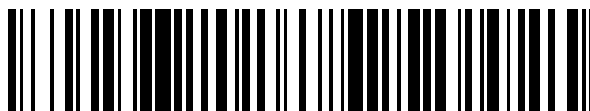


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 114**

51 Int. Cl.:

C07K 14/195 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2011** **E 11743207 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015** **EP 2590993**

54 Título: **Polipéptidos**

30 Prioridad:

17.09.2010 US 403561 P
09.07.2010 US 399285 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
08.07.2015

73 Titular/es:

AFFIBODY AB (100.0%)
Gunnar Asplunds Allé 24
171 63 Solna, SE

72 Inventor/es:

EKBLAD, CAROLINE y
ABRAHMSÉN, LARS

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 540 114 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos

Campo técnico

- 5 La presente descripción se refiere a una clase de polipéptidos diseñados que tienen una afinidad de unión por la albúmina. También se refiere a nuevos métodos y usos que explotan la unión de estos y otros compuestos a la albúmina en diferentes contextos, algunos de los cuales tienen significación para el tratamiento de enfermedades en mamíferos, incluyendo seres humanos.

Antecedentes

Albúmina de suero

- 10 La albúmina de suero es la proteína más abundante en los sueros de los mamíferos (40 g/l; aproximadamente 0,7 mM en los seres humanos), y una de sus funciones es unirse a moléculas tales como lípidos y bilirrubina (Peters, *Advances in Protein Chemistry* 37:161, 1985). La albúmina de suero está desprovista de ninguna función enzimática o inmunológica. Además, la albúmina de suero humano (HSA) es un portador natural implicado en el transporte endógeno y entrega de numerosas moléculas naturales, así como terapéuticas (Sellers y Koch-Weser, *Albumin Structure, Function and Uses*, eds Rosenoer et al, Pergamon, Oxford, p 159, 1977). La semivida de la albúmina de suero es directamente proporcional al tamaño del animal, donde por ejemplo la albúmina de suero humano tiene una semivida de 19 días y la albúmina de suero de conejo tiene una semivida de aproximadamente 5 días (McCurdy et al, *J Lab Clin Med* 143:115, 2004). La HSA está ampliamente distribuida en todo el cuerpo, en particular en los compartimentos intersticial y sanguíneo, donde está implicada principalmente en el mantenimiento de la osmolaridad. Estructuralmente, las albúminas son proteínas de cadena única que comprenden tres dominios homólogos y en total 584 o 585 aminoácidos (Dugaiczky et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 79:71, 1982). Las albúminas contienen 17 puentes disulfuro y un único tiol reactivo, cisteína en la posición 34, pero carecen de restos de carbohidratos enlazados a N y enlazados a O (Peters, 1985, arriba; Nicholson et al, *Br J Anaesth* 85:599, 2000).

La fusión o asociación con HSA da como resultado un aumento de la semivida *in vivo* de las proteínas

- 25 Se han reportado varias estrategias para acoplar covalentemente proteínas directamente a albúminas de suero o bien a un péptido o proteína que permitirá la asociación *in vivo* a albúminas de suero. Se han descrito ejemplos de esta última estrategia, p.ej. en la solicitud de patente internacional WO91/01743, en la solicitud de patente internacional WO01/45746 y en Dennis et al (*J Biol Chem* 277:35035-43, 2002). El primer documento describe, entre otros, el uso de péptidos de unión a albúmina o proteínas derivadas de proteína G estreptocócica (SpG) para aumentar la semivida de otras proteínas. La idea es fusionar el péptido/proteína que se une a albúmina, derivado bacterianamente, a un péptido/proteína terapéuticamente interesante, del que se ha mostrado que tiene una eliminación rápida de la sangre. La proteína de fusión así generada se une a la albúmina de suero *in vivo*, y se beneficia de su semivida más larga, lo que aumenta la semivida neta del péptido/proteína terapéuticamente interesante fusionada. La solicitud de patente internacional WO01/45746 y Dennis et al se refieren al mismo concepto, pero aquí, los autores utilizan péptidos relativamente cortos para unirse a la albúmina de suero. Los péptidos fueron seleccionados de una biblioteca de péptidos de expresión en fagos. En Dennis *et al*, se menciona un trabajo anterior en el que se encontró la mejora de una respuesta inmunológica a una fusión recombinante del dominio de unión a la albúmina de la proteína G estreptocócica al receptor del complemento humano de Tipo 1. La solicitud de patente de EE.UU. publicada como US2004/0001827 (Dennis) describe también el uso de constructos que comprenden ligandos peptídicos, identificados de nuevo por tecnología de expresión en fagos, que se unen a la albúmina de suero y que se conjugan a compuestos bioactivos para el acceso a tumores.

Dominios de unión a albúmina de proteínas receptoras bacterianas

- 45 La proteína G estreptocócica (SpG) es un receptor bifuncional presente en la superficie de ciertas cepas de estreptococos, y es capaz de unirse tanto a IgG como a albúmina de suero (Björck et al, *Mol Immunol* 24:1113, 1987). La estructura es altamente repetitiva, con varios dominios estructuralmente y funcionalmente diferentes (Guss et al, *EMBO J* 5:1567, 1986), más concretamente tres dominios que se unen a Ig y tres dominios que se unen a albúmina de suero (Olsson et al, *Eur J Biochem* 168:319, 1987). La estructura de uno de los tres dominios que se unen a albúmina de suero en la SpG ha sido determinada, mostrando un paquete plegado de tres hélices (Kraulis et al, *FEBS Lett* 378:190, 1996; Johansson et al, *J. Biol. Chem.* 277:8114-20, 2002). Un motivo de 46 aminoácidos se definió como ABD (dominio de unión a albúmina), y también se ha designado posteriormente como G148-GA3 (GA por unión a albúmina relacionada con proteína G). En, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO09/016043, se describen variantes de unión a albúmina del motivo de 46 aminoácidos ABD.

- 55 Se han identificado también otros dominios de unión a albúmina bacterianos además de los de la proteína G, algunos de los cuales son estructuralmente similares a los de la proteína G. Son ejemplos de proteínas que contienen tales dominios de unión a albúmina las proteínas PAB, PPL, MAG y ZAG (Rozak et al, *Biochemistry* 45:3263-3271, 2006). Se han llevado a cabo estudios de estructura y función de tales dominios de unión a albúmina, y son reportados p.ej. por Johansson y colaboradores (Johansson et al, *J Mol Biol* 266:859-865, 1997). Además,

Rozak *et al* han informado sobre la creación de variantes artificiales de G148-GA3, que fueron seleccionados y estudiados con respecto a especificidad y estabilidad a diferentes especies (Rozak et al, Biochemistry 45:3263-3271, 2006), mientras que Jonsson *et al* desarrollaron variantes artificiales de G148-GA3 que tienen una afinidad muy mejorada por la albúmina de suero humano (Jonsson et al, Prot Eng Des Sel 21:515-27, 2008). Para algunas de las

variantes se consiguió una afinidad más alta a costa de una estabilidad térmica reducida.

Además de las proteínas que contienen tres hélices descritas anteriormente, hay también otras proteínas bacterianas no relacionadas que se unen a la albúmina.

ABD e inmunización

Recientemente, se identificaron experimentalmente algunos epítopos de linfocitos T y B dentro de la región de unión a albúmina de la proteína G estreptocócica de la cepa 148 (G148) (Goetsch et al, Clin Diagn Lab Immunol 10:125-32, 2003). Los autores responsables del estudio estaban interesados en utilizar los epítopos de células T de G148 en vacunas, es decir, utilizar la propiedad inmunoestimuladora inherente de la región de unión a albúmina. Goetsch *et al* encontraron adicionalmente un epítipo de células B, es decir, una región unida por anticuerpos después de la inmunización, en la secuencia de G148.

En las composiciones farmacéuticas para administración a seres humanos no se desea respuesta inmune. Por lo tanto, el dominio de unión a albúmina G148 es inadecuado como tal para el uso en tales composiciones, debido a sus propiedades inmunoestimuladoras mencionadas anteriormente.

Descripción

Los anteriores inconvenientes y deficiencias de la técnica anterior son vencidos o aliviados por, en un primer aspecto, un polipéptido de unión a albúmina, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de

i) LAX₃AKEAANA ELDX₁₄YGVSDF YKRLIDKAKT VEGVEALKDA ILAALP

en donde, independientemente uno de otro

X₃ se selecciona de E y S; y

X₁₄ se selecciona de A, S, C y K;

y

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad a la secuencia definida en i).

La clase definida anteriormente de polipéptidos de secuencias relacionadas que tienen una afinidad de unión por la albúmina deriva de una secuencia polipeptídica parental común, que se pliega en un dominio empaquetado de tres hélices alfa. Más específicamente, los polipéptidos descritos anteriormente derivan de un modelo de construcción basado en una estructura de un complejo entre albúmina de suero y el dominio de unión a albúmina G148-GA3 (Lejon et al, J Biol Chem 279:42924-8, 2004), así como de unos análisis de propiedades de unión y estructurales de diversas variantes mutacionales de la secuencia polipeptídica parental común. La secuencia de aminoácidos definida anteriormente i) comprende sustituciones de aminoácidos, en comparación con la secuencia polipeptídica parental, que dan como resultado una clase de polipéptidos que se espera que se plieguen en un dominio empaquetado de tres hélices casi idéntico. Aunque la secuencia polipeptídica parental ya comprende una superficie de unión para la interacción con la albúmina, esa superficie de unión está modificada por alguna de las sustituciones según la definición anterior. Las sustituciones según la definición anterior proporcionan una capacidad de unión a la albúmina mejorada en comparación con la secuencia polipeptídica parental.

Los polipéptidos de unión a albúmina según el primer aspecto de la descripción exhiben un conjunto de características que, por ejemplo, los hacen adecuados para el uso como compañeros de fusión o conjugado para moléculas terapéuticas para administración a seres humanos. Los polipéptidos de unión a albúmina según la presente descripción demuestran, por ejemplo en comparación con polipéptidos de unión a albúmina relacionados tales como el dominio de unión a albúmina G148-GA3 y los polipéptidos de unión a albúmina descritos en la solicitud de patente internacional WO09/016043, al menos cinco de las siguientes seis características:

- Los polipéptidos muestran una superficie diferente en comparación con, por ejemplo, G148-GA3 y otros dominios de unión a albúmina derivados bacterianamente. La diferencia puede disminuir o eliminar cualquier riesgo de reacciones con anticuerpos en un sujeto, tal como un ser humano, que ha sido expuesto previamente a tales proteínas bacterianas.
- Los polipéptidos comprenden menos epítopos de células T potenciales que, por ejemplo, G148-GA3 y otras variantes mutacionales relacionadas, pero diferentes, de la secuencia polipeptídica parental común, y por tanto exhiben una baja inmunogenicidad cuando se administran a un sujeto, tal como un ser humano.

- 5 • Los polipéptidos muestran una reactividad más baja con anticuerpos circulantes cuando se administran a un sujeto, tal como un ser humano. Por tanto, mediante sustituciones de aminoácidos en la superficie de los polipéptidos expuestos a anticuerpos circulantes, es decir, en la superficie del polipéptido no implicada en la interacción de unión con la albúmina, la reactividad cruzada con anticuerpos es reducida en comparación con, por ejemplo, la reactividad cruzada con anticuerpos causada por G148-GA3 medida en un juego de ensayos de sueros humanos.
- 10 • Los polipéptidos tienen una capacidad de unión a la albúmina más alta, tanto en términos de una afinidad de unión más alta, definida por un valor K_D , como en términos de una velocidad de reacción inversa más lenta, definida por un valor k_{off} , que, por ejemplo, polipéptidos de unión a albúmina naturales conocidos, tales como los dominios de unión a albúmina derivados de proteínas bacterianas.
- Los polipéptidos comprenden menos residuos de aminoácidos que están asociados con problemas de estabilidad de polipéptidos que, por ejemplo, polipéptidos de unión a albúmina naturales conocidos, tales como los dominios de unión a albúmina derivados de proteínas bacterianas. Por tanto, los polipéptidos no comprenden, por ejemplo, metioninas o triptófanos propensos a la oxidación, y sólo una asparagina.
- 15 • Los polipéptidos tienen una estabilidad estructural más alta, definida por un punto de fusión por encima de 55 °C, que polipéptidos de unión a albúmina previos, tales como los descritos en la solicitud de patente internacional WO09/016043.

20 En una realización, el polipéptido de unión a albúmina según el primer aspecto muestra las seis características enumeradas anteriormente. En otra realización, el polipéptido de unión a albúmina según el primer aspecto muestra, cuando se une a albúmina, un perfil más hidrófilo que, por ejemplo, polipéptidos de unión a albúmina previos, tales como los descritos en la solicitud de patente internacional WO09/016043. La superficie del polipéptido de unión a albúmina que es expuesta a los alrededores cuando el polipéptido interactúa con la albúmina comprende menos residuos de aminoácidos que confieren hidrofobicidad superficial.

25 Como advertirá el experto en la técnica, la función de cualquier polipéptido, tal como la capacidad de unión a albúmina de los polipéptidos según el primer aspecto, es dependiente de la estructura terciaria del polipéptido. Es posible sin embargo hacer cambios en la secuencia de aminoácidos en un polipéptido α -helicoidal sin afectar a la estructura del mismo (Taverna y Goldstein, J Mol Biol 315(3):479-84, 2002; He et al, Proc Natl Acad Sci USA 105(38):14412-17, 2008). Por tanto, las variantes modificadas de i), que sean tales que la secuencia resultante sea al menos 95 % idéntica a una secuencia que pertenece a la clase definida por i), también están abarcadas por el primer aspecto. Por ejemplo, es posible que un residuo de aminoácido que pertenezca a una cierta agrupación funcional de residuos de aminoácidos (p.ej. hidrófobos, hidrófilos, polares, etc) pueda ser intercambiado por otro residuo de aminoácido del mismo grupo funcional.

35 El término "% idéntico" o "% de identidad", como se emplea en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se calcula como sigue. La secuencia en cuestión se alinea a la secuencia diana usando el algoritmo CLUSTAL W (Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J., Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680 (1994)). Se hace una comparación sobre la ventana que corresponde a la más corta de las secuencias alineadas. La más corta de las secuencias alineadas puede ser en algunos casos la secuencia diana, tal como el polipéptido de unión a albúmina descrito en la presente memoria. En otros casos, la secuencia en cuestión puede constituir la más corta de las secuencias alineadas. La secuencia en cuestión puede consistir por ejemplo en al menos 10 residuos de aminoácidos, tal como al menos 20 residuos de aminoácidos, tal como al menos 30 residuos de aminoácidos, tal como al menos 40 residuos de aminoácidos, por ejemplo 45 residuos de aminoácidos. Los residuos de aminoácidos en cada posición son comparados, y el porcentaje de posiciones en la secuencia en cuestión que tienen correspondencias idénticas en la secuencia diana se reporta como % de identidad.

En otra realización del polipéptido de unión a albúmina según este aspecto, X_3 es S.

45 En otra realización del polipéptido de unión a albúmina según este aspecto, X_3 es E.

En otra realización del polipéptido de unión a albúmina según este aspecto, X_{14} es S.

En otra realización del polipéptido de unión a albúmina según este aspecto, X_{14} es C.

