola en ratones con *GRN* KO (Jackson Laboratory, n.º 013175) cruzados con ratones con hTfR KI (ratones *GRN* KO/hTfR.KI) para evaluar su capacidad de atravesar la BBB. Los ratones hTfR KI se describen en la publicación de patente internacional n.º WO2018152285. Para generar los ratones con *GRN* KO/hTfR.KI, en la primera ronda de cruce, los ratones heterocigotos *GRN* (*GRN* HET) se cruzaron con los ratones homocigotos TfR<sup>ms/hu</sup> KI (TfR<sup>ms/hu</sup>.KI HOM) para generar una progenie de *GRN* HET x TfR<sup>ms/hu</sup>.KI HET. Los ratones con *GRN* HET x TfR<sup>ms/hu</sup>.KI HET se cruzaron luego con TfR<sup>ms/hu</sup>.KI HOM para obtener la progenie *GRN* HET x TfR<sup>ms/hu</sup>.KI HOM en esta segunda ronda. En la tercera y final ronda de cruce, los ratones con *GRN* HET x TfR<sup>ms/hu</sup>.KI HOM se cruzaron con ratones *GRN* HET x TfR<sup>ms/hu</sup>.KI HOM para generar finalmente los ratones con *GRN* KO x TfR<sup>ms/hu</sup>.KI HOM que se usaron en este estudio.

[0326] A ratones *GRN* KO/hTfR.KI de 2-3 meses de edad se les administró una única dosis de solución salina estéril (vehículo) o Fusión 1 a 0,5, 1,5, 5 o 15 mg/kg por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Se extrajo la sangre de los ratones fueron mediante sangrado submandibular a los 3 días posteriores a la dosis para el aislamiento del plasma. A los 7 días posteriores a la dosis, los ratones fueron sedados con avertina y se realizó una punción cardíaca para recoger sangre entera para el aislamiento del plasma. Los animales se sometieron a perfusión transcardíaca con 1X

PBS enfriado a una velocidad de 5 mL/minuto durante 5-8 minutos, o hasta que no quedara más sangre en los hígados. Se recogió una parte de 100 mg del hígado y del hemisferio izquierdo del cerebro. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1000x g a 4°C, después de lo cual se retiró la capa superior de plasma, se congelaron de forma instantánea sobre hielo seco y se almacenaron a -80 °C o menos hasta que se analizaron como se describe a continuación. Todas las muestras de tejido se congelaron de forma instantánea con hielo seco y se almacenaron a -80°C o menos hasta que se analizaron como se describe a continuación.

Tabla 9. Diseño del estudio/grupos experimentales

| <b>Molécula</b> | <b>Línea celular</b> | <b>Genotipo</b>      | <b>Dosis<br/>(mg/kg)</b> | <b>N/grupo</b> |
|-----------------|----------------------|----------------------|--------------------------|----------------|
| Solución salina | N/A                  | TfR.KI               | N/A                      | 8              |
| Solución salina | N/A                  | <i>GRN</i> KO/TfR.KI | N/A                      | 6              |
| Fusión 1        | CHO                  | <i>GRN</i> KO/TfR.KI | 0,5                      | 6              |
| Fusión 1        | CHO                  | <i>GRN</i> KO/TfR.KI | 1,5                      | 6              |
| Fusión 1        | CHO                  | <i>GRN</i> KO/TfR.KI | 5                        | 6              |
| Fusión 1        | CHO                  | <i>GRN</i> KO/TfR.KI | 15                       | 6              |

[0327] Para medir el contenido de proteína de fusión en muestra de tejido, las muestras de tejido se pesaron y se homogeneizaron en un volumen 10X por peso de amortiguador de lisis celular (Cell Signaling Technologies; Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton al 1 %, pirofosfato de sodio 2,5 mM, beta-glicerofosfato 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM y 1 µg/mL de leupeptina) complementado con 1X inhibidor de proteasa (Roche) y 1X inhibidor de fosfatasa (Roche). Las muestras se homogeneizaron mediante el uso de TissueLyzer con perlas metálicas de 3 mm 2x 3 minutos a 29 Hz. Después de la homogeneización, las muestras se hicieron girar a velocidad máxima en la centrífuga de mesa durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y una parte del sobrenadante se analizó mediante ensayo ELISA de Fc-PGRN (ELISA de captura de Fc y detección de PGRN) y ensayo ELISA de Fc-Fc (ELISA de captura de Fc y detección de Fc).

[0328] Se llevó a cabo el análisis BMP de las muestras como se describen en el Ejemplo 5.

[0329] Los niveles de TREM2 soluble (sTREM2) se midieron de la siguiente manera: Se preparó una placa de estreptavidina de punto pequeño MSD GOLD 96w (MSD L45SA) para el ensayo Trem2 mediante recubrimiento con 1 µg/mL de anticuerpo biotinilado anti-ratón de oveja (R&D Systems BAF1729) durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, la placa MSD se enjuagó con solución salina amortiguada con tris con triton (TBST) y se bloqueó durante dos horas con albúmina de suero bovino al 3 % en TBST, mientras se agitaba a 600 rpm. La placa de MSD se enjuagó de nuevo con TBST, y los lisados cerebrales se diluyeron 5x en solución de bloqueo y se añadieron a la placa de MSD para incubar durante 1 hora a 600 rpm. Tras el siguiente enjuague de TBST, se añadió a la placa anticuerpo anti-ratón de oveja marcado con sulfo (R&D Systems AF1729), que se incubó durante 1 hora, de nuevo a 600 rpm, y se realizó un enjuague final antes de añadir 2X de amortiguador de lectura MSD diluido en agua. La placa se leyó mediante el uso del MSD Meso Sector S600. La señal de Trem2 se normalizó a la concentración de proteínas y se graficó con GraphPad Prism.

[0330] Las FIG. 6A-6C ilustran la farmacocinética de Fusión 1 en plasma, cerebro e hígado de ratones *GRN* KO/hTfR.KI. Los círculos huecos representan la cohorte de *GRN* WT tratada con vehículo y los cuadrados representan la cohorte de *GRN* KO tratada con vehículo. Las cohortes de *GRN* KO tratadas con proteínas de fusión están representadas por triángulos (15 mg/kg), rombos (5 mg/kg), asteriscos (1,5 mg/kg) y marcas en x (0,5 mg/kg). En todas las dosis, la proteína de fusión se eliminó del plasma, el cerebro y el hígado con menos de 0,1 nM de proteína detectada en el tejido y alrededor de 1 nM de proteína detectada en el plasma a los 7 días posteriores a la dosis.

10 [0331] Las FIG. 7A y 7B ilustran los niveles de TREM2 en tejido cerebral y hepático de ratones *GRN* KO/hTfR.KI a los 7 días posteriores a la dosis. Los círculos huecos representan la cohorte de *GRN* WT tratada con vehículo y los cuadrados representan la cohorte de *GRN* KO tratada con vehículo. Las cohortes de *GRN* KO tratadas con proteínas de fusión están representadas por triángulos (15 mg/kg), rombos (5 mg/kg),  
15 asteriscos (1,5 mg/kg) y marcas en x (0,5 mg/kg). Los niveles de dosis de 5 mg/kg y 15 mg/kg fueron capaces de rescatar los niveles de TREM2 en el cerebro, mientras que los niveles de dosis tan bajos como 1,5 mg/kg fueron capaces de rescatar los niveles de TREM2 en el hígado.

[0332] Las FIG. 8A y 8B ilustran los niveles de BMP(18:1/18:1) en tejido cerebral y  
20 hepático de ratones *GRN* KO/hTfR.KI a los 7 días posteriores a la dosis. Los círculos huecos representan la cohorte de *GRN* WT tratada con vehículo y los cuadrados representan la cohorte de *GRN* KO tratada con vehículo. Las cohortes de *GRN* KO tratadas con proteínas de fusión están representadas por triángulos (15 mg/kg), rombos (5 mg/kg), asteriscos (1,5 mg/kg) y marcas en x (0,5 mg/kg). Niveles de dosis  
25 tan bajos como 1,5 mg/kg fueron capaces de rescatar los niveles de BMP en el cerebro, mientras que los niveles de BMP fueron rescatados en todas las dosis en el hígado. Se observaron resultados similares para otras especies de BMP, que incluyen BMP(20:4/20:4) y BMP(22:6/22:6).

[0333] Los datos en las FIG. 6A-6C, 7A y 7B, y 8A y 8B muestran que Fusión 1 es capaz de cruzar la BBB en el cerebro de ratones *GRN* KO/hTfR.KI y corregir los criterios de valoración PD relevantes de la deficiencia de granulina.

Ejemplo 7. Rescate de los niveles de glucosilesfingosina en tejido cerebral de ratones *GRN* KO/hTfR.KI

Recopilación y procesamiento de cerebro para extracción de lípidos y análisis de glucosilesfingosina

[0334] Fusión 1 (tal como se describe en la Tabla 2) o una proteína de fusión correspondiente que no tiene ninguna capacidad de unión a TfR se inyectó en una única dosis a través de la vena de cola a 5 mg/kg en ratones *GRN* KO/hTfR.KI (“Grn KO” en la FIG. 9). La proteína de fusión correspondiente comprende un primer polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:122 y un segundo polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO:108. Ambas proteínas de fusión se expresaron y purificaron a partir de células CHO, tal como se describe en el Ejemplo 1. A los siete días de la administración de las proteínas de fusión, los ratones se sacrificaron para examinar los niveles de glucosilesfingosina (GlcSph) en el cerebro, el hígado y el plasma. Después de la anestesia con una dosis letal de tribromoetanol, se realizó la perfusión cardíaca de los ratones con PBS helado. Se recogieron 18-20 mg de corteza frontal sobre hielo, se pesaron, se transfirieron a un tubo Eppendorf 1.5 Safe-Lock, junto con una microesfera de acero inoxidable 3 mM, luego se congelaron de forma instantánea. Para preparar muestras cerebrales para el análisis lipídico, se añadieron a las muestras 400 µL de metanol de grado de LCMS con patrones internos. Los tejidos se homogeneizaron con un Qiagen Tissuelyser durante 30 segundos a 25 Hz a 4 °C. Las muestras se centrifugaron durante 20 min a 21 000 x g a 4 °C. Tras el centrifugado, el sobrenadante se transfirió a placas de 96 pocillos de media profundidad de fondo en V y se almacenó a -20 °C durante 1 hora para precipitar más las proteínas. Tras esta incubación, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos adicionales a 21 000 x g a 4 °C. 100 µL del sobrenadante se transfirieron a una placa

de 96 pocillos con insertos de vidrio (Analytical Sales & Services, n.º de ref. 27350). A continuación, las muestras se secaron bajo flujo de nitrógeno (alrededor de 2 horas) y luego se resuspendieron en 100 µL de acetonitrilo/isopropanol/agua (92,5 /5/2,5, v/v/v) con formiato de amonio 5 mM y ácido fórmico al 0,5 %.

## 5 Ensayo LCMS para glucosilesfingosina

[0335] Se realizaron análisis de glucosilesfingosina (GlcSph) mediante cromatografía líquida (sistema Shimadzu Nexera X2, Shimadzu Scientific Instrument, Columbia, MD, EUA) acoplada a espectrometría de masas por electrospray (Sciex QTRAP 6500+ Sciex, Framingham, MA, EUA). Para cada análisis, se inyectaron 10 µL de muestra en una columna HALO HILIC 2,0 µm, 3,0 × 150 mm (Advanced Materials Technology, PN 91813-701) mediante el uso de una velocidad de flujo de 0,45 mL/min a 45 °C. La fase móvil A consistió en 92,5/5/2,5 ACN/IPA/H<sub>2</sub>O con formiato de amonio 5 mM y ácido fórmico al 0,5 %. La fase móvil B consistió en 92,5/5/2,5 H<sub>2</sub>O/IPA/ACN con formiato de amonio 5 mM y ácido fórmico al 0,5 %. El gradiente se programó de la siguiente manera: 0,0-3,1 min a 100 % B, 3,2 min a 95 % B, 5,7 min a 85 % B, mantener a 7,1 min a 85 % B, bajar a 0 % B a 7,25 min y mantener a 8,75 min y volver al 100 % a 10,65 min y mantener 11 min. Se llevó a cabo una ionización por electrospray en el modo de ion positivo mediante la aplicación de la siguiente configuración: gas cortina a 25; gas de colisión a medio; voltaje de aspersión de iones a 5500; temperatura a 350 °C; gas de fuente de iones 1 a 55; gas de fuente de iones 2 a 60. Se realizó la adquisición de datos usando Analyst 1.6 (Sciex) en modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) con los siguientes parámetros: tiempo de permanencia (msec) y energía de colisión (CE); potencial de entrada (EP) a 10; y potencial de salida celular de colisión (CXP) a 12,5. Los parámetros de adquisición de datos fueron similares a los descritos anteriormente (Ullman et ál. 2020. *Sci Transl Med* 12(545):eaay1163). La GlcSph se cuantificó mediante el uso del isótopo marcado como patrón interno GlcSph(d<sub>5</sub>). La cuantificación se realizó con MultiQuant 3.02 (Sciex).



### Resultado cerebral de glucosilesfingosina

[0336] Se evaluaron los niveles de GlcSph en el cerebro de ratones *GRN* KO y *GRN* WT, así como en ratones *GRN* KO que recibieron una dosis IV de Fusión 1 de 5 mg/kg administrada por vía intravenosa o la proteína de fusión correspondiente (FIG. 9). Los niveles de GlcSph en el cerebro de *GRN* KO fueron en promedio 4,13 veces el valor de los compañeros de camada WT ( $23,91 \pm 1,963$  ng/ $\mu$ L frente a  $5,782 \pm 1,262$  ng/ $\mu$ L, respectivamente,  $p < 0,0001$ ). En ratones tratados con Fusión 1, hubo un rescate del 88 % hacia ratones *GRN* WT ( $7,866 \pm 0,8237$  ng/ $\mu$ L,  $p = 0,0002$ ). Por el contrario, los ratones *GRN* KO tratados con la proteína de fusión no dirigida al SNC correspondiente solamente mostraron un retorno del 22 % a los niveles de GlcSph WT ( $19,92 \pm 3,486$  ng/ $\mu$ L,  $p = 0,5619$ ).