50 El polipéptido de unión a albúmina según el primer aspecto se puede preparar para la conjugación con un compañero de conjugación adecuado mediante la sustitución de residuos de aminoácidos expuestos superficialmente con, por ejemplo, una cisteína o bien una lisina. Estas sustituciones pueden ser introducidas en la hélice N-terminal, es decir, la hélice uno, del polipéptido, que es la hélice situada más lejos de la albúmina de suero cuando el polipéptido de unión a albúmina está unido a la albúmina de suero. Por tanto, se puede usar un residuo de lisina en la posición X_{14} de la secuencia definida en i) para permitir la conjugación dirigida al sitio. Esto puede ser ventajoso además cuando la molécula se prepara por síntesis química de péptidos, dado que se puede utilizar la protección ortogonal del grupo epsilon-amino de dicha lisina. Además, se puede introducir un residuo de cisteína en

55

la secuencia de aminoácidos para permitir conjugación dirigida al sitio. Por ejemplo, se puede introducir un residuo de cisteína en la posición X₁₄ de acuerdo con la definición anterior.

El acoplamiento de un compañero de conjugación a la epsilon-amina de una lisina o el grupo tiol de una cisteína representa dos alternativas químicamente diferentes para obtener conjugación dirigida al sitio usando un residuo de aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos i). Como entiende el experto en la técnica, existen otras alternativas químicas para preparar una secuencia de aminoácidos para conjugación, y están también como tales dentro del alcance de la presente descripción. Un ejemplo de tal química es la química click habilitada por la introducción de una tirosina, como presentan Ban et al (J Am Chem Soc 132:1523-5, 2009).

Las expresiones "unión a albúmina" y "afinidad de unión por albúmina", como se emplean en esta memoria descriptiva, se refieren a una propiedad de un polipéptido que puede ser ensayada por ejemplo mediante el uso de tecnología de resonancia de plasmones de superficie, tal como en un instrumento Biacore. Por ejemplo, como se describe en los ejemplos más adelante, la afinidad de unión a albúmina se puede ensayar en un experimento en el que albúmina, o un fragmento de la misma, es inmovilizada en un chip sensor del instrumento, y la muestra que contiene el polipéptido a ser ensayado se hace pasar sobre el chip. Alternativamente, el polipéptido a ser ensayado es inmovilizado en un chip sensor del instrumento, y una muestra que contiene albúmina, o un fragmento de la misma, se hace pasar sobre el chip. La albúmina puede ser, a este respecto, una albúmina de suero de un mamífero, tal como albúmina de suero humano. El experto en la técnica puede interpretar después los resultados obtenidos por tales experimentos para establecer al menos una medida cualitativa de la afinidad de unión del polipéptido por la albúmina. Si se desea una medida cuantitativa, por ejemplo para determinar un valor K_D para la interacción, también se pueden usar métodos de resonancia de plasmones. Se pueden definir valores de unión por ejemplo en un instrumento Biacore2000 (GE Healthcare). La albúmina es inmovilizada adecuadamente en un chip sensor de la medida, y se preparan por dilución en serie e inyectan muestras del polipéptido cuya afinidad se va a determinar. Los valores K_D pueden ser calculados después a partir de los resultados usando por ejemplo el modelo de unión de Langmuir 1:1 del programa informático BIAevaluation 4.1 proporcionado por el fabricante del instrumento (GE Healthcare).

En una realización, el polipéptido de unión a albúmina según este aspecto se une a la albúmina de tal modo que el valor k_{off} de la interacción es como máximo 5 x 10⁻⁵ s⁻¹, tal como 5 x 10⁻⁶ s⁻¹ como máximo.

Como se describió anteriormente, los polipéptidos de unión a albúmina definidos por la secuencia de aminoácidos i) derivan de una secuencia polipeptídica parental común que se pliega en un dominio empaquetado de tres hélices alfa. En una realización, el dominio de tres hélices de esta secuencia polipeptídica parental forma parte de la proteína G de la cepa de *Streptococcus* G148, en particular el dominio GA3.

En otra realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de unión a albúmina se selecciona de una cualquiera de SEQ ID NO:1-26, SEQ ID NO:28-29, SEQ ID NO:31-32, SEQ ID NO:34-35, SEQ ID NO:37-62, SEQ ID NO:64-65, SEQ ID NO:67-68, SEQ ID NO:70-71, SEQ ID NO:73-74, SEQ ID NO:76-77, SEQ ID NO:79-80, SEQ ID NO:82-83, SEQ ID NO:85-86, SEQ ID NO:88-89, SEQ ID NO:91-92, SEQ ID NO:94-95, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:109-110, SEQ ID NO:112-116, SEQ ID NO:118-122, SEQ ID NO:124-128, SEQ ID NO:130-133, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:164-167, SEQ ID NO:169-174, SEQ ID NO:176-181, SEQ ID NO:183-188, SEQ ID NO:190-1 y SEQ ID NO:197-203, tal como las seleccionadas de una cualquiera de SEQ ID NO:1-26, SEQ ID NO:28-29, SEQ ID NO:31-32, SEQ ID NO:34-35, SEQ ID NO:37-62, SEQ ID NO:64-65, SEQ ID NO:67-68, SEQ ID NO:70-71, SEQ ID NO:73-74, SEQ ID NO:76-77, SEQ ID NO:79-80, SEQ ID NO:82-83, SEQ ID NO:85-86, SEQ ID NO:88-89, SEQ ID NO:91-92, SEQ ID NO:94-95, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:109-110, SEQ ID NO:112-116, SEQ ID NO:118-122, SEQ ID NO:124-128, SEQ ID NO:130-133, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:139 y SEQ ID NO:143. Más específicamente, la secuencia de aminoácidos se selecciona de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:43 y SEQ ID NO:49.

En una realización, el polipéptido de unión a albúmina según este aspecto comprende además uno o más residuos de aminoácidos adicionales situados en el N y/o el C terminal de la secuencia definida en i). Estos residuos de aminoácidos adicionales pueden jugar un papel en la mejora de la unión a la albúmina por el polipéptido, y la mejora de la estabilidad conformacional del dominio de unión a albúmina plegado, pero pueden servir igualmente bien para otros fines, relacionados por ejemplo con uno o más de producción, purificación, estabilización *in vivo* o *in vitro*, acoplamiento, marcado o detección del polipéptido, así como cualquier combinación de los mismos. Tales residuos de aminoácidos adicionales pueden comprender uno o más residuo(s) de aminoácidos añadidos para fines de acoplamiento químico, p.ej. a una resina cromatográfica para obtener una matriz de afinidad, o a un resto quelante para la complejación con un radiometal.

Los aminoácidos que preceden directamente o siguen a la hélice alfa en el término N o C de la secuencia de aminoácidos i) pueden por tanto, en una realización, afectar a la estabilidad conformacional. Un ejemplo de un residuo de aminoácidos que puede contribuir a una estabilidad conformacional mejorada es un residuo de serina situado en el terminal N de la secuencia de aminoácidos i) definida anteriormente. El residuo de serina N-terminal puede, en algunos casos, formar una caja de taponación S-X-X-E canónica, implicando enlace de hidrógeno entre el oxígeno gamma de la cadena lateral de serina y el NH del ácido glutámico de la cadena principal del polipéptido.

Esta taponación N-terminal puede contribuir a la estabilización de la primera hélice alfa del dominio de tres hélices que constituye el polipéptido de unión a albúmina según el primer aspecto de la descripción.

Por tanto, en una realización, los aminoácidos adicionales comprenden al menos un residuo de serina en el N terminal del polipéptido. La secuencia de aminoácidos está, en otras palabras, precedida por uno o más residuo(s) de serina. En otra realización del polipéptido de unión a albúmina, los aminoácidos adicionales comprenden un residuo de glicina en el N terminal del polipéptido. Se entiende que la secuencia de aminoácidos i) puede estar precedida por uno, dos, tres, cuatro o cualquier número adecuado de residuos de aminoácidos. Por tanto, la secuencia de aminoácidos puede estar precedida por un único residuo de serina, un único residuo de glicina o una combinación de los dos, tal como una combinación glicina-serina (GS) o una combinación glicina-serina-serina (GSS). Se exponen ejemplos de polipéptidos de unión a albúmina que comprenden residuos amino adicionales en el N terminal en SEQ ID NO:145-163, tal como en SEQ ID NO:145-148 y SEQ ID NO:162-163. En aún otra realización, los residuos de aminoácidos adicionales comprenden un ácido glutámico en el N terminal del polipéptido definido por la secuencia i).

De manera similar, la taponación C-terminal puede ser explotada para mejorar la estabilidad de la tercera hélice alfa del dominio de tres hélices que constituye el polipéptido de unión a albúmina. Un residuo de prolina, cuando está presente en el C terminal de la secuencia de aminoácidos definida en i), puede funcionar al menos en parte como residuo taponador. En tal caso, un residuo de lisina después del residuo de prolina en el C terminal puede contribuir a una estabilización adicional de la tercera hélice del polipéptido de unión a albúmina, por enlace de hidrógeno entre el grupo epsilon amino del residuo de lisina y los grupos carbonilo de los aminoácidos ubicados dos y tres residuos antes de la lisina en la cadena principal del polipéptido, p.ej., cuando están presentes tanto L45 como P46, los grupos carbonilo de los residuos de leucina y alanina de la secuencia de aminoácidos definida en i). Por tanto, en una realización, los aminoácidos adicionales comprenden un residuo de lisina en el C terminal del polipéptido.

Como se discutió anteriormente, los aminoácidos adicionales pueden estar relacionados con la producción del polipéptido de unión a albúmina. En particular, cuando un polipéptido de unión a albúmina según una realización en la que está presente P46 se produce por síntesis química de péptidos, uno o más residuos de aminoácidos opcionales después de la prolina C-terminal pueden proporcionar ventajas. Tales residuos de aminoácidos opcionales pueden, por ejemplo, impedir la formación de sustancias indeseadas, tales como dicetopiperazina en la fase dipeptídica de la síntesis. Un ejemplo de tal residuo de aminoácidos es la glicina. Por tanto, en una realización, los aminoácidos adicionales comprenden un residuo de glicina en el C terminal del polipéptido, directamente después del residuo de prolina o después de un residuo de lisina y/o glicina adicional representado anteriormente. Alternativamente, la producción de polipéptido puede beneficiarse de la amidación del residuo de prolina C-terminal de la secuencia de aminoácidos i), cuando esté presente. En este caso, la prolina C-terminal comprende un grupo amina adicional en el carbono del carboxilo. En una realización de los polipéptidos descritos en la presente memoria, particularmente los que acaban en su término C con prolina u otro aminoácido conocido por racemizarse durante la síntesis peptídica, la adición mencionada anteriormente de una glicina al término C o amidación de la prolina, cuando esté presente, también puede contrarrestar problemas potenciales con la racemización del residuo de aminoácido C-terminal. Si el polipéptido, amidado de esta manera, se pretende producir por medios recombinantes, en lugar de por síntesis química, la amidación del aminoácido C-terminal puede ser realizada por varios métodos conocidos en la técnica, p.ej. mediante el uso de enzima PAM de amidación.

Se exponen ejemplos de polipéptidos de unión a albúmina que comprenden residuos de aminoácidos adicionales en el C terminal en SEQ ID NO:145-152, tales como en SEQ ID NO:148-150. El experto en la técnica conoce métodos para llevar a cabo modificación C-terminal, tal como mediante diferentes tipos de matrices pre-preparadas para síntesis peptídica.

En otra realización, los residuos de aminoácidos adicionales comprenden un residuo de cisteína en el N y/o C terminales del polipéptido. Tal residuo de cisteína puede preceder directamente y/o seguir a la secuencia de aminoácidos definida en i), o puede preceder y/o seguir a cualesquiera otros residuos de aminoácidos adicionales descritos anteriormente. Se exponen ejemplos de polipéptidos de unión a albúmina que comprenden un residuo de cisteína en el N y/o C de la cadena polipeptídica en SEQ ID NO:149-150 (C-terminal) y SEQ ID NO:151-152 (N-terminal). Mediante la adición de un residuo de cisteína a la cadena polipeptídica, se puede obtener un grupo tiol para conjugación dirigida al sitio del polipéptido de unión a albúmina. Alternativamente, se puede introducir un residuo de selenocisteína en el C terminal de la cadena polipeptídica, de un modo similar a la introducción de un residuo de cisteína, para facilitar la conjugación específica al sitio (Cheng et al, Nat Prot 1:2, 2006).

En una realización, el polipéptido de unión a albúmina comprende no más que dos residuos de cisteína. En otra realización, el polipéptido de unión a albúmina comprende no más que un residuo de cisteína.

En otra realización, los residuos de aminoácidos adicionales del polipéptido de unión a albúmina comprenden una etiqueta para la purificación o detección del polipéptido, tal como una etiqueta de hexahistidilo (His₆), o una etiqueta "myc" ("c-Myc") o una etiqueta "FLAG para la interacción con anticuerpos específicos a la etiqueta y/o para ser usados en purificación. El experto en la técnica conoce otras alternativas.

En aún otra realización, el polipéptido de unión a albúmina según este aspecto se une a albúmina de suero humano. En otras realizaciones, el polipéptido de unión a albúmina se une a albúmina de otras especies distintas a la especie humana, tal como albúmina de ratón, rata, perro y macacos cinomolgos.

- 5 Los residuos de aminoácidos adicionales discutidos anteriormente también pueden constituir uno o más dominio(s) polipeptídicos con cualquier función deseada, tal como la misma función de unión que el primer dominio de unión a albúmina, u otra función de unión, o una función terapéutica, o una función enzimática, o una función fluorescente, o mezclas de las mismas.

Se proporciona por consiguiente, en otro aspecto relacionado, una proteína de fusión o conjugado que comprende

- 10 i) un primer resto que consiste en un polipéptido de unión a albúmina según el primer aspecto descrito en la presente memoria; y
ii) un segundo resto que consiste en un polipéptido que tiene una actividad biológica deseada.

- 15 Una proteína de fusión o conjugado que comprende un polipéptido de unión a albúmina según el primer aspecto de la descripción y un segundo resto pueden aumentar la semivida *in vitro* y/o *in vivo* del segundo resto, en comparación con la semivida *in vivo* del segundo resto *per se*. Como consecuencia, cuando una proteína de fusión o conjugado según este aspecto se administra a un sujeto, tal como un sujeto humano, la exposición *in vivo* al segundo resto puede aumentar, lo que puede conducir a una potencia mejorada de la actividad biológica del segundo resto, en comparación con la potencia de la exposición *in vivo* del segundo resto cuando se administra por sí mismo.

- 20 La actividad biológica deseada puede ser, por ejemplo, una actividad terapéutica, una actividad de unión o una actividad enzimática. Cuando la actividad biológica deseada es una actividad terapéutica, el segundo resto que muestra esta actividad puede ser un polipéptido terapéuticamente activo. Son ejemplos no limitantes de polipéptidos terapéuticamente activos biomoléculas, tales como moléculas seleccionadas del grupo que consiste en enzimas endógenas humanas, hormonas, factores de crecimiento, quimiocinas, citocinas y linfocinas, y proteínas biológicamente activas no humanas, tales como proteínas seleccionadas del grupo que consiste en toxinas bacterianas (p.ej. exotoxina de pseudomonas y superantígenos estafilocócicos y estreptocócicos), enzimas (p.ej. RNasa y beta-lactamasa) y proteínas activadoras (p.ej. estreptocinas). Ejemplos no limitantes de biomoléculas terapéuticamente activas que pueden mostrarse útiles en una fusión o un conjugado con el polipéptido de unión a albúmina se seleccionan del grupo que consiste en IL-2, GLP-1, BNP (Alb-beta-péptido natriurético), IL-1-RA (antagonista del receptor de interleucina-1), KGF (factor de crecimiento de queratinocitos), Stemgen®, hormona de crecimiento (GH), G-CSF, CTLA-4, miostatina, Factor VII, Factor VIII y Factor IX.

- 35 Los vasos sanguíneos de tejido tumoral defectivos con fugas hacen que su vasculatura (barrera endotelial) sea permeable para macromoléculas, mientras que en vasos sanguíneos de tejido sano sólo pueden pasar moléculas pequeñas por la barrera endotelial. Asimismo, la permeabilidad de la barrera de sangre-articulación para albúmina en articulaciones inflamadas de pacientes con artritis reumatoide está notablemente aumentada. Por tanto, es probable que las proteínas de fusión o conjugados según este aspecto permeen los vasos sanguíneos en tejido tumoral y la barrera sangre-articulación en articulaciones inflamadas.

- 40 Cuando dicha actividad biológica deseada del segundo resto es una actividad de unión, dicho segundo resto puede ser un polipéptido de unión capaz de realizar una interacción selectiva con una molécula diana. Tal polipéptido de unión se puede seleccionar por ejemplo del grupo que consiste en anticuerpos y fragmentos y dominios de los mismos que retienen sustancialmente actividad de unión a anticuerpos; microcuerpos, maxicuerpos, avímeros y otras proteínas pequeñas unidas a disulfuro; y proteínas de unión derivadas de un andamio seleccionado del grupo que consiste en proteína A de estafilococo y dominios de la misma, otros dominios de tres hélices, lipocalinas, dominios de repetición de anquirina, dominios de unión a celulosa, cristalinos y, proteína verde fluorescente, antígeno 4 citotóxico asociado con linfocitos T humanos, inhibidores de proteasa tales como dominios Kunitz, dominios PDZ, dominios SH3, aptámeros peptídicos, nucleasa estafilocócica, tendamistatos, dominio de fibronectina tipo III, transferrina, dedos de cinc y conotoxinas.

- 50 En algunas realizaciones, la molécula diana para la unión de dicho polipéptido de unión diana se puede seleccionar del grupo que consiste en péptido amiloide β (A β) de la enfermedad de Alzheimer; otros péptidos amiloides asociados a enfermedades; toxinas, tales como toxinas bacterianas y venenos de serpientes; factores de la coagulación de la sangre, tales como factor de von Willebrand; interleucinas, tales como IL-13; miostatina; factores pro-inflamatorios, tales como TNF- α , receptor de TNF- α , IL-1, IL-8 y IL-23; factores del complemento, tales como C3 y C5; mediadores de la hipersensibilidad, tales como histamina y IgE; antígenos relacionados con tumores, tales como CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD40, CD52, CD70, cMet, HER1, HER2, HER3, HER4, CAIX (anhidrasa carbónica IX), CEA, receptor de IL-2, MUC1, PSMA, TAG-72; y otras moléculas biológicas tales como G-CSF, GM-CSF, hormona de crecimiento (GH), insulina y somatostatina.

Como entiende el experto en la técnica, el polipéptido de unión a albúmina según el primer aspecto puede ser útil en una proteína de fusión o como un compañero conjugado a cualquier otro resto. Por lo tanto, las listas anteriores de

polipéptidos terapéuticamente activos, polipéptidos de unión y moléculas diana no deben ser interpretadas como limitantes de ninguna manera.

En una realización de una proteína de fusión o conjugado según la presente descripción, el segundo resto se conjuga al polipéptido de unión a albúmina por medio de un residuo de lisina o cisteína añadido al N o C terminal del polipéptido de unión a albúmina o por medio de un residuo de lisina o cisteína en una posición dentro del polipéptido de unión a albúmina, tal como en una posición seleccionada de X₃, X₆ y X₁₄. Si el sitio de conjugación es uno dentro de la secuencia de aminoácidos i) del polipéptido de unión a albúmina, tal como una cisteína en la posición X₁₄, no se necesita añadir aminoácidos adicionales al polipéptido de unión a albúmina para el fin de permitir la conjugación al segundo resto. Un sitio de conjugación dentro de la cadena de polipéptido definida por i) puede proteger además al polipéptido contra anticuerpos de reacción cruzada, en particular la porción del polipéptido cercana al sitio de conjugación. Sin desear estar atado por la teoría, cuando el conjugado, por medio del polipéptido de unión a albúmina, se une a albúmina de suero *in vivo*, es decir, se sitúa en el saco de unión de la albúmina de suero, el segundo resto, conjugado en una posición dentro de, por ejemplo, la hélice uno del dominio de tres hélices que constituye el polipéptido de unión a albúmina, es probable que apunte lejos de la albúmina de suero a la que el polipéptido de unión a albúmina está unido. Además, un sitio de conjugación dentro del polipéptido de unión a albúmina puede afectar a la presentación de la porción de los péptidos derivados por lo demás de esta porción del polipéptido a linfocitos T debido a, por ejemplo, efectos sobre el proceso en la célula presentadora de antígenos, ajuste afectado de péptidos potenciales en la zona de unión a péptidos de la molécula MCH clase II, y superficie del péptido remodelada disponible para el receptor de linfocitos T (debido a la porción conjugada que sobresale). Por tanto, se espera que la inmunogenicidad de la porción del conjugado cerca del sitio de conjugación llegue a reducirse más después de la conjugación.

Debido a la alta afinidad entre el polipéptido de unión a albúmina de la presente descripción y la albúmina de suero, un conjugado o proteína de fusión que comprenda tal polipéptido de unión a albúmina podría ser considerado como un complejo indirecto con la albúmina de suero. Un conjugado o una proteína de fusión según la presente descripción proporciona por tanto una alternativa al método frecuentemente usado de explotar conjugados directos o fusiones con albúmina de suero. Tales conjugados directos con albúmina de suero son frecuentemente inhomogéneos, independientemente de qué método se use para el acoplamiento. Cuando una molécula específica se acopla a albúmina de suero por medio de un grupo amino de un residuo de lisina, puede ser accedida una cualquiera de un gran número de lisinas en la superficie de la molécula de albúmina de suero, lo que da un sitio de conjugación aleatorio y un producto aleatorio. Aunque el acoplamiento de tiol por medio de la cisteína desapareada sola en la albúmina de suero humano (en la posición 34, Peters, 1985, arriba) parece ofrecer un método alternativo para obtener un conjugado directo, tal metodología frecuentemente no conduce a un producto homogéneo. Sólo el 20-60 % de las moléculas en la albúmina de suero (humano) disponibles en el mercado muestran un grupo tiol libre, mientras que el resto están bloqueadas por compuestos de tiol tales como cisteína, homocisteína o glutatión. En contraste, la conjugación al dominio de tres hélices del polipéptido de unión a albúmina según la presente descripción puede ser realizada de manera específica al sitio. Esto se puede llevar a cabo, como se discutió anteriormente, bien por acoplamiento a una o más cisteínas, a una selenocisteína, o a una lisina designada (protegida ortogonalmente durante la síntesis).

Según este aspecto de la presente descripción, el segundo resto que tiene la actividad biológica deseada puede ser conjugado al dominio de tres hélices del polipéptido de unión a albúmina o bien ser producido como una proteína de fusión con el mismo. Un ejemplo no limitante de un conjugado según la presente descripción se da más adelante. El péptido similar a glucagón 1 (GLP-1), o un derivado del mismo, es un polipéptido pequeño que puede estar presente adecuadamente como segundo resto en un conjugado con el polipéptido de unión a albúmina. La conjugación de GLP-1 al polipéptido de unión a albúmina se puede realizar en una cualquiera de las posiciones de la secuencia del polipéptido descrita anteriormente. El conjugado se puede producir como tal en un procedimiento no biológico, y se espera que muestre una potencia significativamente mejorada en comparación con la potencia del GLP-1 *per se*. La conjugación se puede emplear tanto con polipéptidos o proteínas pequeños, tales como GLP-1, como con polipéptidos o proteínas más grandes. Un conjugado según la presente descripción puede comprender típicamente un resto espaciador no de aminoácido, tal como polietilenglicol (PEG).

Se pueden combinar otros polipéptidos o proteínas con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de unión a albúmina en la forma de una proteína de fusión. Tal proteína de fusión puede comprender además uno o más residuos de aminoácidos espaciadores entre el primer y segundo restos.

Como se describió anteriormente, el polipéptido de unión a albúmina según el primer aspecto se une a albúmina de suero de varias especies, que incluyen ratón, rata, perro y macacos cinomolgos. Por tanto, una proteína de fusión o conjugado según la presente descripción puede contribuir a mejorar el efecto biológico de un segundo resto, no sólo en un sujeto humano, sino también en modelos animales. Se han producido varias proteínas endógenas como fusiones directas con albúmina de suero humano, ejemplos de tales proteínas incluyen G-CSF, GH, interferones, CD4, IL-2, insulina, glucagón, GLP-1, fragmentos Fab de anticuerpos e inhibidores de proteasa como proteínas derivadas del dominio Kunitz. Tales fusiones directas pueden sin embargo no estar evaluadas totalmente en modelos animales. Esto es debido al hecho de que la albúmina de suero humano no interactúa apropiadamente con el receptor neonatal Fc endógeno (FcRn), p.ej. en los modelos animales usados habitualmente de ratón y rata, y de que esta interacción es un factor importante que contribuye al largo tiempo de circulación de la albúmina de suero.

Como se describió anteriormente, un conjugado o una proteína de fusión según la presente descripción puede, en presencia de albúmina de suero, combinarse con albúmina y funcionar como una fusión indirecta con albúmina. Esto hace a un conjugado o una proteína de fusión que comprende un polipéptido de unión a albúmina según el primer aspecto útil en modelos de especies preclínicos, a condición de que el segundo resto sea biológicamente activo en las especies seleccionadas.

En una realización, se proporciona una proteína de fusión o conjugado que comprende un resto adicional que consiste en un polipéptido que tiene una actividad biológica deseada adicional, que puede ser la misma que o diferente de la del segundo resto. Un ejemplo específico de tal proteína de fusión o conjugado comprende un polipéptido terapéuticamente eficaz definido anteriormente como segundo resto y un polipéptido de unión definido anteriormente como resto adicional.

Con respecto a la descripción anterior de proteínas de fusión o conjugados que incorporan un polipéptido de unión a albúmina según el primer aspecto, es de advertir que la designación del primer, segundo y más restos se hace por razones de claridad para distinguir entre polipéptido o polipéptidos de unión a albúmina según la presente descripción por una parte, y restos que exhiben otras funciones por otra parte. Estas designaciones no pretenden hacer referencia al orden real de los diferentes dominios en la cadena polipeptídica de la proteína de fusión o conjugado. Así, por ejemplo, dicho primer resto puede, sin restricción, aparecer en el extremo N-terminal, en el centro, o en el extremo C-terminal de la proteína de fusión o conjugado.

En un aspecto relacionado, se proporciona un polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado definido en la presente descripción, que comprende además una molécula orgánica, tal como un agente citotóxico. Ejemplos no limitantes de agentes citotóxicos que se pueden fusionar o conjugar a un polipéptido de unión a albúmina según el primer aspecto, o combinar con una proteína de fusión o conjugado según el segundo aspecto, se seleccionan de calicheamicina, auristatina, doxorubicina, maitansinoide, taxol, ecteinascidina, geldanamycin, metotrexato y sus derivados, y combinaciones de los mismos. Previamente, se han hecho intentos para tratar diversos trastornos con conjugados de albúmina directos. Tales conjugados de albúmina directos han sido explotados p.ej. con doxorubicina en el cáncer (Kratz et al, J Med Chem 45: 5523-33, 2002) y metotrexato en la artritis reumatoide (Wunder et al, J Immunol 170:4793-801, 2003). Es de entender que el polipéptido de unión a albúmina, bien por sí mismo o bien como resto en una proteína de fusión o conjugado, mediante su alta capacidad de unión a la albúmina, proporciona medios indirectos para construir complejos de albúmina, y por tanto puede proporcionar un método de tratamiento alternativo en comparación con los intentos mencionados anteriormente.

Los aspectos anteriores abarcan además polipéptidos en los que el polipéptido de unión a albúmina según el primer aspecto, o el polipéptido de unión a albúmina comprendido en una proteína de fusión o conjugado según el segundo aspecto, ha sido dotado de un grupo marcador, tal como una etiqueta seleccionada del grupo que consiste en colorantes fluorescentes y metales, colorantes cromofóricos, compuestos quimioluminiscentes y proteínas bioluminiscentes, enzimas, radionúclidos y partículas, por ejemplo para fines de detección del polipéptido. En particular, la descripción abarca un polipéptido radiomarcado que consiste en un radioquelato de un polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado descrito en la presente memoria y un radionúclido, tal como un metal radioactivo.

En realizaciones donde el polipéptido de unión a albúmina marcado comprende un polipéptido de unión a albúmina según el primer aspecto de la descripción y una etiqueta, el polipéptido marcado se puede usar por ejemplo para marcar albúmina de suero indirectamente. Debido a la fuerte asociación entre el polipéptido marcado y la albúmina de suero, el polipéptido marcado se puede usar por ejemplo para estudiar la permeabilidad vascular y la acumulación de sangre.

En otras realizaciones, el polipéptido de unión a albúmina marcado está presente como un resto en una proteína de fusión o conjugado que comprende también un segundo resto que tiene una actividad biológica deseada. La etiqueta puede en algunos casos estar acoplada sólo al polipéptido de unión a albúmina, y en algunos casos tanto al polipéptido de unión a albúmina como al segundo resto del conjugado o proteína de fusión. Cuando se hace referencia a un polipéptido marcado, esto debe entenderse como una referencia a todos los aspectos de los polipéptidos descritos en la presente memoria, incluyendo proteínas de fusión y conjugados que comprenden un polipéptido de unión a albúmina y un segundo y opcionalmente adicionales restos. Por tanto, un polipéptido marcado puede contener sólo el polipéptido de unión a albúmina y p.ej. un radionúclido terapéutico, que puede estar quelado o acoplado covalentemente al polipéptido de unión a albúmina, o contener el polipéptido de unión a albúmina, un radionúclido terapéutico y un segundo resto tal como una molécula pequeña que tiene una actividad biológica deseada tal como eficacia terapéutica.

En realizaciones donde el polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado esté radiomarcado, tal polipéptido radiomarcado puede comprender un radionúclido. Una mayoría de radionúclidos tienen una naturaleza metálica, y los metales son típicamente incapaces de formar enlaces covalentes estables con los elementos presentados en las proteínas y péptidos. Por esta razón, el marcado de proteínas y péptidos con metales radioactivos se realiza con el uso de queladores, es decir, ligandos multidentados, que forman compuestos no covalentes, llamados quelatos, con los iones del metal. En una realización del polipéptido de unión a albúmina,

proteína de fusión o conjugado, la incorporación de un radionúclido se posibilita mediante la provisión de un entorno quelante, mediante el cual el radionúclido puede ser coordinado, quelado o complejado al polipéptido.