Ejemplo 8. Durabilidad de BMP y corrección de glucosilesfingosina en ratones *GRN* KO/hTfR.KI

[0337] Fusión 1 (como se describe en la Tabla 2, expresada y purificada a partir de células CHO como se describió en el Ejemplo 1) se inyectó en una única dosis a través de la vena de cola en ratones *GRN* KO/hTfR.KI a las siguientes dosis: 1 mg/kg, 2,5 mg/kg y 5 mg/kg. Para control, se les inyectó solución salina a ratones *GRN* KO/hTfR.KI y *GRN* tipo salvaje/hTfR.KI. A las dos, tres y seis semanas después de la administración de la proteína de fusión o solución salina, se sacrificaron cohortes de ratones para examinar los niveles de BMP y glucosilesfingosina (GlcSph) en el cerebro. Los ratones fueron anestesiados y sus tejidos cerebrales fueron preparados como se describe en el Ejemplo 7. Los niveles de BMP y GlcSph se midieron como se describe en los Ejemplos 5 y 7, respectivamente. Los resultados se ilustran en las FIG. 10-12.

### 25 **Resultado cerebral de glucosilesfingosina**

[0338] Se evaluaron los niveles de glucosilesfingosina (GlcSph) en ratones *GRN*

KO/hTfR.KI y *GRN* de tipo salvaje/hTfR.KI. Tal como se ilustra en la FIG. 10, los niveles de GlcSph en *GRN* KO/hTfR.KI se elevaron aproximadamente 4 veces en relación con los ratones *GRN* de tipo salvaje/hTfR.KI. La administración de Fusión 1 en todas las dosis corrigió los niveles elevados de GlcSph en *GRN* KO/hTfR.KI, donde la dosis más alta administrada (5 mg/kg) mostró la mayor mejoría de todas las cohortes tratadas con proteínas de fusión. Se observó una corrección máxima a casi niveles de tipo salvaje de *GRN* con una sola dosis de Fusión 1 a las dos semanas posteriores a la dosis, aunque se observó una corrección parcial a las seis semanas posteriores a la dosis.

## 10 Resultado cerebral de BMP

[0339] Como se informó anteriormente, los niveles de BMP en *GRN* KO/hTfR.KI se ven afectados por niveles insuficientes de progranulina. La administración de Fusión 1 a *GRN* KO/hTfR.KI fue capaz de corregir este impacto. Los niveles de las especies representativas de BMP se ilustran en las FIG. 11 y 12. La administración de Fusión 1 en todas las dosis corrigió los niveles de BMP en *GRN* KO/hTfR.KI. Se observó una corrección máxima de los niveles de BMP a las dos semanas posteriores a la dosis más alta administrada, donde se mantuvo una corrección parcial a las tres semanas posteriores a la dosis.

### Ejemplo 9. Rescate de la actividad de la GCasa en ratones *GRN* KO/hTfR.KI

[0340] Fusión 1 (como se describe en la Tabla 2, expresada y purificada a partir de células CHO como se describió en el Ejemplo 1) se inyectó a través de la vena de cola en ratones *GRN* KO/hTfR.KI a las dosis descritas en el Ejemplo 8. Para control, se les inyectó solución salina a ratones *GRN* KO/hTfR.KI y *GRN* tipo salvaje/hTfR.KI. A las dos, tres y seis semanas después de la administración de la proteína de fusión o solución salina, se sacrificaron cohortes de ratones para examinar la actividad enzimática de glucocerebrosidasa (GCasa) en el cerebro. Los ratones fueron anestesiados y sus tejidos cerebrales fueron preparados como se describe en el

- Ejemplo 7. La actividad de los GCasa se analizó de la siguiente manera. Se lisó tejido cerebral en NP-40 al 1 % en amortiguador PBS. Los niveles totales de proteínas en las muestras de lisado cerebral se midieron mediante el ensayo de BCA y las muestras se normalizaron para la medición de la actividad de GCasa. Las muestras de tejido se
- 5 diluyeron primero en amortiguador de actividad GBA (amortiguador de citrato de fosfato (Sigma-Aldrich n.º de cat. P4809) con taurocolato de sodio al 0,25 % y Triton X-100 al 0,5 % y se añadieron a los pocillos de una placa de 96 pocillos. Se agregaron posteriormente 4-MU de sustrato de glucosa (Sigma-Aldrich, n.º de cat. M3633-1G) a una concentración final de 1 mM a cada pocillo de muestra. La placa se cubrió y agitó
- 10 a 700 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de transferirla a una incubadora sin CO<sub>2</sub> e incubarla a 37°C durante tres horas. Al final del período de incubación, se añadió una solución de detención (glicina 500 mM, NaOH 300 mM, pH 9,8) a las muestras para detener la reacción enzimática, y se midió la actividad enzimática en un lector de placas BioTek. Los resultados se ilustraron en la Figura 13.
- 15 [0341] Tal como se ilustra en la FIG. 13, la administración de Fusión 1 corrigió la actividad de GCasa en el cerebro de ratones *GRN* KO/hTfR.KI a niveles de tipo salvaje a las dos semanas después de la dosis.

**Ejemplo 10. La dosificación crónica de proteínas de fusión rescaaa biomarcadores distales en ratones *GRN* KO/hTfR.KI**

- 20 [0342] Se llevó a cabo un estudio para determinar si la dosificación crónica con proteínas de fusión como se describe en la presente puede rescatar biomarcadores distales. Las proteínas de fusión se administraron mediante administración intraperitoneal a ratones *GRN* KO/hTfR.KI de 7 meses a 5 mg/kg una vez por semana durante 8 (ocho) semanas. Para control, se les inyectó solución salina a ratones *GRN*
- 25 KO/hTfR.KI y *GRN* tipo salvaje/hTfR.KI (también mencionados como “ratones hTfR.KI”). Se proporcionaron inyecciones de CD4 a los ratones en cada cohorte comenzando con una dosis inicial de proteína de fusión y cada dos semanas después de esto. Se obtuvieron muestras sanguíneas mediante extracción sanguínea

submandibular para aislamiento del plasma a las semanas 0, 2, 4, 6 y 8 (después de la dosis). 24 (veinticuatro) horas después la dosis octava y final de proteína de fusión, las cohortes de ratones se sacrificaron, se extrajeron muestras finales de sangre y LCR, y se recogieron tejidos del cerebro y el hígado y se conservaron como se describió anteriormente (Ejemplo 6). Las cantidades de proteínas de fusión administradas se midieron en el cerebro y el hígado mediante el uso de Fc:Fc:ELISA descrito en el Ejemplo 6. Se analizaron los niveles de BMP, glucosilesfingosina (GlcSph) y Trem2 en el cerebro, hígado, plasma y/o LCR. Además, se analizaron determinados marcadores de gliosis (CD68, Iba1, GFAP) en tejido cerebral y se analizaron los niveles de cadena ligera del neurofilamento (Nf-L) en muestras de LCR y plasma. Los niveles de BMP; TREM2 y GlcSph se midieron como se describe en los Ejemplos 5, 6 y 7, respectivamente. Los niveles de Nf-L en LCR y niveles cerebrales de marcadores de gliosis se midieron como se describe más adelante. La Tabla 10 proporciona un resumen del diseño experimental y los resultados se ilustran en las FIG. 14-28.