Un ejemplo de un quelador es el tipo de quelador poliaminopolicarboxilato. Se pueden distinguir dos clases de tales queladores de poliaminopolicarboxilato: queladores macrocíclicos y acíclicos. En una realización, el polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado comprende un entorno quelante proporcionado por un quelador de poliaminopolicarboxilato conjugado al polipéptido de unión a albúmina por medio de un grupo tiol de un residuo de cisteína o un grupo epsilon amina de un residuo de lisina.

Los queladores macrocíclicos usados más habitualmente para radioisótopos de indio, galio, ytrio, bismuto, radioactínidos y radiolantánidos son diferentes derivados de DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético). En una realización, el entorno quelante del polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado es proporcionado por DOTA o un derivado del mismo. Más específicamente, un grupo de polipéptidos quelantes abarcado por la presente descripción se prepara haciendo reaccionar el derivado de 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris-ácido acético-10-maleimidoetilacetamida (maleimidomonoamida-DOTA) con, por ejemplo, un grupo tiol del polipéptido de unión a albúmina, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 5.

La alta inercia cinética, es decir, la lenta velocidad de disociación de metal de DOTA, favorece la unión estable de un radionúclido. Sin embargo, se requieren temperaturas elevadas para el marcado, debido a una baja velocidad de asociación. Por esta razón, los derivados de DOTA se usan ampliamente para el marcado de péptidos cortos, tales como los polipéptidos de unión a albúmina de la presente descripción, que muestran funcionalidad de unión después de la incubación a las temperaturas requeridas para la reacción de marcado.

Los queladores de poliaminopolicarboxilato acíclico usados más habitualmente son diferentes derivados de DTPA (ácido dietilentriamina-pentaacético). Por tanto, polipéptidos que tienen un entorno quelante proporcionado por ácido dietilentriaminapentaacético o derivados del mismo también están abarcados por la presente descripción.

Se ha encontrado que variantes de DTPA semirrígidas de cadena principal modificada proporcionan una estabilidad adecuada para el marcado con ^{90}Y de p.ej. Zevalin[®]. Aunque los queladores acíclicos son menos inertes, y por consiguiente, menos estables que los macrocíclicos, su marcado es suficientemente rápido incluso a temperatura ambiente. Por esta razón, se podrían usar para el marcado de proteínas de fusión o conjugados según la presente descripción. Protocolos detallados para el acoplamiento de queladores de poliaminopolicarboxilato para acceder a proteínas y péptidos han sido publicados por Cooper et al (Nat Prot 1: 314-7, 2006) y por Sosabowski y Mather (Nat Prot 1:972-6, 2006).

Se puede usar un polipéptido de unión a albúmina, una proteína de fusión o conjugado según los aspectos descritos en la presente memoria acoplado a un quelador de poliaminopolicarboxilato para proporcionar un polipéptido radiomarcado que consiste en un radioquelato del polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado acoplado al quelador y un radionúclido adecuado para la obtención de imágenes médicas, siendo el radionúclido seleccionado del grupo que consiste en ^{61}Cu , ^{64}Cu , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , $^{110\text{m}}\text{In}$, ^{111}In , ^{44}Sc y ^{86}Y , o con un radionúclido adecuado para terapia, siendo el radionúclido seleccionado del grupo que consiste en ^{225}Ac , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{67}Cu , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{212}Pb , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{227}Th y ^{90}Y , en donde el radionúclido está complejado con el polipéptido de unión a albúmina por medio de un quelador.

En realizaciones del mismo, el polipéptido también puede ser radiomarcado con radioisótopos no metálicos usando el llamado marcado indirecto. Por tanto, para marcar con por ejemplo ^{18}F , ^{76}Br , diferentes isótopos de yodo y ^{211}At , se usan "moléculas enlazantes" intermedias para el marcado. Tal molécula enlazante debe contener dos restos funcionales, uno que proporciona un radiomarcado rápido y eficaz, y otro que permite un acoplamiento rápido y eficaz a las proteínas, p.ej. a grupos amina, o preferiblemente al grupo tiol de una única cisteína, tal como en la posición X₁₄ del polipéptido de unión a albúmina. Por ejemplo un grupo maleimida reacciona con grupos tiol para formar un enlace tioéter estable. La "molécula enlazante" puede ser hecha reaccionar primero con la radiomarca y posteriormente con el grupo tiol o selenotiol de la proteína.

En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de unión a albúmina o una proteína de fusión descrito en la presente memoria. También está abarcado un método para producir un polipéptido de unión a albúmina o una proteína de fusión descrito anteriormente, que comprende expresar el polinucleótido, un vector de expresión que comprende el polinucleótido y una célula huésped que comprende el vector de expresión.

El polipéptido de unión a albúmina de la presente descripción se puede producir alternativamente por síntesis de péptidos no biológicos usando aminoácidos y/o derivados de aminoácidos que tienen cadenas laterales reactivas protegidas, comprendiendo la síntesis de péptidos no biológicos

acoplamiento por etapas de los aminoácidos y/o los derivados de aminoácidos para formar un polipéptido según el primer aspecto que tiene cadenas laterales reactivas protegidas,

retirada de los grupos protectores de las cadenas laterales reactivas del polipéptido, y

plegado del polipéptido en disolución acuosa.

Así, se usan aminoácidos normales (p.ej. glicina, alanina, fenilalanina, isoleucina, leucina y valina) y derivados de aminoácidos preprotegidos para construir secuencialmente una secuencia de polipéptido, en disolución o sobre un soporte sólido en un disolvente orgánico. Se describe un ejemplo específico de síntesis de péptidos sobre soporte sólido en el Ejemplo 5. Cuando se construye una secuencia de polipéptido completa, los grupos protectores se retiran y se deja que el polipéptido se pliegue en una disolución acuosa. Cada polipéptido según la presente descripción se pliega de manera reversible en un dominio empaquetado de tres hélices sin factores añadidos, y por tanto se pliega espontáneamente.

El conjugado según el segundo aspecto se puede producir por un método que comprende producir un polipéptido de unión a albúmina según cualquiera de los métodos descritos anteriormente, tal como por síntesis peptídica no biológica, y conjugar el polipéptido de unión a albúmina producido con un segundo y/o más restos definidos en relación con el segundo aspecto.

En una realización de una proteína de fusión o conjugado, se proporciona además una proteína de fusión o conjugado definido en la presente memoria para uso en terapia, p.ej. para uso como medicamento. Tal proteína de fusión o conjugado puede exhibir una semivida *in vivo* que es más larga que la semivida *in vivo* del polipéptido que tiene una actividad biológica deseada *per se*. La proteína de fusión o conjugado puede incitar además una respuesta inmune reducida o ninguna tras su administración al mamífero, tal como un ser humano, en comparación con la respuesta inmune incitada tras la administración al mamífero del polipéptido que tiene una actividad biológica deseada *per se*. Hablando de manera alternativa, esto proporciona un método para disminuir la inmunogenicidad de un polipéptido que tiene una actividad biológica deseada, mediante la fusión o conjugación de tal polipéptido a un polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado según aspectos descritos en la presente memoria. Además, esto puede permitir la mejora de la actividad biológica de un segundo resto.

En otra realización, se proporciona una proteína de fusión o conjugado según la presente descripción, para uso en diagnóstico, p.ej. para uso como agente diagnóstico.

La presente descripción también se refiere a diferentes aspectos del uso del polipéptido de unión a albúmina descrito anteriormente, así como diversos métodos para el tratamiento, diagnóstico y detección en los que el polipéptido es útil debido a su unión y otras características. Cuando se hace referencia al "polipéptido de unión a albúmina" en la siguiente descripción de estos usos y métodos, este término pretende abarcar el polipéptido de unión a albúmina solo, pero también todas aquellas moléculas basadas en este polipéptido descrito anteriormente que p.ej. incorporen el polipéptido de unión a albúmina como resto en una proteína de fusión o conjugado, y/o esté conjugados a una etiqueta, un quelador, un agente terapéutico y/o diagnóstico y/o estén dotados de residuos de aminoácidos adicionales como una etiqueta o para otros fines. Como se explicó anteriormente, tales proteínas de fusión, derivados, etc. forman una parte de la presente descripción.

Otro conjunto de aspectos se refieren a la provisión de nuevos medios para aumentar la solubilidad en disolución acuosa de un compuesto escasamente soluble, mediante la conjugación del mismo a un polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado. El complejo resultante del compuesto escasamente soluble y un polipéptido de unión a albúmina, solo o incorporado como resto en una proteína de fusión o conjugado, es capaz de asociarse con albúmina *in vivo* o *in vitro*, asociación que aumenta la solubilidad en disolución acuosa. Por tanto, en una realización de este aspecto adicional, se proporciona una composición, que comprende

un compuesto que *per se* tiene una solubilidad en agua de no más que 100 µg/ml; acoplado a

un polipéptido de unión a albúmina, una proteína de fusión o conjugado descrito en la presente memoria, en donde el compuesto y el polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado están acoplados covalentemente.

En una realización, el compuesto *per se* tiene una solubilidad de no más que 10 µg/ml. En aún otra realización, dicha solubilidad es no más que 1 µg/ml.

En algunas realizaciones, el compuesto puede ser un compuesto farmacéuticamente activo, por ejemplo un agente citotóxico. Ejemplos no limitantes de agentes citotóxicos son los seleccionados de calicheamicina, auristatina, doxorubicina, maitansinoide, taxol, ecteinascidina, geldanamicina y sus derivados, y combinaciones de los mismos. Alternativamente, el agente citotóxico puede ser una quimiotoxina sintética preparada por síntesis orgánica y no derivada de un compuesto existente en la naturaleza.

Además del compuesto escasamente soluble y el polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado, la composición según este aspecto de la descripción puede comprender también, en algunas realizaciones, un polipéptido de unión con una afinidad por una diana clínicamente relevante. Este polipéptido de unión es adecuadamente diferente del polipéptido de unión a albúmina, y se puede acoplar no covalentemente o covalentemente a los otros componentes de la composición inventiva. Como ejemplos no limitantes, el polipéptido de unión con una afinidad por una diana clínicamente relevante se puede seleccionar del grupo que consiste en anticuerpos y fragmentos y dominios de los mismos que retengan sustancialmente actividad de unión de anticuerpo; microcuerpos, maxicuerpos, avímeros y otras proteínas pequeñas unidas a disulfuro; y proteínas de unión derivadas de un andamio seleccionado del grupo que consiste en proteína A de estafilococo y dominios de la misma, otros dominios de tres hélices, lipocalinas, dominios de repetición de anquirina, dominios de unión a celulosa, cristalinós y,

proteína verde fluorescente, antígeno 4 citotóxico asociado con linfocitos T humanos, inhibidores de proteasa tales como dominios Kunitz, dominios PDZ, dominios SH3, aptámeros peptídicos, nucleasa estafilocócica, tendamistatos, dominio de fibronectina tipo III, transferrina, dedos de cinc y conotoxinas.

La composición según el aspecto anterior de la presente descripción tiene una capacidad para asociarse con albúmina *in vivo* o *in vitro*, mediante la provisión en la composición de un polipéptido de unión a albúmina, por sí mismo o presente en una proteína de fusión o conjugado. En ciertos casos, puede ser beneficioso formar un complejo de la composición con albúmina fuera de un organismo vivo, es decir, añadir albúmina exógena a la composición. Tal composición puede ser liofilizada, proporcionando una formulación que es adecuada para un almacenamiento a temperatura ambiente. Por tanto, la presente descripción también proporciona una composición definida anteriormente que comprende además albúmina, tal como albúmina de suero humano.

La presente descripción también proporciona la composición según el aspecto anterior para uso como medicamento, es decir, para uso en terapia, en los casos donde el compuesto sea un compuesto terapéuticamente activo. Adecuadamente, la provisión de un polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado y opcionalmente albúmina no afecta de manera perjudicial a la eficacia terapéutica del compuesto activo, con lo que la composición inventiva será útil en aquellos ajustes terapéuticos o profilácticos donde esté indicado el compuesto *per se*.

En otra realización, se proporciona la composición según el aspecto anterior para uso como agente diagnóstico, es decir, para uso en diagnóstico.

Un aspecto relacionado de la presente descripción proporciona un método de preparación de una composición como la descrita inmediatamente antes. El método comprende

proporcionar un compuesto que *per se* tiene una solubilidad en agua de no más que 100 µg/ml; y

acoplar covalentemente el compuesto a un polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado según los aspectos descritos en la presente memoria, formando así una composición que comprende un complejo covalente de compuesto y polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado.

En realizaciones de la presente descripción donde se incluye albúmina en la composición, el método puede comprender la etapa adicional de mezclar dicho complejo de compuesto y polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado con albúmina, formando así una composición que comprende un complejo no covalente de i) el complejo covalente de compuesto y polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado, y ii) albúmina. Las proporciones relativas de los dos componentes de este complejo no covalente pueden ser por ejemplo 1:1, con lo que una unidad del complejo de compuesto escasamente soluble y polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado está asociada con una molécula de albúmina. En una realización, el método comprende adicionalmente liofilizar el complejo no covalente para obtener una composición liofilizada.

En otro aspecto estrechamente relacionado, la presente descripción proporciona un método para aumentar la solubilidad acuosa de un compuesto, que comprende

proporcionar un compuesto que *per se* tiene una solubilidad en agua de no más que 100 µg/ml;

acoplar covalentemente el compuesto a un polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado según los aspectos descritos en la presente memoria, formando así un complejo covalente de compuesto y polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado; y

mezclar dicho complejo de compuesto y polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado con albúmina bajo condiciones que promuevan la asociación no covalente del polipéptido de unión a albúmina con albúmina;

por lo que la solubilidad en agua del compuesto en dicho complejo es mayor que la solubilidad en agua del compuesto *per se*.

En estos aspectos del método concernientes a la solubilidad de un compuesto escasamente soluble, los rasgos opcionales de los diversos componentes son como se describen en relación con el aspecto de la composición inmediatamente precedente.

Aunque la invención ha sido descrita con referencia a diversas realizaciones ilustrativas, los expertos en la técnica entenderán que se pueden hacer diversos cambios, y los equivalentes pueden ser sustituidos por elementos de los mismos sin apartarse del alcance de la invención. Además, se pueden hacer muchas modificaciones para adaptar una situación o molécula particular a las enseñanzas de la invención sin apartarse del alcance esencial de la misma. Por lo tanto, se pretende que la invención no se limite a ninguna realización particular contemplada para llevar a cabo esta invención, sino que la invención incluya todas las realizaciones que caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Figuras

La Figura 1 es un listado de las secuencias de aminoácidos de ejemplos de polipéptidos de unión a albúmina de la presente descripción (SEQ ID NO:1-152, SEQ ID NO:155-203), el dominio GA3 de la proteína G de la cepa de *Streptococcus* G148 extendido por un residuo de glicina N-terminal (SEQ ID NO:153) y un polipéptido de unión a albúmina derivado de G148-GA3 como describieron previamente Jonsson *et al* (arriba, SEQ ID NO:154).

La Figura 2 muestra el resultado del análisis de unión realizado en un instrumento Biacore para investigar la unión del polipéptido de unión a albúmina PEP07912 (SEQ ID NO:157) a albúmina de suero humano. Se inyectaron tres concentraciones diferentes de proteína purificada (40 nM, línea gris gruesa; 10 nM, línea negra; y 2,5 nM, línea gris) sobre una superficie con 955 UR de albúmina de suero humano inmovilizada.

Las Figuras 3A-C muestran el resultado del análisis de unión realizado por ELISA para investigar la unión de los polipéptidos de unión a albúmina PEP07913 (SEQ ID NO:153), PEP06923 (SEQ ID NO:154), PEP07271 (SEQ ID NO:155), PEP07912 (SEQ ID NO:157), PEP07554 (SEQ ID NO:156), PEP07914 (SEQ ID NO:158), PEP07968 (PEP07911 conjugado con DOTA, SEQ ID NO:159) y PEP07844 (SEQ ID NO:161), a moléculas IgG presentes en sueros de 126 individuos humanos normales, donde A) muestra el valor OD medio, B) muestra el porcentaje de sueros negativos (definidos como OD < 0,15), y C) muestra el porcentaje de sueros positivos (definidos como OD > 1,0).

Las Figuras 4A-B son cromatogramas que muestran el análisis del polipéptido de unión a albúmina producido químicamente, purificado, PEP07834 (SEQ ID NO:160), donde A) muestra la señal de absorbancia a 220 nm, blanco restado, y B) muestra la señal de absorbancia a 280 nm, blanco restado. Aparecieron dos picos a ambas longitudes de onda.

Las Figuras 5A-B son espectrogramas que muestran el análisis espectrométrico de masas de los dos picos identificados en la Figura 4A) y B). A) es el espectrograma del primer pico, es decir, el monómero de PEP07834 (SEQ ID NO:160) y B) es el espectrograma del dímero de PEP07834.

Las Figuras 6A-C son diagramas que muestran una evaluación de inmunogenicidad de los polipéptidos de unión a albúmina PEP07913 (SEQ ID NO:153), PEP07912 (SEQ ID NO:157), PEP07914 (SEQ ID NO:158) y PEP07968 (PEP07911 conjugado con DOTA, SEQ ID NO:159) en un ensayo de proliferación de linfocitos T CD3⁺ CD4⁺. A) muestra el número de individuos que responden a los polipéptidos de unión a albúmina en comparación con albúmina humana recombinante en una cohorte de 52 donantes caucásicos. B) muestra los índices de estimulación medios (SI) para PEP07913, PEP07912, PEP07914 y PEP07968 en comparación con el control negativo que contiene albúmina humana recombinante. C) muestra el número de individuos que responden contra todas las proteínas en el estudio en comparación con el tampón de control.

Las Figuras 7A-C muestran el resultado del análisis de unión realizado en un instrumento Biacore para investigar la unión de los polipéptidos de unión a albúmina A) PEP07986 (SEQ ID NO:163), B) PEP08296 (PEP08185 conjugado con DOTA, SEQ ID NO:148) y C) PEP06923 (SEQ ID NO:154) a albúmina de diferentes especies. Los sensogramas mostrados corresponden a proteína inyectada a una concentración de 40 nM sobre superficies inmovilizadas con albúmina de ser humano (1130 UR), línea gris fina; mono cinomolgo (1046 UR), línea gris gruesa; rata (831 UR), línea gris claro gruesa; perro (1053 UR), línea negra fina; y ratón (858 UR), línea negra gruesa.

La Figura 8 muestra el efecto inhibitorio de Z_x-PP013 (círculos abiertos), Z_y-PP013 (cuadrados abiertos) y Z_{neg}-PP013 (triángulos cerrados) sobre la proliferación de células TF-1 inducida por citocinas en presencia de un exceso molar de cinco veces de HSA.

La Figura 9 muestra las respuestas de unión máximas obtenidas por análisis en Biacore de PEP07986 (SEQ ID NO:163) almacenado a 4, 25 o 40 °C durante una semana, dos semanas, un mes y tres meses como se indica, a una concentración de 2 mg/ml, inyectado sobre HSA inmovilizada (704 UR) a una concentración de 10 nM. Se muestran muestras no tratadas de tiempo = 0 como referencias.

La Figura 10 muestra el resultado del análisis de unión realizado en un instrumento Biacore para investigar la unión del polipéptido de unión a albúmina PEP08296 (PEP08185 conjugado con DOTA, SEQ ID NO:148) a albúmina de suero humano antes y después de un tratamiento con calor. Se inyectaron dos concentraciones de PEP08296 (0,8 nM, líneas grises; 4 nM, líneas negras) sobre una superficie con 724 UR de albúmina de suero humano inmovilizada. Las líneas sólidas son antes del tratamiento con calor y las líneas discontinuas después del tratamiento con calor durante 10 minutos a 90 °C.

Las Figuras 11 A-B muestran el solapamiento de dos espectros CD de PEP08296 (PEP08185 conjugado con DOTA, SEQ ID NO:148) antes y después de un tratamiento con calor durante 12 min a 90 °C. A) Muestra incubada en PBS pH 7,2. B) Muestra incubada en PBS pH 4,0.

La Figura 12 muestra la imagen de proyección de intensidad máxima (MIP) de la distribución en cuerpo entero de ⁶⁸Ga-PEP08296 en una rata sana, sumada durante 1,5 h de recogida de datos inmediatamente después de la

inyección intravenosa (vena de la cola). La radioactividad circulante en los vasos principales (p.ej. la yugular (flecha larga) y femoral (flecha corta)), el corazón (H), hígado (L), bazo (S), riñón (K) y vejiga (B) se delinea fácilmente.

La Figura 13 muestra un cromatograma de filtración en gel de PEP07986 (SEQ ID NO:163) inyectado a una concentración de 42 mg/ml, línea sólida negra. Se incluye para comparación un cromatograma de ovalbúmina (Mw 43 kDa) inyectada a una concentración de 5 mg/ml, línea rota gris, confirmando que el pico para PEP07986 no es un agregado, lo que se habría esperado en el volumen vacío eluido en un punto de tiempo anterior que la ovalbúmina.

La invención será ilustrada ahora adicionalmente mediante la descripción no limitante de experimentos realizados de acuerdo con la misma. A menos que se especifique lo contrario, se usaron en todos los experimentos métodos de química y biología molecular convencionales.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Clonación, expresión, purificación y caracterización de polipéptidos de unión a albúmina

En este ejemplo, diez diferentes polipéptidos de unión a albúmina, PEP07913 (SEQ ID NO:153), PEP07912 (SEQ ID NO:156), PEP07914 (SEQ ID NO:158), PEP07968 (PEP07911 conjugado con DOTA, SEQ ID NO:159), PEP06923 (SEQ ID NO:154), PEP07271 (SEQ ID NO:155), PEP07554 (SEQ ID NO:156), PEP07844 (SEQ ID NO:161), PEP07986 (SEQ ID NO:163) y PEP08296 (PEP08185 conjugado con DOTA, SEQ ID NO:148), cuyas secuencias de aminoácidos se exponen en la Figura 1 y en el listado de secuencias adjunto, se clonaron, purificaron y caracterizaron.

Material y métodos

Clonación de variantes de polipéptidos de unión a albúmina

Se generaron mutaciones en G148-GA3 usando mutagénesis dirigida al sitio con los oligonucleótidos apropiados para obtener las variantes de polipéptidos de unión a albúmina deseadas. Los fragmentos génicos fueron amplificados por PCR con cebadores que añadían sitios de endonucleasa específicos, así como una secuencia de MGSS N-terminal que precedía a las variantes de polipéptidos de unión a albúmina. Los fragmentos fueron escindidos con *NdeI* y *NotI*, purificados y ligados a un vector de clonación, el plásmido pAY02556 (que contenía un origen de replicación de pBR322, un gen de resistencia a la kanamicina y un promotor de T7 para la expresión del gen de interés), restringido con las mismas enzimas. Las ligaciones fueron transformadas en células *E. coli* TOP10 electrocompetentes. Las células transformadas fueron extendidas sobre placas TBAB (30 g/l de agar base de triptosa y sangre) suplementadas con 50 µg/ml de kanamicina, seguido de incubación a 37 °C durante una noche. Las colonias fueron cribadas usando PCR, y la secuenciación de los fragmentos amplificados se realizó usando el oligonucleótido biotinilado y un kit de secuenciación de ciclos BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems), usado de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las reacciones de secuenciación fueron purificadas por unión a perlas magnéticas revestidas con estreptavidina usando un Magnatrix 8000 (NorDiag AB), y analizadas en un Analizador Genético ABI PRISM® 3100 (PE Applied Biosystems). Todas las variantes de polipéptidos de unión a albúmina fueron subclonadas como monómeros, y los constructos codificados por los vectores de expresión fueron MGSS-[PP###], donde PP### corresponde a los residuos de aminoácidos que constituyen la secuencia del polipéptido de unión a albúmina.

Además, los fragmentos génicos de G148-GA3, PP007 (SEQ ID NO:7), PP013 (SEQ ID NO:13) y PP037 (SEQ ID NO:37) fueron amplificados por PCR con cebadores que añadían sitios de endonucleasa específicos así como una secuencia de hexahistidina, un sitio de proteasa TEV y un residuo de glicina antes de los residuos de aminoácidos que constituyen la secuencia del polipéptido de unión a albúmina. Los polipéptidos PEP07913 (SEQ ID NO:153), PEP07912 (SEQ ID NO:157), PEP07914 (SEQ ID NO:158) y PEP07968 (SEQ ID NO:159) corresponden a los polipéptidos de unión a albúmina G148-GA3, PP007 (SEQ ID NO:7), PP013 (SEQ ID NO:13) y PP037 (SEQ ID NO:37) con residuos de glicina añadidos. Los fragmentos fueron escindidos con *XbaI* y *NotI*, purificados y ligados a un vector de clonación, el plásmido pAY02512 (que contenía un origen de replicación de pBR322, un gen de resistencia a la kanamicina y un promotor de T7 para la expresión del gen de interés. El sitio de clonación está precedido por una secuencia que codifica un péptido que contiene una etiqueta de hexahistidina seguido de un sitio de escisión para la proteasa TEV), restringido con las mismas enzimas. La ligación, transformación y verificación de secuencia se realizaron como se describió anteriormente. Las cuatro variantes de polipéptido de unión a albúmina G148-GA3, PP007, PP013 y PP037 fueron subclonadas como monómeros, y los constructos codificados por los vectores de expresión fueron MGSSHHHHHLQSSGVDLG TENLYFQG-[PP###].

El vector de expresión que codifica MGSSHHHHHLQSSGVDLG TENLY-FQG-[PP013] fue modificado adicionalmente por mutagénesis dirigida al sitio usando oligonucleótidos, dando como resultado la inserción de un residuo de serina antes de los residuos de aminoácidos que constituyen la secuencia del polipéptido de unión a albúmina, para obtener el constructo MGSSHHHHHLQSSGVDLG TENLYFQ-GS-[PP013]. Este constructo fue modificado adicionalmente por 1) mutagénesis dirigida al sitio para reemplazar el residuo de serina en la posición 14 (dentro de PP013) con un residuo de cisteína, generando MGSSHHHHHLQSSGVDLG TENLYFQGS-[PP049], y 2)

adición de un residuo de glicina C-terminalmente, generando MGSSHHHHHLQSSGVDLGTENLYFQGS-[PP049]-G. La adición de glicina C-terminalmente se llevó a cabo por amplificación por PCR con cebadores que incluían nucleótidos que codifican el residuo de glicina y sitios de endonucleasa específicos. El fragmento fue escindido con *Xba*I y *Nof*I, purificado y ligado a un vector de clonación, el plásmido pAY02556 (que contenía un origen de replicación de pBR322, un gen de resistencia a la kanamicina y un promotor de T7 para la expresión del gen de interés), restringido con las mismas enzimas. La ligación, transformación y verificación de secuencia se realizaron como se describió anteriormente.

Expresión de proteínas

Las variantes de polipéptidos de unión a albúmina fueron expresadas en *E. coli* BL21 (DE3) con una extensión MGSS N-terminal o bien con una etiqueta de His₆ N-terminal seguido de un sitio de reconocimiento de proteasa TEV y un residuo de glicina. Se usó una colonia de cada variante de polipéptido de unión a albúmina para inocular 4 ml de medio TSB+YE suplementado con kanamicina a una concentración de 50 µg/ml. Los cultivos fueron cultivados a 37 °C durante aproximadamente 5 horas. Se usaron 3 ml de cada uno de los cultivos para inocular 800 ml de TSB+YE suplementado con kanamicina hasta una concentración de 50 µg/ml en biorreactores paralelos (Greta system, Belach Biotechnik AB). Los cultivos se realizaron a 37 °C, con aireación a 800 ml/minuto y un perfil de agitación para mantener niveles de oxígeno disuelto por encima de 30 %, hasta un OD600 de 2, lo que fue seguido por la adición de IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM. Se continuó el cultivo durante cinco horas, después de lo cual el cultivo fue enfriado hasta 10 °C, la aireación fue detenida y la agitación fue disminuida a 300 rpm. Los gránulos de células fueron recolectados por centrifugación (15600 × g, 4 °C, 20 minutos) y almacenados a -20 °C hasta la purificación.

Purificación de variantes de polipéptidos de unión a albúmina con una etiqueta His₆ y un sitio de proteasa TEV

Gránulos de células congeladas que albergaban los polipéptidos solubles PEP07913 (SEQ ID NO:153), PEP07912 (SEQ ID NO:156), PEP07914 (SEQ ID NO:158), PEP07968 (SEQ ID NO:159), PEP07986 (SEQ ID NO:163) y PEP08185 (SEQ ID NO:148) etiquetados con hexahistidina fueron suspendidos en 35 ml de tampón de unión (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, pH 7,4) con una adición de 1.000 U de Benzonase® (1.01654.001, Merck), y disgregados por ultrasonificación. Para cada uno de los polipéptidos, la suspensión ultrasonificada fue aclarada por centrifugación (1 h, 37.000 × g, 4 °C) y el sobrenadante se cargó sobre una columna His GraviTrap™ (11-0033-99, GE Healthcare). La columna se lavó con 10 ml de tampón de lavado (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 60 mM, pH 7,4), antes de eluir el polipéptido con 3 ml de tampón de elución (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 0,5 M, pH 7,4). El tampón fue cambiado a un tampón de escisión (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8) usando una columna de desalación PD-10 (17-0851-01, GE Healthcare). La cantidad de polipéptido producto se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm antes de añadir DTT hasta una concentración final de 5 mM. Se añadió proteasa TEV etiquetada con His₆ al tampón de escisión en una relación de masa 1:10 en relación al polipéptido producto. La escisión se realizó durante una noche bajo una mezcla lenta a 4 °C. Se añadió imidazol a la mezcla de escisión, hasta una concentración de 20 mM, antes de cargar la mezcla sobre una columna His GraviTrap™ (11-0033-99, GE Healthcare) para retirar etiquetas His₆ escindidas, proteasa TEV etiquetada con His₆ y producto no escindido etiquetado con His₆.

Para cada variante, el flujo de salida, que contenía la variante de polipéptido de unión a albúmina, fue purificado adicionalmente por cromatografía de fase inversa (RPC), como sigue. La fracción de flujo de salida se cargó en una columna Resource 15 RPC de 1 ml (GE Healthcare), equilibrada previamente con Tampón de RPC A (TFA al 0,1 % en agua). Después del lavado de la columna con 10 volúmenes de columna (VC) de Tampón de RPC A, los polipéptidos unidos fueron eluidos con un gradiente lineal de 0-50 % de Tampón de RPC B (TFA al 0,1 % en acetonitrilo) durante 10 VC. El caudal fue 2 ml/min, y la absorbancia a 280 nm fue monitorizada. Las fracciones que contenían variante de polipéptido de unión a albúmina fueron identificadas por análisis SDS-PAGE y reunidas.