Tabla 10. Diseño del estudio/grupos experimentales para estudio de dosificación crónica

| <b>Molécula</b> | <b>Primer polipéptido Fc</b> | <b>Segundo polipéptido Fc-PGRN</b> | <b>Línea celular</b> | <b>Genotipo</b>       | <b>Dosis (mg/kg)</b> |
|-----------------|------------------------------|------------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| Solución salina | --                           | --                                 | N/A                  | hTfR.KI               | N/A                  |
| Solución salina | --                           | --                                 | N/A                  | <i>GRN</i> KO/hTfR.KI | N/A                  |

| <b>Molécula</b>           | <b>Primer polipéptido Fc</b> | <b>Segundo polipéptido Fc-PGRN</b> | <b>Línea celular</b> | <b>Genotipo</b> | <b>Dosis (mg/kg)</b> |
|---------------------------|------------------------------|------------------------------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| Fusión 1                  | SEQ ID NO: 75                | SEQ ID NO: 98                      | CHO                  | GRN KO/hTfR.KI  | 5                    |
| Fusión 11                 | SEQ ID NO: 85                | SEQ ID N:108                       | HEK                  | GRN KO/hTfR.KI  | 5                    |
| Fc-PGRN (sin unión a TfR) | SEQ ID NO: 122               | SEQ ID NO: 108                     | CHO                  | GRN KO/hTfR.KI  | 5                    |

#### Métodos para el análisis en LCR y plasma de Nf-L

[0343] Los niveles en LCR y plasma de Nf-L se analizaron como se describió previamente y de manera congruente con las recomendaciones del fabricante (Ullman et ál. 2020. *Sci Transl Med* 12(545):eaay1163). Brevemente, mediante el uso del kit

5 Quanterix Simoa Neurofilament Light Advantage (NFL). Brevemente, el líquido cefalorraquídeo se diluyó 100x y el plasma se diluyó 10X en diluyente de muestra (Quanterix 102252), luego se añadieron el reactivo detector Simoa y el reactivo de microesferas (Quanterix 103159, 102246) y las muestras se incubaron durante 30

10 minutos, a 30 °C, con agitación a 800 rpm. A continuación, la placa de muestra se lavó con amortiguador de lavado A de Simoa (Quanterix 103078) en el dispositivo de lavado

de microplacas Simoa de acuerdo con el protocolo de dos etapas de Quanterix, se añadió el reactivo SBG (Quanterix 102250), y las muestras se incubaron de nuevo a 30°C, 800rpm durante 10 minutos adicionales. Se continuó el protocolo de lavado en dos etapas, las microesferas de muestra se resuspendieron dos veces en amortiguador de lavado B de Simoa (Quanterix 103079) antes de la aspiración final del amortiguador. Tras un secado de 10 minutos a T.A., las concentraciones de NFL de la muestra se midieron mediante el uso del protocolo de análisis Nf-L en el instrumento SR-X de Quanterix y se interpolaron contra una curva de calibración proporcionada con el kit de ensayo de Quanterix.

## 10 Ensayo para marcadores de gliosis

[0344] Tras la perfusión transcardíaca de PBS y la después de la fijación en PFA al 4 %, se seccionaron los hemisferios cerebrales de ratón coronalmente. Brevemente, una multitud de cerebros (hasta 40) se cortaron y montaron en un solo bloque de gelatina, después se seccionaron coronalmente hasta un espesor de 40 µm. Las láminas de gelatina con secciones cerebrales incrustadas se almacenaron en una solución de preservación de antígenos (PBS al 50 %: etilenglicol al 50 % + PVP al 1 %) hasta la tinción. Se tiñeron secciones para detectar marcadores de gliosis GFAP (burro anti-gallina, Novus NBP1-05198, 1:1000), Iba1 (burro anti-cabra, Novus NB100-1028, 1:1500) y CD68 (burro anti-rata, BioRad MCA1957, 1:500). Brevemente, las secciones se incubaron con agitación a temperatura ambiente durante 4 horas en amortiguador de bloqueo (PBS + BSA al 1 % + gelatina de pescado al 0,1 % + triton X-100 al 0,5 %), luego se transfirieron al amortiguador de dilución de anticuerpos con anticuerpos primarios a las concentraciones enumeradas anteriormente y se almacenaron con agitación a 4 °C durante la noche. Después de 3X lavados en PBS, las muestras se transfirieron al amortiguador de dilución de anticuerpos con anticuerpos secundarios (dilución 1:500) y se incubaron con agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. Las muestras se lavaron con PBS + DAPI (Invitrogen D1306 1:10 000) durante 20 minutos, luego se lavaron dos veces más con PBS antes de montarlas en portaobjetos de 2 x 3 pulgadas con medio de montaje de endurecedor de vidrio Prolong (Life Tech

P36984) y se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente. Los hemisferios cerebrales completos se sometieron a imagenología a 20X mediante el uso de un escáner digital de portaobjetos Zeiss Axio Scan.Z1. El análisis de imagenología se completó con el software Zeiss Zen Blue 3.2. Se trazaron las ROI del tálamo y se utilizó un abordaje de formación de umbrales de bola rodante para determinar el área de cada marcador de gliosis en relación con el área total del tálamo. Se analizaron 1-3 secciones por cerebro y se calcularon los valores promedio de cobertura porcentual en las imágenes.

#### Aislamiento de tipo de célula del SNC

- [0345] Para preparar una suspensión de una sola célula para la clasificación de las células del SNC, el tejido cerebral se diseccionó y procesó en una suspensión de una sola célula de acuerdo con el protocolo de los fabricantes mediante el uso del kit de disociación cerebral para adultos (Miltenyi Biotec 130-107-677). Las células se bloquearon en Fc (Biolegend n.º 101320, 1:100) y se tiñeron para análisis citométrico de flujo con tinción por viabilidad fijable BV510 (BD Biosciences n.º 564406, 1:100) para excluir las células muertas, CD11b-BV421 (BD Biosciences 562605, 1:100), ACSA2-APC (Miltenyi n.º 130-117-386, 1:100) y Thy1-PE (R&D n.º FAB7335P, 1:100). Las células se lavaron con PBS/BSA al 1 % y se filtraron a través de un filtro de 100 µm antes de clasificar CD11b+ microglia, ACSA2+astrocitos y Thy1+neuronas en un FACS Aria III (BD Biosciences) con una boquilla de 100 µm. Las células clasificadas se recogieron directamente en metanol de grado MS con estándares internos añadidos para el análisis lipidómico y metabolómico. La preparación de lisados celulares y los ensayos de LCMS para la medición de GAG, BMP, gangliósidos, GlcCer y GalCer se realizaron mediante el uso de métodos similares a los descritos en el Ejemplo 1.

#### 25 Resultados

[0346] Las FIG. 14 y 15 proporcionan información sobre las concentraciones de las proteínas de fusión administradas en los tejidos cerebrales y hepáticos de las cohortes

de ratones GRN KO tratados. Como se ilustra en las FIG. 14 y 15, la unión a TfR en las Fusiones 1 y 11 condujo a un aumento significativo en la absorción cerebral de la proteína en relación con la proteína Fc:PGRN que no es de unión a TfR. Además, el tratamiento semanal por hasta 8 (ocho) semanas con Fusión 1 no redujo la absorción cerebral de la proteína en relación con una sola dosis intraperitoneal de esta. Por otro lado, la exposición de Fc:PGRN en el hígado fue mayor que la de Fusión 1 y Fusión 11, probablemente debido a la falta de depuración mediada por TfR de la periferia.

[0347] Las FIG. 16-19 proporcionan información sobre los niveles de BMP ilustrativo (di-22:6) en el cerebro, LCR, hígado y plasma de las cohortes de ratones GRN KO tratados. Tal como se ilustra en las FIG. 16 y 17, la administración semanal tanto de Fusión 1 como de Fusión 11 hasta 8 (ocho) semanas mejoró el rescate de los niveles de BMP en los compartimentos del SNC (cerebro, LCR) en relación con el tratamiento con vehículo o el tratamiento con Fc:PGRN. En la periferia (hígado, plasma), la administración de Fc:PGRN, Fusión 1 y Fusión 11 rescató los niveles de BMP con efecto equivalente.