Las variantes de polipéptidos de unión a albúmina purificadas por RPC fueron purificadas además por filtración en gel en 120 ml de Superdex 75 (GE Healthcare) introducidos en una columna XK16 (GE Healthcare). El tampón de ejecución fue 1xPBS, y el caudal 2 ml/min. Las fracciones que contenían variante de polipéptido de unión a albúmina puro fueron reunidas y concentradas hasta aproximadamente 1,3 mg/ml. Finalmente, el concentrado se purificó de cantidades traza de endotoxinas remanentes usando columnas de 1 ml de gel de retirada AffinityPak Detoxi-Gel Endotoxin (Pierce, prod#20344), según las recomendaciones del fabricante.

Las variantes de polipéptidos de unión a albúmina PEP07911 y PEP08185 fueron conjugadas con Mal-DOTA antes de la etapa de purificación por RPC, como sigue. El tampón de la fracción de flujo de salida de la etapa de purificación IMAC-FT fue cambiado a NaAc 0,2 M, pH 5,5, usando una columna desaladora PD-10 desechable (GE Healthcare). Se añadió maleimido-mono-amida-DOTA (MacroCyclics, n° de cat. B-272) en un exceso molar de 5 veces y se incubó durante 60 minutos a 30 °C bajo agitación continua. El polipéptido resultante se designó como PEP07968 y PEP08296, respectivamente.

Purificación de variantes de polipéptidos de unión a albúmina sin etiqueta His₆

Gránulos de células congeladas que albergaban las variantes de polipéptidos de unión a albúmina solubles PEP06923 (SEQ ID NO:154), PEP07271 (SEQ ID NO:155), PEP07554 (SEQ ID NO:156) y PEP07844 (SEQ ID NO:161) se suspendieron en Tris-HCl 20 mM, pH 8, y se disgregaron por ultrasonificación. Para cada una de las variantes de polipéptidos, la suspensión se aclaró por centrifugación (30 min, 32.000 × g, 4 °C) y el sobrenadante se cargó sobre una columna HSA-Sepharose (GE Healthcare). Después de lavar con tampón TST (Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, NaCl 200 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 8,0), seguido de NH₄Ac 5 mM, pH 5,5, la variante de polipéptido de unión a albúmina unida se eluyó con HAc 0,5 M, pH 3,2.

Las variantes de polipéptidos de unión a albúmina fueron purificadas adicionalmente por cromatografía de fase inversa (RPC), como sigue. Para cada una de las variantes, el eluato de la etapa de purificación por afinidad a HSA se cargó en una columna Resource 15 RPC de 1 ml (GE Healthcare), equilibrada previamente con Tampón RPC A (TFA al 0,1 % en agua). Después del lavado de la columna con 10 VC de Tampón de RPC A, los polipéptidos unidos fueron eluidos con un gradiente lineal de 0-50 % de Tampón de RPC B (TFA al 0,1 % en acetonitrilo) durante 10 VC. El caudal fue 2 ml/min, y la absorbancia a 280 nm fue monitorizada. Las fracciones que contenían variantes de polipéptido de unión a albúmina puras fueron identificadas por análisis SDS-PAGE y reunidas. Finalmente, el tampón fue cambiado a 1xPBS (KCl 2,68 mM, NaCl 137 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, pH 7,4) usando una columna de desalación PD-10 desechable (GE Healthcare).

Caracterización de variantes de polipéptidos de unión a albúmina purificadas

La concentración fue evaluada midiendo la absorbancia a 280 nm usando un espectrofotómetro NanoDrop[®] ND-1000. Las proteínas fueron analizadas adicionalmente con SDS-PAGE y LC-MS.

Para el análisis SDS-PAGE, se mezclaron aproximadamente 10 µg de cada variante de polipéptido de unión a albúmina con Tampón de Muestras NuPAGE LDS (Invitrogen), se incubaron a 70 °C durante 15 min y se cargaron sobre geles NuPAGE 4-12 % Bis-Tris (Invitrogen). Los geles fueron procesados con tampón de ejecución NuPAGE MES SDS (Invitrogen) en una celda de electroforesis XCell II SureLock (Novex) empleando el Estándar Sharp Prestained (Invitrogen) como marcador del peso molecular y usando PhastGel BlueR (GE Healthcare) para la tinción.

Para verificar la identidad de las variantes de polipéptidos de unión a albúmina, se realizaron análisis LC/MS usando un sistema Agilent 1100 LC/MSD, equipado con API-ESI y un analizador de masas de cuadrupolo simple. Se cargaron aproximadamente 10 µg de cada una de las variantes de polipéptidos de unión a albúmina purificadas en una columna Zorbax 300SB-C8 Narrow-Bore (2,1 x 150 mm, 3,5 µm, Agilent Technologies) a un caudal de 0,5 ml/min. Los polipéptidos fueron eluidos usando un gradiente lineal de 10-70 % de disolución B durante 15 min a 0,5 ml/min. La separación se realizó a 30 °C. La señal iónica y la absorbancia a 280 y 220 nm fueron monitorizadas. Los pesos moleculares de las variantes de polipéptidos de unión a albúmina purificadas fueron confirmados por MS.

Resultados

Los niveles de expresión de las variantes de polipéptidos de unión a albúmina fueron 10-30 mg de producto/g de gránulo de células, estimado por análisis SDS-PAGE.

Para todas las variantes, la pureza, determinada por análisis SDS-PAGE, superó el 95 % y el análisis LC/MS verificó los correctos pesos moleculares. Después de la purificación, se obtuvieron entre 1 y 8 mg de polipéptido puro para cada una de las diez variantes de polipéptidos de unión a albúmina.

Ejemplo 2:

Determinación de la afinidad para polipéptidos de unión a albúmina

En este ejemplo, PEP06923 (SEQ ID NO:154), PEP07271 (SEQ ID NO:155), PEP07844 (SEQ ID NO:161), PEP07912 (SEQ ID NO:157), PEP07913 (SEQ ID NO:153), PEP07914 (SEQ ID NO:158) y PEP07968, (PEP07911 conjugado con DOTA, SEQ ID NO:159), sintetizados o expresados y purificados en el Ejemplo 1, fueron caracterizados en cuanto a su afinidad a albúmina de suero humano (HSA) usando un instrumento Biacore. PEP07913 corresponde a la secuencia de aminoácidos de G148-GA3 con la adición de un residuo de glicina N-terminal, mientras que PEP07271, PEP07844, PEP07912, PEP07914 y PEP07968 corresponden a los polipéptidos de unión a albúmina de PP001 (SEQ ID NO:1), PP043 (SEQ ID NO:43), PP007 (SEQ ID NO:7), PP013 (SEQ ID NO:13) y PP037 (SEQ ID NO:37) con diferentes adiciones de aminoácido N-terminal.

Material y métodos

Se realizó un análisis Biosensor en un instrumento Biacore2000 (GE Healthcare) con HSA (Albucult[®], Novozymes), inmovilizada por acoplamiento de amina sobre la capa de dextrano carboxilado de las superficies de chips CM-5 (calidad investigación; GE Healthcare) según las recomendaciones del fabricante. La superficie 1 del chip fue activada y desactivada y usada como celda de referencia (superficie blanco) durante las inyecciones, mientras que

la superficie 2 comprendió HSA inmovilizada a 731 unidades de resonancia (UR) y la superficie 4 comprendió HSA inmovilizada a 955 UR. Las variantes de polipéptidos de unión a albúmina purificadas se diluyeron en tampón de ejecución HBS-EP (GE Healthcare) hasta 2,5 nM, 10 nM y 40 nM, y se inyectaron a un caudal constante de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 5 minutos, seguido de la inyección de HBS-EP durante 60 minutos. Las superficies fueron regeneradas con una inyección de 25 μl de HCl, 10 mM. Las medidas de afinidad se realizaron en dos juegos; en el primer juego se inyectaron HBS-EP, PEP06923, PEP07271, PEP07912, PEP07913, PEP07914 y PEP07968 (superficie del chip 2), y en el segundo juego se inyectaron HBS-EP, PEP06923, PEP07844, PEP07912 y PEP07914 (superficie del chip 4). Se inyectó PEP06923 dos veces en cada ejecución como control. Los resultados se analizaron con un programa informático BiaEvaluation (GE Healthcare). Las curvas de la superficie blanco se restaron de las curvas de las superficies de los ligandos.

Resultados

El instrumento Biacore 2000 tiene una limitación técnica, que obstaculiza las medidas de afinidad muy alta. Por tanto, el propósito del estudio Biacore no fue determinar los parámetros cinéticos exactos de la afinidad de las variantes de polipéptidos de unión a albúmina por HSA. Sin embargo, los resultados proporcionan una estimación cuantitativa de las afinidades relativas de estos polipéptidos por la albúmina. Después de la sustracción de la superficie de referencia y la inyección del tampón, las curvas fueron ajustadas a un modelo de unión 1:1 (Langmuir) usando el programa informático BIAevaluation con corrección para transferencia de masa y con R_Umax ajustado como parámetro local. Las curvas se muestran en la Figura 2. Los valores relativos de K_D , k_a (k_{on}) y k_d (k_{off}) fueron estimados y se presentan en las Tablas a continuación.

Tabla 1:

Parámetros cinéticos (k_a , k_d y K_D) de polipéptidos de unión a albúmina a HSA, 1er juego			
	k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
PEP07913	$5,7 \times 10^5$	$9,3 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-9}$
PEP06923 (1)	$2,9 \times 10^7$	$2,9 \times 10^{-5}$	$9,9 \times 10^{-13}$
PEP06923 (2)	$2,6 \times 10^7$	$2,8 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-12}$
PEP07271	$3,9 \times 10^6$	$2,9 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^{-12}$
PEP07912	$4,6 \times 10^6$	$2,8 \times 10^{-5}$	$6,2 \times 10^{-12}$
PEP07914	$3,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^{-5}$	$7,2 \times 10^{-12}$
PEP07968	$3,0 \times 10^6$	$2,7 \times 10^{-5}$	$9,0 \times 10^{-12}$

Tabla 2:

Parámetros cinéticos (k_a , k_d y K_D) de polipéptidos de unión a albúmina a HSA, 2º juego			
	k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
PEP06923 (1)	$2,0 \times 10^7$	$2,6 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{-12}$
PEP06923 (2)	$2,1 \times 10^7$	$2,5 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-12}$
PEP07912	$5,4 \times 10^6$	$2,8 \times 10^{-5}$	$5,2 \times 10^{-12}$
PEP07914	$3,8 \times 10^6$	$2,6 \times 10^{-5}$	$6,9 \times 10^{-12}$
PEP07844	$5,4 \times 10^6$	$2,3 \times 10^{-5}$	$4,4 \times 10^{-12}$

Como se muestra en las Tablas 1 y 2, PEP07271 (SEQ ID NO:155), PEP07844 (SEQ ID NO:161), PEP07912 (SEQ ID NO:157), PEP07914 (SEQ ID NO:158) y PEP07968 (PEP07911 conjugado con DOTA, SEQ ID NO:159) parecen tener todos aproximadamente la misma afinidad por HSA, superando ampliamente la afinidad del G148-GA3 parental (PEP07913; SEQ ID NO:153). La afinidad por HSA de estos polipéptidos es ligeramente más baja en comparación con PEP06923 (SEQ ID NO:154), a pesar de una velocidad de reacción inversa similar.

Ejemplo 3:

Determinación de la temperatura de fusión (T_m) para polipéptidos de unión a albúmina

En este ejemplo, las variantes de polipéptidos de unión a albúmina PEP07913 (SEQ ID NO:153), PEP06923 (SEQ ID NO:154), PEP07271 (SEQ ID NO:155), PEP07554 (SEQ ID NO:156), PEP07912 (SEQ ID NO:157), PEP07914 (SEQ ID NO:158), PEP07968 (PEP07911 conjugado con DOTA, SEQ ID NO:159), PEP07844 (SEQ ID NO:161) y PEP07986 (SEQ ID NO:163), expresadas y purificadas como se describe en el Ejemplo 1, y la variante de polipéptido de unión a albúmina PEP07975 (PEP07834 conjugado con DOTA, SEQ ID NO:160), producida como se describe en el Ejemplo 5, se analizaron por análisis CD. PEP07913 corresponde a la secuencia de G148-GA3 que tiene un residuo de glicina N-terminal, PEP06923 es un derivado de alta afinidad diseñado, descrito previamente por Jonsson *et al*, arriba, mientras que PEP07271, PEP07554, PEP07912, PEP07914, PEP07968, PEP07844 y PEP07975 son ejemplos de los polipéptidos de unión a albúmina de PP001 (SEQ ID NO:1), PP007 (SEQ ID NO:7), PP013 (SEQ ID NO:13), PP037 (SEQ ID NO:37) y PP043 (SEQ ID NO:43) que tienen diferentes adiciones de aminoácido N-terminal según la presente descripción.

Material y métodos

Las variantes de polipéptidos de unión a albúmina purificadas fueron diluidas en 1xPBS, hasta concentraciones finales entre 0,4 y 0,5 mg/ml. Se realizó un análisis de dicroísmo circular (CD) en un espectropolarímetro Jasco J-810, en una celda con una longitud de camino óptico de 1 mm. En las medidas a temperaturas variables, la absorbancia se midió a 221 nm de 20 °C a 90 °C, con una pendiente de temperatura de 5 °C/min.

Resultados

Las temperaturas de fusión (T_m) de las diferentes variantes de polipéptidos de unión a albúmina se calcularon determinando el punto medio de la transición en la representación gráfica de CD frente a temperatura. Los resultados se resumen en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Valores determinados de T_m de las variantes de polipéptidos de unión a albúmina ensayadas

Variante	SEQ ID NO:#	Secuencia N-terminal ³	T_m (°C)
PEP07913	SEQ ID NO:153	GL	61
PEP06923	SEQ ID NO:154	GSSL	57
PEP07271	SEQ ID NO:155	GSSL	65
PEP07554	SEQ ID NO:156	GSSL	58
PEP07912	SEQ ID NO:157	GL	53
PEP07914	SEQ ID NO:158	GL	59
PEP07968	SEQ ID NO:159 ¹	GL	53
PEP07975	SEQ ID NO:160 ^{1,2}	AL	50
PEP07844	SEQ ID NO:161	GSSL	65
PEP07986	SEQ ID NO:163	GSL	61
¹) El péptido está conjugado con maleimida-DOTA en la cisteína			
²) El péptido está amidado en el término C			
³) Leucina (subrayada) es el residuo en la posición 1 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de unión a albúmina definido en el primer aspecto de la presente descripción			

El polipéptido PEP07968 es idéntico a PEP07912, excepto en que el primero tiene un residuo de cisteína en la posición 14 conjugado con maleimida DOTA, y el segundo un residuo de serina. Por tanto, la modificación con DOTA no debe afectar a la temperatura de fusión. También PEP07975 está conjugado con DOTA usando C₁₄, y es idéntico a PEP07968 excepto por la amida C-terminal (que resulta de la síntesis peptídica en el Ejemplo 5) y por tener una alanina N-terminal en lugar de una glicina. Además, la comparación de PEP07912 y PEP07554 revela que una serina N-terminal da una temperatura de fusión más alta que una glicina en la misma posición (5 °C de diferencia en T_m). Por tanto, todas las variantes de polipéptidos de unión a albúmina según la presente descripción muestran una T_m por encima de 55 °C, excepto PEP07912 y variantes conjugadas con DOTA. Tomando en consideración la importancia de la porción N-terminal, todos los polipéptidos de unión a albúmina ensayados son superiores al derivado de la técnica anterior de Jonsson *et al*, es decir, PEP06923.