[0348] Las FIG. 20 y 21 proporcionan información sobre los niveles de GlcSph en los tejidos cerebrales y hepáticos de las cohortes de ratones GRN KO tratados. Tal como se ilustra en la FIG. 20, la administración semanal de Fusiones 1 y 11 hasta 8 (ocho) semanas rescató los niveles de GlcSph en el cerebro de una manera estadísticamente significativa en relación con el tratamiento con vehículo y el tratamiento con Fc:PGRN. En la periferia (FIG. 21), la administración semanal de Fc:PGRN, Fusión 1 y Fusión 11 rescató los niveles de GlcSph con efecto equivalente.

[0349] La FIG. 22 proporciona información sobre los niveles de Nf-L en LCR en las cohortes de ratones GRN KO tratados. Tal como se ilustra en la FIG. 22, se observó una tendencia de reducción de Nf-L en LCR después de 8 (ocho) semanas de administración semanal de Fusión 1 en ratones GRN KO. Por el contrario, el Nf-L del LCR no pareció corregirse mediante el tratamiento semanal con Fc:PGRN o Fusión 11.



[0350] La FIG. 23 proporciona información sobre los niveles relativos de TREM2 en los cerebros de las cohortes de ratones GRN KO tratados. Tal como se ilustra en la FIG. 23, administración semanal de Fusión 1 hasta 8 (ocho) semanas redujo los niveles de TREM2 en el tejido cerebral de una manera estadísticamente significativa en relación con el tratamiento con vehículo. La administración semanal de Fusión 11 también redujo los niveles de TREM2 en los cerebros de ratones GRN KO, pero el efecto no fue tan grande como el observado con la administración semanal de Fusión 1.

[0351] Las FIG. 24-26 proporcionar información sobre los marcadores de gliosis en el cerebro (tálamo) de las cohortes de ratones GRN KO tratados. Tal como se ilustra en las FIG. 24-26, la administración semanal de Ff:PGRN, Fusión 1, y Fusión 11 hasta 8 (ocho) semanas redujo los niveles de CD68, Iba1, y GFAP en los cerebros de ratones GRN KO en relación con el tratamiento con vehículo.

[0352] La FIG. 27 es un mapa térmico de BMP y determinados lípidos en las neuronas, astrocitos y células microgliales clasificados a partir de los tejidos cerebrales de las cohortes de ratones GRN KO tratados. Tal como se ilustra en la FIG. 27, la administración semanal de Fusión 1 hasta 8 (ocho) semanas rescató fenotipos de BMP en microglia, astrocitos y neuronas. El rescate fue más pronunciado en células microgliales, aunque también se observó una corrección en astrocitos y neuronas en menor medida. Las FIG. 28-30 ilustran las tendencias de corrección de determinadas especies de BMP (BMP 18:1/18:1, BMP 22:6/22:6 y BMP 20:4/20:4) tras la administración de Fusión 1 en las poblaciones clasificadas de neuronas, astrocitos y células microgliales de cohortes tratadas de GRN KO (en relación con células del SNC de cohortes tratadas con vehículo de GRN de tipo salvaje (hTfR.KI)).

[0353] Se entiende que los ejemplos y modalidades descritos en la presente tienen fines ilustrativos solamente y que se le ocurrirán diversas modificaciones o cambios en vista de estos a expertos en la técnica y se deben incluir dentro del espíritu y ámbito de la presente solicitud y alcance de las reivindicaciones adjuntas. Las secuencias de

los números de acceso de secuencia citados en la presente se incorporan a la presente mediante referencia.

## LISTADO INFORMAL DE SECUENCIAS

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Descripción                                                                                                  |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1             | MWTLSVSWVALTAGLVAGTRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSC<br>CRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSC<br>CPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAI<br>QCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHC<br>CPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV<br>MCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMPNATCCSDHLHC<br>CPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEV<br>SCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCD<br>TQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVS<br>SCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCV<br>AEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPV<br>GQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKA<br>RSCEKEVVSAPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTC<br>CRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCL<br>RREAPRWDAPLRDPALRQLL | Polipéptido<br>de<br>progranulina<br>(PGRN) que<br>contiene el<br>péptido<br>señal<br>(aminoácido<br>s 1-17) |
| 2             | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELP SGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL                                                                                                                                                                                                            | PRGN<br>madura                                                                                               |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Descripción           |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
|               | EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRQLL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                       |
| 3             | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> , donde cada uno de X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> y X <sub>3</sub> es independiente un<br>aminoácido, y X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> juntos no son QLL | Variante de<br>PGRN 1 |
| 4             | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Variante de<br>PGRN 2 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Descripción           |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
|               | CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRPHL                                                                                                                                                                                                                               |                       |
| 5             | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRPKL | Variante de<br>PGRN 3 |
| 6             | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Variante de           |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Descripción           |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
|               | GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRPDL | PGRN 4                |
| 7             | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL                                                    | Variante de<br>PGRN 5 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Descripción           |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
|               | ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRPEL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                       |
| 8             | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRPSL | Variante de<br>PGRN 6 |
| 9             | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Variante de<br>PGRN 7 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Descripción           |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
|               | MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRPTL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                       |
| 10            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRPNL | Variante de<br>PGRN 8 |
| 11            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Variante de<br>PGRN 9 |



| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Descripción            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRC PDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRPQL                                                                                                                                                                                    |                        |
| 12            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRC PDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRPGL | Variante de<br>PGRN 10 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Descripción            |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 13            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRPPL | Variante de<br>PGRN 11 |
| 14            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC                                                                                                                                             | Variante de<br>PGRN 12 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Descripción            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRPAL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                        |
| 15            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRPYL | Variante de<br>PGRN 13 |
| 16            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Variante de<br>PGRN 14 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Descripción            |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRPVL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                        |
| 17            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCP DGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRPIL | Variante de<br>PGRN 15 |
| 18            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Variante de<br>PGRN 16 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Descripción            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRPFL                                                                                                                              |                        |
| 19            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP | Variante de<br>PGRN 17 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Descripción            |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | ALRQRL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                        |
| 20            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEV VSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRQHL | Variante de<br>PGRN 18 |
| 21            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL                                                                                                                                                                                            | Variante de<br>PGRN 19 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Descripción            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRQKL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                        |
| 22            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRQDL | Variante de<br>PGRN 20 |
| 23            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Variante de<br>PGRN 21 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Descripción            |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRQEL                                                                                                                                                                                                                                                                               |                        |
| 24            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRQNL | Variante de<br>PGRN 22 |
| 25            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Variante de<br>PGRN 23 |



| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Descripción            |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRC PDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRQPL                                     |                        |
| 26            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRC PDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR | Variante de<br>PGRN 24 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Descripción            |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRQYL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                        |
| 27            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCP DGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRQQL | Variante de<br>PGRN 25 |
| 28            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCP DGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE                                                                                                                                                                                                                                        | Variante de<br>PGRN 26 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Descripción            |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRVVL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |
| 29            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRVTL | Variante de<br>PGRN 27 |
| 30            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Variante de<br>PGRN 28 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Descripción            |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRRIL                                                                                                                                                                                                                                |                        |
| 31            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRHIL | Variante de<br>PGRN 29 |
| 32            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Variante de            |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Descripción            |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRKIL | PGRN 30                |
| 33            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL                                                    | Variante de<br>PGRN 31 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Descripción            |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALREIL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                        |
| 34            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRRFL | Variante de<br>PGRN 32 |
| 35            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Variante de<br>PGRN 33 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Descripción            |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRHFL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                        |
| 36            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATDILLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRKFL | Variante de<br>PGRN 34 |
| 37            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Variante de<br>PGRN 35 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Descripción            |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRC PDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCP DGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRDFL                                                                                                                                                                                    |                        |
| 38            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRC PDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCP DGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALREFL | Variante de<br>PGRN 36 |



| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Descripción            |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 39            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRSFL | Variante de<br>PGRN 37 |
| 40            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC                                                                                                                                             | Variante de<br>PGRN 38 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Descripción            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRTFL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                        |
| 41            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRNFL | Variante de<br>PGRN 39 |
| 42            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Variante de<br>PGRN 40 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Descripción            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRQFL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                        |
| 43            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRLFL | Variante de<br>PGRN 41 |
| 44            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Variante de<br>PGRN 42 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Descripción            |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCP DGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRFFL                                                                                                                               |                        |
| 45            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTL SRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCP DGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP | Variante de<br>PGRN 43 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Descripción            |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | ALRYFL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                        |
| 46            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRRQL | Variante de<br>PGRN 44 |
| 47            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL                                                                                                                                                                                          | Variante de<br>PGRN 45 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Descripción            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRHQL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                        |
| 48            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRKQL | Variante de<br>PGRN 46 |
| 49            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Variante de<br>PGRN 47 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Descripción            |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRDQL                                                                                                                                                                                                                                                                               |                        |
| 50            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALREQL | Variante de<br>PGRN 48 |
| 51            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Variante de<br>PGRN 49 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Descripción            |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRC PDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRNQL                                      |                        |
| 52            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTL SRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRC PDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR | Variante de<br>PGRN 50 |



| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Descripción            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRLQL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                        |
| 53            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRFQL | Variante de<br>PGRN 51 |
| 54            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE                                                                                                                                                                                                                                        | Variante de<br>PGRN 52 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Descripción            |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRYQL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                        |
| 55            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRQLLY <sub>1</sub> Y <sub>2</sub> QLL, donde Y <sub>1</sub> es L o está ausente, e Y <sub>2</sub> es R o<br>está ausente | Variante de<br>PGRN 53 |
| 56            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Variante de<br>PGRN 54 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Descripción            |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRC PDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRQLQLL                                                                                                                                                                                       |                        |
| 57            | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRC PDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRQLLLRQLL | Variante de<br>PGRN 55 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                      | Descripción                                                                                                                           |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 58            | LRQLL                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                       |
| 59            | QLLQLL                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                       |
| 60            | QLLLRQLL                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                       |
| 61            | <p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV<br/> KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br/> NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE<br/> LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD<br/> SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br/> LSLSPGK</p> | <p>Secuencia<br/>de Fc<br/>humana de<br/>tipo salvaje</p> <p>Numeración<br/>según índice<br/>EU de las<br/>posiciones<br/>231-447</p> |
| 62            | <p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV<br/> KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br/> NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</p>                                                                                                                              | <p>Secuencia<br/>de dominio<br/>CH2</p> <p>Numeración<br/>según índice<br/>EU de las<br/>posiciones<br/>231-340</p>                   |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                    | Descripción                                                                                            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 63            | GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF<br>SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                          | Secuencia<br>de dominio<br>CH3<br><br>Numeración<br>según índice<br>EU de las<br>posiciones<br>341-447 |
| 64            | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS<br>GDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br>LSLSPGK | Secuencia<br>de Fc con<br>mutaciones<br>botón                                                          |
| 65            | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS<br>GDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br>LSLSPGK | Secuencia<br>de Fc con<br>mutaciones<br>botón y<br>LALA                                                |
| 66            | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE                                                                                                       | Secuencia<br>de Fc con<br>mutaciones                                                                   |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                     | Descripción                                         |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|               | LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD<br>SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br>LSLSPGK                                                                                                                                            | ojal                                                |
| 67            | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD<br>SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br>LSLSPGK | Secuencia<br>de Fc con<br>mutaciones<br>ojal y LALA |
| 68            | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLD<br>SDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSPGK | Clon<br>CH3C.35.23<br>.2                            |
| 69            | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLD<br>SDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSPGK | Clon<br>CH3C.35.23<br>.2 con<br>mutación<br>botón   |
| 70            | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE                                                                                                       | Clon<br>CH3C.35.23<br>.2 con                        |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                               | Descripción                                               |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
|               | LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLD<br>SDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSPGK                                                                                                                                                      | mutaciones<br>botón y<br>LALA                             |
| 71            | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLD<br>SDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSPGK           | Clon<br>CH3C.35.23<br>.2 con<br>mutaciones<br>ojal        |
| 72            | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLD<br>SDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSPGK           | Clon<br>CH3C.35.23<br>.2 con<br>mutaciones<br>ojal y LALA |
| 73            | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWA<br>NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEA<br>LHNHYTQKSLSLSPGK | Bisagra<br>parcial-Clon<br>CH3C.35.23<br>.2               |
| 74            | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ                                                                                                                 | Bisagra<br>parcial-clon<br>CH3C.35.23                     |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                               | Descripción                                                                         |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|               | VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWA<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEA<br>LHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                            | .2 con<br>mutación de<br>botón                                                      |
| 75            | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWA<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEA<br>LHNHYTQKSLSLSPGK | Bisagra<br>parcial-clon<br>CH3C.35.23<br>.2 con<br>mutaciones<br>de botón y<br>LALA |
| 76            | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWA<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEA<br>LHNHYTQKSLSLSPGK | Bisagra<br>parcial-clon<br>CH3C.35.23<br>.2 con<br>mutaciones<br>de ojal            |
| 77            | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWA<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEA<br>LHNHYTQKSLSLSPGK | Bisagra<br>parcial-clon<br>CH3C.35.23<br>.2 con<br>mutaciones<br>de ojal y<br>LALA  |
| 78            | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV                                                                                                                                                                                                             | Clon                                                                                |



| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                      | Descripción                                                    |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
|               | KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTTPVLDS<br>DGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS<br>LSPGK                                                 | CH3C.35.21<br>.17                                              |
| 79            | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTTPVLDS<br>SDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS<br>SLSPGK | Clon<br>CH3C.35.21<br>.17 con<br>mutación<br>botón             |
| 80            | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTTPVLDS<br>SDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS<br>SLSPGK | Clon<br>CH3C.35.21<br>.17 con<br>mutaciones<br>botón y<br>LALA |
| 81            | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTTPVLDS<br>SDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS<br>SLSPGK | Clon<br>CH3C.35.21<br>.17 con<br>mutaciones<br>ojal            |
| 82            | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV                                                                                                                                                                                                     | Clon                                                           |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                               | Descripción                                                                          |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|               | KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTTPVLD<br>SDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSPGK                                                          | CH3C.35.21<br>.17 con<br>mutaciones<br>lojal y LALA                                  |
| 83            | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWS<br>SYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEA<br>LHNHYTQKSLSLSPGK | Bisagra<br>parcial-Clon<br>CH3C.35.21<br>.17                                         |
| 84            | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWS<br>SYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEA<br>LHNHYTQKSLSLSPGK | Bisagra<br>parcial-clon<br>CH3C.35.21<br>.17 con<br>mutación de<br>botón             |
| 85            | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWS<br>SYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEA<br>LHNHYTQKSLSLSPGK | Bisagra<br>parcial-clon<br>CH3C.35.21<br>.17 con<br>mutaciones<br>de botón y<br>LALA |