Ejemplo 4:

Análisis de la respuesta del suero

El porcentaje de suero humano que contiene IgG, capaz de unirse a un juego de polipéptidos de unión a albúmina descritos en la presente memoria, se analizó por ELISA. En total, se cribaron 149 muestras de suero correspondientes a 127 individuos.

Material y métodos

Se revistieron placas de ELISA (placas de 96 pocillos, de media área (Costar, N° de cat. 3690)) con 50 µl/pocillo de AlbuCult® (Novozymes) diluido hasta 8 µg/ml en tampón de revestimiento (Sigma, N° de cat. 3041). Las placas fueron revestidas por la noche durante tres días a 4 °C. En el día del análisis, las placas se lavaron dos veces con agua del grifo y se bloquearon durante 2 horas con 100 µl de suero salino tamponado con fosfato (PBS) que contenía caseína al 0,05 % (PBSC). Las placas fueron vaciadas y se añadieron 50 µl/pocillo de los polipéptidos de unión a albúmina PEP07913 (SEQ ID NO:153), PEP06923 (SEQ ID NO:154), PEP07271 (SEQ ID NO:155), PEP07912 (SEQ ID NO:157), PEP07554 (SEQ ID NO:156), PEP07914 (SEQ ID NO:158), PEP07968 (PEP07911 conjugado con DOTA, SEQ ID NO:159) y PEP07844 (SEQ ID NO:161), diluidos a 2 µg/ml en PBSC, según una disposición de placa hecha previamente. Después de una incubación durante dos horas a temperatura ambiente (TA), las placas se lavaron en PBSC cuatro veces usando un lavador de ELISA automatizado. Las 149 muestras de suero de 129 individuos se diluyeron 50 veces en PBSC añadiendo 24 µl de suero a 1174 µl de PBSC. Se añadieron 50 µl de los sueros diluidos por pocillo según la disposición de placa hecha previamente. Cada muestra de suero se ensayó como singlete. Se incluyeron controles positivos y negativos en cada placa y para cada polipéptido de unión a albúmina. Se añadieron anticuerpos de unión a albúmina (50 µl, 0,5 µl/ml de solución de inmunoglobulina preparada en el laboratorio a partir de sueros de primates inmunizados con PEP06923) como control positivo, y se usaron 50 µl de PBSC como control negativo. Las placas fueron incubadas durante una hora a TA y posteriormente se lavaron cuatro veces en PBSC usando un lavador de ELISA automatizado. La IgG enlazada se detectó con 50 µl/pocillo de IgG anti-humana (Southern Biotech, n° de cat. 2040-05) diluida 10.000 veces en PBSC. Después de lavar cuatro veces en PBSC usando un lavador de ELISA automatizado, se añadieron 50 µl/pocillo de sustrato (Pierce N° de cat. 34021). La reacción fue detenida después de 10-15 minutos mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ a cada pocillo, antes de medir la absorbancia usando un lector de placas multipocillo (Victor3, Perkin Elmer).

Resultados

De los 149 sueros cribados para la unión de IgG a los polipéptidos de unión a albúmina, 23 fueron negativos para los ocho polipéptidos (valor OD < 0,1), es decir, no mostraron IgG unida a los polipéptidos. El análisis se realizó con los 126 sueros que fueron positivos para uno o más polipéptidos de unión a albúmina. Se calculó la absorbancia media (Figura 3A) y el porcentaje de sueros con valores OD de < 0,15 (Figura 3B) o bien > 1,0 (Figura 3C). El valor OD medio más alto y el porcentaje más alto de suero con unión de IgG se obtuvieron con PEP07913 (SEQ ID NO:153), PEP06923 (SEQ ID NO:154) y PEP07844 (SEQ ID NO:161), mientras que se encontró la menor reactividad contra PEP07968 (PEP07911 conjugado con DOTA, SEQ ID NO:159), PEP07914 (SEQ ID NO:158) y PEP07954 (SEQ ID NO:156).

Por tanto, los polipéptidos de unión a albúmina más reactivos fueron el G148-GA3 parental (PEP07913, SEQ ID NO:153) y el derivado mejorado en afinidad previamente (PEP06923, SEQ ID NO:154), que tienen la hélice 1 retenida de G148-GA3. El tercero de los polipéptidos más reactivos (PEP07844, SEQ ID NO:161) contiene la lisina original en la posición 14 en la hélice 1. Este residuo está destinado a conjugación, y por lo tanto no será expuesto en el contexto final. La variante de polipéptido de unión a albúmina idéntica, excepto por tener una alanina en la posición 14 (PEP07554, SEQ ID NO:156), es una de las menos reactivas.

Ejemplo 5:

Síntesis química de un polipéptido de unión a albúmina conjugado con DOTA

Material y métodos

El polipéptido de unión a albúmina PEP07834 (SEQ ID NO:160) se sintetizó por síntesis peptídica en fase sólida (SPPS, como describen Quibell, M. y Johnson, T., en *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis-A Practical Approach*, W.C. Chan, P.D. White Eds, Oxford University Press 2000, 115-135) en un reactor 433 A Peptide Synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA) en una escala de 0,1 mmol, es decir, con un rendimiento teórico posible de 0,1 mmol de péptido, usando química de Fmoc estándar. Se usó una resina de amida Fmoc lábil con ácidos como soporte sólido en toda la síntesis (Rink Amide MBHA Resin LL (100-200 de malla), cargando 0,39 mmol de amida/g de resina (Novabiochem)).

Se acoplaron 47 residuos de aminoácidos según la secuencia de más adelante a la resina de amida por reacción de acilación en el reactor durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA) y mezcla. Las reacciones de acilación se realizaron con un exceso molecular de diez veces de aminoácidos protegidos con Fmoc en NMP (N-metilpirrolidona, Merck), activada con 1 eq de hexafluorofosfato de 2-(1 H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (HBTU, IRIS Biotech), 1 eq de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt, IRIS Biotech) y 2 eq de diisopropiletilamina (DIEA, Applied Biosystems). Además, todas las cadenas laterales de aminoácidos reactivas fueron protegidas con grupos estándar de protección de cadenas laterales (*tert*-butilo (tBu) para Asp, Glu, Ser, Thr y Tyr, *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) para Lys, 2,2,4,6,7-pentametilidihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf) para Arg, y tritilo (Trt) para Asn y Cys) antes de la activación y acoplamiento. A fin de disminuir la cantidad de acoplamientos incompletos que conducen a péptidos truncados, se sometió una pequeña cantidad de residuos de aminoácidos seleccionados a acoplamiento por acilación dos veces, sin desprotección de Fmoc, como se describe a continuación entre el primer y segundo acoplamiento. La secuencia de aminoácidos del polipéptido de unión a albúmina sintetizado PEP07834 fue

ALASAKEAAN AELDCYGVSD FYKRLIDKAK TVEGVEALKD AILAALP-NH₂ (SEQ ID NO:160-NH₂).

Los residuos de aminoácidos subrayados fueron acoplados doblemente. Cualesquiera grupos amino sin reaccionar remanentes en los péptidos unidos a la resina fueron taponados con anhídrido acético (anhídrido acético 0,5 M (AlfaAesar), DIEA 0,125 M, HOBt 0,015 M HOBt en NMP) durante 5 min. Después de cada acoplamiento, se realizó la desprotección del grupo Fmoc N-terminal en los péptidos unidos a la resina por tratamiento con piperidina al 20% (Sigma-Aldrich) en NMP durante 10 min.

Después de completarse la síntesis, los péptidos fueron escindidos del soporte sólido, y simultáneamente los grupos de protección de las cadenas laterales fueron escindidos por tratamiento con TFA/EDT/H₂O/TIS (94:2,5:2,5:1) (TFA: ácido trifluoroacético (Apollo), EDT: 1,2-etanoditiol (Aldrich), TIS: triisopropilsilano (Aldrich)) a TA durante 2 h con mezcla ocasional. Después del tratamiento con TFA, los péptidos se extrajeron tres veces usando acetonitrilo al 20 % (Merck) en agua y éter *tert*-butilmetílico (Merck). Las fases acuosas se combinaron, se filtraron y se liofilizaron.

Los péptidos brutos se analizaron y purificaron por RP-HPLC semipreparativa (Reposil GOLD C18 300, 250*10 mm, 5 µm de tamaño de partícula) y un gradiente de 32-55% B (A: 0,1 % de TFA-H₂O; B: 0,1 % de TFA-CH₃CN) durante 25 min a un caudal de 2,5 ml min⁻¹, seguido de liofilización.

El rendimiento de síntesis se determinó mediante el cálculo de las áreas integradas bajo los picos de la señal a 220 nm del análisis bruto en RP-HPLC. El peso molecular correcto se verificó usando espectroscopia de masas con ionización por electropulverización y cromatografía líquida (LC-ESI-MS) en un 6520 Accurate Mass Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies). La pureza del producto se verificó usando RP-HPLC (Reposil GOLD C18 300, 250*4,6 mm, 3 µm de tamaño de partícula) usando un gradiente de 35-55 % B durante 25 min a un caudal de 1,0 ml min⁻¹.

Conjugación con DOTA

Se redujeron 3 mg de PEP07834-amida (SEQ ID NO:160-amida) con DTT 20 mM a 40 °C durante 30 minutos. El exceso de DTT se retiró por cambio de tampón en una columna PD-10 (GE Healthcare) a acetato de amonio 0,2 M, pH 5,5. El acoplamiento se realizó con un exceso molar de 5 veces de disolución de quelador, maleimido-mono-amida-DOTA (Macrocyclics, N° de Cat. B-272) en agua (1 mg/ml). La mezcla se incubó durante 1 hora a 30 °C bajo agitación continua. La purificación de los queladores no conjugados se hizo en una columna de RPC semipreparativa (Zorbax 300SB C18, 9,4x250 mm, 5 µm). El grado de acoplamiento del material purificado se analizó por HPLC-MS en una columna analítica Zorbax 300SB C8 150 x 2,1 mm, 3,5 µm. Sólo fue detectado por el método PEP07834 conjugado con maleimida-DOTA, designado como PEP07975.

Resultados

En base al perfil de elución del material bruto, se determinó que el rendimiento de síntesis del polipéptido de unión a albúmina PEP07834-amida (SEQ ID NO:160-amida) fue 8 %. El peso molecular encontrado fue 4.952,9 Da, que está en buena concordancia con el peso molecular teórico calculado en 4.952,6 Da. Cuando se analizó el producto purificado, se encontró que aproximadamente 10-15 % de la proteína era un homodímero enlazado por disulfuro

(Figura 4 y 5). La actividad de unión del péptido conjugado con DOTA (PEP07975) se confirmó como se describe en el Ejemplo 2 (dato no mostrado), y la temperatura de fusión se determinó como se describe en el Ejemplo 3.

Ejemplo 6:

Ensayo de inmunogenicidad de polipéptidos de unión a albúmina

- 5 Se cribaron PEP07913 (SEQ ID NO:153), PEP07912 (SEQ ID NO:157), PEP07914 (SEQ ID NO:158), y PEP07968 (PEP07911 conjugado con DOTA, SEQ ID NO:159) en cuanto a su capacidad para inducir proliferación de linfocitos T en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 52 individuos humanos caucásicos (obtenidas de CRI-Labo Medische Analyse, Gent, Bélgica). PEP07913 corresponde a la secuencia de G148-GA3 que tiene un residuo de glicina N-terminal, mientras que PEP07912, PEP07914 y PEP07968 son ejemplos de los polipéptidos de unión a albúmina de PP007 (SEQ ID NO:7), PP013 (SEQ ID NO:13) y PP037 (SEQ ID NO:37) que tienen diferentes adiciones de aminoácido N-terminal según la presente descripción.

Materiales y Métodos

- 15 Se añadieron PBMCs, preparados según métodos biológicos celulares estándar, a un cultivo tisular (TC) tratado en placa de 96 pocillos de fondo redondo (Falcon) en una cantidad de 300.000 PBMCs/pocillo. Las células fueron estimuladas por adición de 100 µl/pocillo de los polipéptidos de unión a albúmina PEP07913, PEP07912, PEP07914 y PEP07968 en medio AIMV (Invitrogen) que contenía adicionalmente 900 µg/ml (exceso molar de 3 veces) de albúmina humana recombinante (Albucult®, Novozymes). Esto correspondió a una concentración final de polipéptido de unión a albúmina de 30 µg/ml. La estimulación se hizo en ocho replicados, es decir, se añadió el mismo polipéptido de unión a albúmina a ocho pocillos en cantidades idénticas y bajo las mismas condiciones. En los pocillos de control positivo, las células fueron estimuladas con 30 µg/ml de Hemocianina Keyhole Limpet (KLH, Calbiochem) o bien 30 µg/ml de toxoide del tétanos (TT, Statens Serum Institut). En los pocillos de control negativo, sólo se añadió medio AIMV con o sin 900 µg/ml de albúmina.

- 25 La proliferación celular se evaluó después de siete días de cultivo usando el kit de ensayo de citometría de flujo Alexa Fluor 488 Click-iT EdU (Invitrogen). Se añadió 1 µM/pocillo de marcador de incorporación EdU en el día seis. En el día siete, se lavaron las células, se disociaron de la placa, se lavaron de nuevo y se tiñeron durante 30 minutos con reactivo anti-CD3-PerCP (Becton Dickinson) y reactivo anti-CD4-Alexa647 (Becton Dickinson). Después de la tinción, las células se lavaron, se fijaron (BD cellfix, BD biosciences), se permeabilizaron (usando saponina) y se tiñeron para EdU por adición de reactivo Click-iT según el protocolo del fabricante (Invitrogen). Después de completarse la tinción, las células se lavaron de nuevo y se analizaron usando citometría de flujo (FACSCantoll, BD Biosciences). Para evaluar el número de células proliferantes, se añadió un número fijo de fluosferas (Invitrogen) a cada pocillo antes del análisis. Todos los procedimientos de tinción y lavados se realizaron directamente en la placa de 96 pocillos.

- 35 Los datos de FACSCantoll brutos fueron clasificados jerárquicamente en los linfocitos T CD3⁺ CD4⁺, y se registró el número de células clasificadas, así como su intensidad de fluorescencia del marcador de incorporación EdU-Alexa Fluor 488. Los valores medios del número de células proliferantes/replicado en ocho de pocillos tratados con proteína fueron comparados con los controles positivos y negativos, y se calcularon las relaciones resultantes, descritas como índices de estimulación (SI). En base a los SI y la variación entre replicados, se establecieron valores umbrales de SI a 2,0 y 0,5 para estimulación e inhibición, respectivamente.