| SEQ ID NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                          | Descripción                                                       |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 86         | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Bisagra parcial-clon CH3C.35.21 .17 con mutaciones de ojal        |
| 87         | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Bisagra parcial-clon CH3C.35.21 .17 con mutaciones de ojal y LALA |
| 88         | EPKSCDKTHTCPPCP                                                                                                                                                                                                                    | Secuencia de aminoácidos bisagra de IgG1 humana                   |
| 89         | DKTHTCPPCP                                                                                                                                                                                                                         | Parte de secuencia bisagra de IgG1 humana                         |

| <b>SEQ ID<br/>NO:</b> | <b>Secuencia</b>                            | <b>Descripción</b>         |
|-----------------------|---------------------------------------------|----------------------------|
|                       |                                             | (bisagra<br>parcial)       |
| 90                    | GGGGS                                       | Enlazador<br>polipeptídico |
| 91                    | GGGGSGGGGS                                  | Enlazador<br>polipeptídico |
| 92                    | GGSG                                        | Enlazador<br>polipeptídico |
| 93                    | SGGG                                        | Enlazador<br>polipeptídico |
| 94                    | KESGSVSSEQLAQFRSLD                          | Enlazador<br>polipeptídico |
| 95                    | EGKSSGSGSESKST                              | Enlazador<br>polipeptídico |
| 96                    | GSAGSAAGSGEF                                | Enlazador<br>polipeptídico |
| 97                    | AEAAAKA                                     | Enlazador<br>polipeptídico |
| 98                    | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV | Bisagra                    |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Descripción                                                                                                              |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTRCPDGQFCPVAC<br>CLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGH<br>SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSC<br>FQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPM<br>PQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPAQ<br>RTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMP<br>NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHT<br>VGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDH<br>IHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQA<br>LKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH<br>QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRD<br>IGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC<br>CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAPATFLARSPHVGVDVECG<br>EGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPA<br>GFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRPIL | parcial-polip<br>péptido Fc<br>con<br>mutaciones<br>de ojal y<br>LALA-<br>(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -<br>PGRN(PIL) |
| 99            | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTRCPDGQFCPVAC<br>CLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Bisagra<br>parcial-polip<br>péptido Fc<br>con<br>mutaciones<br>de ojal y<br>LALA-                                        |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Descripción                                                                                                                         |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSC<br>FQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWGCCPM<br>PQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPAQ<br>RTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMP<br>NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHT<br>VGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDH<br>IHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQA<br>LKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH<br>QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRD<br>IGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC<br>CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAPATFLARSPHVGVKDVECG<br>EGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPA<br>GFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRPFL                   | (G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -<br>PGRN(PFL)                                                                                      |
| 100           | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTRCPDGQFCPVAC<br>CLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTL SRHLGGPCQVDAHCSAGH<br>SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSC<br>FQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWGCCPM<br>PQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPAQ<br>RTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMP<br>NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHT<br>VGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDH | Bisagra<br>parcial-polip<br>péptido Fc<br>con<br>mutaciones<br>de ojal y<br>LALA-<br>(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -<br>PGRN(QQL) |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Descripción                                                                                                            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | IHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQA<br>LKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH<br>QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRD<br>IGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC<br>CPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQPATFLARSPHVGKDVCECG<br>EGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPA<br>GFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQQL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                        |
| 101           | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTRCPDGQFCPVAC<br>CLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGH<br>SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSC<br>FQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPM<br>PQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPAQ<br>RTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPKGKYGCCPMP<br>NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHT<br>VGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDH<br>IHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQA<br>LKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH<br>QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRD<br>IGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC<br>CPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQPATFLARSPHVGKDVCECG<br>EGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPA | Bisagra<br>parcial-polip<br>péptido Fc<br>con<br>mutaciones<br>de ojal y<br>LALA-<br>(G4S) <sub>2</sub> -<br>PGRN(VVL) |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Descripción                                                                                                                        |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | GFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRVVL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                    |
| 102           | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTRCPDGQFCPVAC<br>CLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGH<br>SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSC<br>FQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPM<br>PQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPAQ<br>RTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMP<br>NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHT<br>VGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDH<br>IHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQA<br>LKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH<br>QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRD<br>IGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC<br>CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAPATFLARSPHVGVDVECG<br>EGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPA<br>GFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRVTL | Bisagra<br>parcial-polip<br>éptido Fc<br>con<br>mutaciones<br>de ojal y<br>LALA-<br>(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -<br>PGRN(VTL) |
| 103           | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Bisagra<br>parcial-polip<br>éptido Fc<br>con<br>mutaciones                                                                         |



| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Descripción                                                                                                                          |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTRCPDGQFCPVAC<br>CLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGH<br>SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSC<br>FQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPM<br>PQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPAQ<br>RTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMP<br>NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHT<br>VGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDH<br>IHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQA<br>LKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH<br>QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRD<br>IGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC<br>CPAGYTCNVKARSCEKEVWSAQPATFLARSPHVGVKDVECG<br>EGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPA<br>GFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRPIL | de botón y<br>LALA-<br>(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -<br>PGRN(PIL)                                                                |
| 104           | DKTHTCP PCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTRCPDGQFCPVAC<br>CLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGH<br>SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSC<br>FQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPM<br>PQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPAQ<br>RTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMP                                                                                                                                                                    | Bisagra<br>parcial-polip<br>péptido Fc<br>con<br>mutaciones<br>de botón y<br>LALA-<br>(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -<br>PGRN(PFL) |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Descripción                                                                                                                          |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHT<br>VGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDH<br>IHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQA<br>LKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH<br>QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRD<br>IGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC<br>CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECG<br>EGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPA<br>GFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRPFL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                      |
| 105           | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTRCPDGQFCPVAC<br>CLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGH<br>SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSC<br>FQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPM<br>PQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPQA<br>RTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPKGKYGCCPMP<br>NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHT<br>VGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDH<br>IHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQA<br>LKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH<br>QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRD<br>IGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC | Bisagra<br>parcial-polip<br>péptido Fc<br>con<br>mutaciones<br>de botón y<br>LALA-<br>(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -<br>PGRN(QQL) |

| SEQ ID NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Descripción                                                                                                                         |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            | CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVDVECG<br>EGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPA<br>GFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQQL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                     |
| 106        | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVME<br>ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTRCPDGQFCPVAC<br>CLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGH<br>SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSC<br>FQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPM<br>PQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPAQ<br>RTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMP<br>NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKLSKENATTDLLTKLPAHT<br>VGDKVCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDH<br>IHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQA<br>LKRDPVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH<br>QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRD<br>IGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC<br>CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVDVECG<br>EGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPA<br>GFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRVVL | Bisagra<br>parcial-polip<br>éptido Fc<br>con<br>mutaciones<br>de botón y<br>LALA-<br>(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -<br>PGRN(VVL) |
| 107        | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Bisagra<br>parcial-polip<br>éptido Fc                                                                                               |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Descripción                                                                                                       |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTRCPDGQFCPVAC<br>CLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGH<br>SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSC<br>FQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPM<br>PQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPAQ<br>RTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMP<br>NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKLSKENATTDLLTKLPAHT<br>VGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDH<br>IHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQA<br>LKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH<br>QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRD<br>IGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC<br>CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAPATFLARSPHVGVKDVECG<br>EGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPA<br>GFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRVTL | con<br>mutaciones<br>de botón y<br>LALA-<br>(G4S) <sub>2</sub> -<br>PGRN(VTL)                                     |
| 108           | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTRCPDGQFCPVAC<br>CLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGH<br>SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSC<br>FQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPM                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Bisagra<br>parcial-polip<br>péptido Fc<br>con<br>mutaciones<br>de ojal y<br>LALA-<br>(G4S) <sub>2</sub> -<br>PGRN |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Descripción                                                       |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
|               | PQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPAQ<br>RTNRAVALSSSV MCPDARS RCPDGSTCCELP SGKYGCCPMP<br>NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHT<br>VGDVKCDMEVSCP DGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDH<br>IHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQA<br>LKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH<br>QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRD<br>IGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC<br>CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECG<br>EGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPA<br>GFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLL                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                   |
| 109           | MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDN SHVEMKLA<br>VDEEENADNNTKANVT KPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGY<br>LGYCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAARRLYWDD<br>LKRKLSEKLDSTDFTGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYV<br>ENQFREFKLSKVWRDQH FVKIQVKDS AQNSVIIVDKNGRLVYL<br>VENPGGYVAYS KAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSI<br>VIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFG<br>HAH LGTGD PYTPGFPSFNHTQFP PSRSSGLPNIPVQTISR AAA<br>EKLF GNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEI<br>KILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGA AKSGVGTALLL<br>KLAQMFSDMVLKDG FQPSRSIIFASWSAGDFG SVGATEWLEG<br>YLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNV<br>KHPVTGQFLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSF<br>CFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQFVI<br>KLTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQW | Proteína del<br>receptor de<br>transferrina<br>humana 1<br>(TFR1) |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Descripción                                                                      |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
|               | LYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEY<br>HFLSPYVSPKESPFRHVFWSGSHTLPALLENLKLKQNGA<br>FNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                  |
| 110           | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Bisagra<br>parcial-<br>secuencia<br>de Fc con<br>mutaciones<br>de ojal y<br>LALA |
| 111           | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRNIL | Variante de<br>PGRN 56                                                           |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Descripción            |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 112           | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRLLL | Variante de<br>PGRN 57 |
| 113           | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC                                                                                                                                             | Variante de<br>PGRN 58 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Descripción            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRPLL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                        |
| 114           | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRPRL | Variante de<br>PGRN 59 |
| 115           | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Variante de<br>PGRN 60 |



| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Descripción            |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRYIL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                        |
| 116           | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCP DGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRVLL | Variante de<br>PGRN 61 |
| 117           | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Variante de<br>PGRN 62 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Descripción            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRVIV                                                                                                                              |                        |
| 118           | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP | Variante de<br>PGRN 63 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Descripción            |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | ALRFIL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                        |
| 119           | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEV VSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRMLL | Variante de<br>PGRN 64 |
| 120           | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL                                                                                                                                                                                            | Variante de<br>PGRN 65 |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Descripción                                                               |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
|               | EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRQLLG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                           |
| 121           | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRQLLGK | Variante de<br>PGRN 66                                                    |
| 122           | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Bisagra<br>parcial-<br>secuencia<br>de Fc con<br>mutaciones<br>de botón y |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Descripción                                                                                                                        |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | LALA                                                                                                                               |
| 123           | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTRCPDGQFCPVAC<br>CLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGH<br>SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSC<br>FQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPM<br>PQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPAAQ<br>RTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMP<br>NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHT<br>VGDKVCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDH<br>IHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQA<br>LKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH<br>QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRD<br>IGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC<br>CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAPATFLARSPHVGVDVECG<br>EGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPA<br>GFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRPPL | Bisagra<br>parcial-polip<br>éptido Fc<br>con<br>mutaciones<br>de ojal y<br>LALA-<br>(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -<br>PGRN(PPL) |
| 124           | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Bisagra<br>parcial-polip<br>éptido Fc<br>con<br>mutaciones                                                                         |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Descripción                                                                                                                        |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTRCPDGQFCPVAC<br>CLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGH<br>SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSC<br>FQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPM<br>PQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPAQ<br>RTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMP<br>NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHT<br>VGDKVCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDH<br>IHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQA<br>LKRDPVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH<br>QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRD<br>IGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC<br>CPAGYTCNVKARSCEKEVWSAQPATFLARSPHVGVKDVECG<br>EGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPA<br>GFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRPYL | de ojal y<br>LALA-<br>(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -<br>PGRN(PYL)                                                               |
| 125           | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTRCPDGQFCPVAC<br>CLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGH<br>SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSC<br>FQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPM<br>PQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPAQ<br>RTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMP                                                                                                                                                                      | Bisagra<br>parcial-polip<br>éptido Fc<br>con<br>mutaciones<br>de ojal y<br>LALA-<br>(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -<br>PGRN(QRL) |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Descripción                                                                                                                         |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHT<br>VGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDH<br>IHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQA<br>LKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH<br>QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRD<br>IGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC<br>CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVDVECG<br>EGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPA<br>GFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQRL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                     |
| 126           | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTRCPDGQFCPVAC<br>CLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGH<br>SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSC<br>FQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPM<br>PQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPQA<br>RTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPKGKYGCCPMP<br>NATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHT<br>VGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDH<br>IHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQA<br>LKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDH<br>QHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRD<br>IGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC | Bisagra<br>parcial-polip<br>péptido Fc<br>con<br>mutaciones<br>de ojal y<br>LALA-<br>(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -<br>PGRN(QHL) |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Descripción            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECG<br>EGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPA<br>GFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQHL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                        |
| 127           | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW<br>MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL<br>ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRQLY | Variante de<br>PGRN 67 |
| 128           | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLG<br>GPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCC<br>PRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCC<br>VMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCIT<br>PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTC<br>CELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSK<br>ENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW<br>GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPW                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Variante de<br>PGRN 68 |



| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                       | Descripción                                                                                      |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | MEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGE<br>WGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGL<br>EKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC<br>QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL<br>ARSPHVGVDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYR<br>QGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP<br>ALRQLP |                                                                                                  |
| 129           | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTTPVLD<br>SDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSPG                                    | Clon<br>CH3C.35.23<br>.2 con<br>mutaciones<br>botón y<br>LALA,<br>truncado                       |
| 130           | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWA<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEA<br>LHNHYTQKSLSLSPG                          | Bisagra<br>parcial-clon<br>CH3C.35.23<br>.2 con<br>mutaciones<br>de botón y<br>LALA,<br>truncado |
| 131           | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE                                                                                                                                         | Clon<br>CH3C.35.21<br>.17 con                                                                    |

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                              | Descripción                                                                                       |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTTPVLD<br>SDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSPG                                                                                                                                                      | mutaciones<br>botón y<br>LALA,<br>truncado                                                        |
| 132           | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWS<br>SYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEA<br>LHNHYTQKSLSLSPG | Bisagra<br>parcial-clon<br>CH3C.35.21<br>.17 con<br>mutaciones<br>de botón y<br>LALA,<br>truncado |