Resultados

- 40 Los polipéptidos de unión a albúmina PEP07913, PEP07912, PEP07914 y PEP07968 se evaluaron en cuanto a su potencial inmunogénico en presencia de un exceso de 3 veces de albúmina humana recombinante en una población humana diana usando un ensayo de proliferación PBMC *in vitro*. En comparación con el control de albúmina, PEP07913 indujo la proliferación de células T CD3⁺CD4⁺ en 6 de 52 donantes, PEP07912 en 5 de 52 donantes y PEP07914 y PEP07968 en 1 de 52 donantes (Figura 6A).
- 45 El índice de estimulación medio (SI) para los 52 donantes no fue significativamente diferente para PEP07914 y PEP07968 en comparación con el control negativo que contenía albúmina humana recombinante ($p = 0,79$ y $0,48$ respectivamente, Figura 6B). El SI para PEP07913 fue significativamente más alto ($p = 0,002$), mientras que el SI para PEP07912 fue más alto pero no significativo ($p=0,03$, Figura 6B).
- 50 En comparación con el tampón solamente, el número de individuos con respuesta fue 10 para PEP07912, 7 para PEP07912, 2 para PEP07914, 1 para PEP07968, 2 para albúmina humana recombinante, y 49 y 51 para los dos controles positivos TT y KLH, respectivamente (Figura 6C). Los polipéptidos de unión a albúmina fueron clasificados según su inmunogenicidad en el siguiente orden: PEP07913 > PEP07912 > PEP07914 > PEP07968. Tanto PEP07914 como PEP07968 fueron definidos como no inmunogénicos. Los resultados anteriores demuestran por tanto que el potencial inmunogénico de los polipéptidos de unión a albúmina de la presente descripción es bajo, en comparación con los controles positivos.

Ejemplo 7:

Afinidad de polipéptidos de unión a albúmina a la albúmina de diferentes especies

En este ejemplo, PEP06923 (SEQ ID NO:154), PEP07986 (SEQ ID NO:163) y PEP08296, (PEP08185 conjugado con DOTA, SEQ ID NO:148), expresados y purificados como se describió en el Ejemplo 1, fueron caracterizados en cuanto a afinidad a albúmina de ser humano (HSA), mono cinomolgo (CSA), rata (RSA), ratón (MSA) y perro (DSA) usando un instrumento Biacore.

Material y métodos

Se realizó un análisis biosensor en un instrumento Biacore2000 (GE Healthcare) con HSA (Albucult®, Novozymes), CSA (purificada en laboratorio a partir de suero de cinomolgo), RSA (Sigma-Aldrich, N° de Cat. A6272), MSA (Sigma-Aldrich, N° de Cat. A3559) y DSA (MP Biomedicals, N° de Cat. 55925), inmovilizadas por acoplamiento de amina sobre la capa de dextrano carboxilado de las superficies de chips CM-5 (calidad investigación; GE Healthcare) según las recomendaciones del fabricante.

En el chip 1, la superficie 1 fue activada y desactivada y usada como celda de referencia (superficie blanco) durante las inyecciones, mientras que la superficie 2 comprendió HSA inmovilizada a 1.130 unidades de resonancia (UR), la superficie 3 comprendió CSA inmovilizada a 1.046 UR, la superficie 4 comprendió RSA inmovilizada a 831 UR. En el chip 2, la superficie 1 se usó como superficie blanco, mientras que la superficie 3 comprendió MSA inmovilizada a 858 UR. En el chip 3, la superficie 1 se usó como superficie blanco, mientras que la superficie 2 comprendió DSA inmovilizada a 1.053 UR.

Para el análisis de afinidad por HSA, CSA y RSA (chip 1), las variantes de polipéptidos de unión a albúmina purificadas se diluyeron en tampón de ejecución HBS-EP (GE Healthcare) hasta 40 nM, 10 nM y 2,5 nM; para el análisis de afinidad por MSA (chip 2) las variantes de polipéptidos de unión a albúmina purificadas se diluyeron hasta 1.280 nM, 640 nM, 160 nM y 40 nM, y para el análisis de afinidad por DSA (chip 3) las variantes de polipéptidos de unión a albúmina se diluyeron hasta 1.280 nM, 640 nM, 160 nM, 40 nM y 10 nM. Los polipéptidos de unión a albúmina fueron inyectados a un caudal constante de 50 µl/min durante 5 minutos, seguido de inyección de HBS-EP durante 60 minutos. Las superficies fueron regeneradas con una inyección de 25 µl de HCl, 10 mM. Todas las muestras se ejecutaron en duplicados.

Los resultados se analizaron con un programa informático BIAevaluation (GE Healthcare). Las curvas de la superficie blanco se restaron de las curvas de las superficies de los ligandos.

Resultados

El instrumento Biacore 2000 tiene una limitación técnica, que obstaculiza las medidas de afinidad muy alta. Por tanto, el propósito del estudio Biacore no fue determinar los parámetros cinéticos exactos de la afinidad de las variantes de polipéptidos de unión a albúmina por HSA, CSA, RSA, MSA y DSA respectivamente. Sin embargo, los resultados proporcionan una estimación cuantitativa de las afinidades relativas de los polipéptidos adjuntos por la albúmina de estas diferentes especies. Después de la sustracción de la superficie de referencia y la inyección del tampón, las curvas fueron ajustadas a un modelo de unión 1:1 (Langmuir) usando el programa informático BIAevaluation con corrección para transferencia de masa y con R_Umax ajustado como parámetro local. Se muestran curvas de unión representativas en la Figura 7.

PEP07986 y PEP08296 (PEP08185 conjugado con DOTA) se unen con alta afinidad (K_D en el intervalo de por debajo de picomolar a por debajo de nanomolar) a albúmina de suero humano, así como a albúmina de las frecuentes especies de modelos preclínicos rata, mono cinomolgo, ratón y perro. Las afinidades relativas por las diferentes especies pueden ser clasificadas como $RSA \geq HSA/CSA > MSA/DSA$, es decir, los valores K_D clasificados como $K_{D-RSA} \leq K_{D-HSA}/K_{D-CSA} < K_{D-MSA}/K_{D-DSA}$. Las afinidades en términos de valores K_D son las mismas o ligeramente más bajas (pero en el mismo orden de magnitud) que la afinidad obtenida para PEP06923 (polipéptido no inventivo).

Ejemplo 8:

Actividad in vitro de variantes de proteína Z fusionada a un polipéptido de unión a albúmina

En este ejemplo, polipéptidos que comprenden variantes de proteína Z específica a citocinas (derivadas del dominio B de proteína A estafilocócica) fusionadas genéticamente a la variante de polipéptido de unión a albúmina PP013 (SEQ ID NO:13) fueron ensayados en cuanto a su funcionalidad, siendo esta bloquear la proliferación inducida por citocinas de células TF-1 en presencia de albúmina de suero humano. La proliferación de células TF-1 es dependiente de la presencia de cualquiera de varios tipos diferentes de citocinas, y la respuesta proliferativa puede ser inhibida por reactivos bloqueantes tales como la correspondiente variante de proteína Z específica a citocina. Se usó PP013 fusionado a una variante de proteína Z con especificidad por una proteína irrelevante como control negativo.

Materiales y Métodos

Clonación de proteínas de fusión Z - PP013

Fragmentos génicos de variantes de proteína Z con especificidad por citocina X o Y respectivamente, o por una proteína irrelevante (control negativo), fueron amplificados por PCR usando cebadores que añadían sitios de endonucleasa específicos a *Pst*I y *Acc*I. Los fragmentos fueron escindidos con *Pst*I y *Acc*I, purificados y ligados a un vector de expresión, el plásmido pAY02747, restringido con las mismas enzimas. El pAY02747 contiene un origen de replicación de pBR322, un gen de resistencia a la kanamicina y un promotor de T7 para la expresión del gen de interés. El sitio de clonación está precedido por una secuencia que codifica los aminoácidos MGSSLQ y sucedido por una secuencia que codifica VDSS-PP013, donde PP013 es el polipéptido de unión a albúmina descrito, con SEQ ID NO:13. La ligación, transformación y verificación de secuencia se realizaron como se describió anteriormente. Las proteínas codificadas fueron:

1) MGSSLQ-Z_X-VDSS-PP013 (designada como Z_X-PP013)

2) MGSSLQ-Z_Y-VDSS-PP013 (designada como Z_Y-PP013)

3) MGSSLQ-Z_{neg}-VDSS-PP013 (designada como Z_{neg}-PP013)

Expresión de proteínas

Se expresaron Z_X-PP013, Z_Y-PP013 y Z_{neg}-PP013 en células de *E. coli* BL21 (DE3). Se usaron colonias de las transformaciones de cada variante de fusión para inocular cultivos iniciadores de 50 ml de medio TSB+YE suplementado con kanamicina hasta una concentración de 50 µg/ml. Los cultivos se cultivaron a 37 °C durante una noche con agitación, 100 rpm. Después se usaron los cultivos iniciadores para inocular 900 ml de medio TSB+YE suplementado con kanamicina hasta una concentración de 50 µg/ml. Los cultivos se cultivaron durante aproximadamente 1,5 h hasta un OD₆₀₀ de >1,1, tras lo cual se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,2 mM. Se continuó el cultivo durante cinco horas. Los gránulos de células fueron recolectados por centrifugación (15.600 g, 4 °C, 20 minutos) y almacenados a -20 °C hasta la purificación.

Purificación de la proteína

Los gránulos de células congelados que albergaban las variantes de proteínas de fusión solubles Z_X-PP013, Z_Y-PP013 y Z_{neg}-PP013 fueron resuspendidos en Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8 y se añadieron 1.000 U de Benzonase® (Merck N° de Cat. 1.01654.0001). Las células fueron disgregadas por ultrasonificación y, para cada una de las variantes de proteínas de fusión, la suspensión ultrasonificada fue aclarada por centrifugación (15 min, 37.000 g, 4 °C). Se añadió 20x de tampón TST (20x [Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, NaCl 200 mM, Tween 20 al 0,05% , pH 8,0]) a un volumen que dio como resultado 1 × tampón TST en la suspensión aclarada. Cada muestra de variante de proteína de fusión fue cargada sobre una columna de HSA-Sepharose (GE Healthcare). Después de lavar con tampón TST, seguido de NH₄Ac 5 mM, pH 5,5, la variante de proteína de fusión unida se eluyó con HAc 0,5 M, pH 2,5.

Las variantes de proteínas de fusión fueron purificadas adicionalmente por cromatografía de fase inversa (RPC), como sigue. Para cada una de las variantes, el eluato de la etapa de purificación por afinidad a HSA se cargó en una columna Resource 15 RPC de 1 ml (GE Healthcare), equilibrada previamente con Tampón RPC A (TFA al 0,1 % en agua). Después del lavado de la columna con 10 VC de Tampón RPC A y 5 VC de Tampón RPC B (TFA al 0,1 % en acetonitrilo), las proteínas de fusión unidas fueron eluidas con un gradiente lineal de 10-50 % de Tampón RPC B sobre 20 VC. El caudal fue 2 ml/min y la absorbancia a 280 nm fue monitorizada. Las fracciones que contenían variantes de proteínas de fusión puras fueron identificadas por análisis SDS-PAGE y reunidas. Finalmente, el tampón fue cambiado a 1xPBS (KCl 2,68 mM, NaCl 137 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, pH 7,4) usando una columna de desalación PD-10 desechable (GE Healthcare). Para verificar la identidad de las variantes de proteínas de fusión, se realizaron análisis SDS-PAGE y LC/MS como se describe en el Ejemplo 1.

Ensayo celular in vitro de proteínas de fusión Z- PP013

La línea celular TF-1 (CLS N° de Cat. 300434) fue propagada como recomienda el proveedor en medio RPMI 1640 + suero de ternero fetal al 10% (Gibco) con la adición de 2 ng/ml de rhGM-CSF (Miltényi). En el día del experimento, se lavaron las células en medio RPMI 1640 + suero de ternero fetal al 10% para retirar GM-CSF.

La capacidad de Z_X-PP013 y Z_Y-PP013 para bloquear la proliferación inducida por citocinas se analizó mezclando las moléculas Z_X-PP013, Z_Y-PP013 y Z_{neg}-PP013 con citocinas X e Y respectivamente, y con un exceso molar de cinco veces de HSA (Albucult®, Novozymes). Las moléculas fueron tituladas en una serie de dilución de 2 veces con una concentración fija de citocina (4,9 pM) y un exceso molar de cinco veces de HSA. La titulación se realizó en placas de 96 pocillos en un volumen de 100 µl. Se añadieron 25.000 células por pocillo (100 µl) y las placas se incubaron a 37 °C, 5% de CO₂ durante tres días. Para medir la proliferación, se añadieron por pocillo 19 µl de reactivo de proliferación celular CCK-8 (Sigma) diluido dos veces en medio RPMI 1640 + suero de ternero fetal al

10%. La reacción de color fue monitorizada después de 4 horas usando un lector de placas de 96 pocillos (Victor3; PerkinElmer).

Resultados

- 5 Como se muestra en la Figura 8, tanto Z_X-PP013 como Z_Y-PP013 inhibieron la proliferación inducida por citocina respectiva en presencia de HSA, mientras que Z_{neg}-PP013, el control negativo, no afectó a la proliferación de TF-1. Por tanto, el experimento muestra que la función de las moléculas Z fue retenida cuando estaban incorporadas en una proteína de fusión que contenía el polipéptido de unión a albúmina, y también cuando las proteínas de fusión estaban unidas a albúmina.

Ejemplo 9:

- 10 Estabilidad a largo plazo de un polipéptido de unión a albúmina

En este ejemplo, la estabilidad de PEP07986 (SEQ ID NO:163), expresada y purificada como se describe en el Ejemplo 1, fue investigada después de un almacenamiento a 4, 25 y 40 °C durante hasta tres meses. El estado del polipéptido después del almacenamiento fue investigado midiendo su unión a HSA usando un instrumento Biacore.

Material y métodos

- 15 Se disolvió PEP07986 liofilizado en tampón NaPi estéril (fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 7,2) a una concentración de 2 mg/ml. Se retiró una muestra de referencia (tiempo = 0) y se almacenó a -80 °C. Se almacenaron alícuotas de 105 µl en tubos eppendorf estériles con tapón de rosca sellados con parafilm a 4, 25 y 40 °C. Después de una semana, dos semanas, un mes y tres meses, se enfrió una muestra almacenada a cada temperatura hasta 4 °C, se centrifugó durante 5 min a 13.000 rpm y después se almacenó a -80 °C esperando el análisis Biosensor.

El análisis biosensor se realizó esencialmente como se describe en el Ejemplo 2 pero con HSA (Albucult®, Novozymes), inmovilizada a 704 unidades de resonancia (UR) y la variante de polipéptido de unión a albúmina se diluyó hasta 10 nM y se inyectó a un caudal constante de 20 µl/min durante 10 minutos, seguido de inyección de HBS-EP durante 10 minutos.

- 25 Resultados

La unión a HSA de PEP07986 (SEQ ID NO:163) fue retenida después de un almacenamiento a 4, 25 y 40 °C durante al menos tres meses. Las respuestas de unión a HSA máximas obtenidas para PEP07986 almacenado en las diversas condiciones se muestran en la Figura 9.

Ejemplo 10:

- 30 Estabilidad de un polipéptido de unión a albúmina bajo condiciones extremas

- En este ejemplo, se describe un análisis biosensor y de dicroísmo circular (CD) del polipéptido de unión a albúmina PEP08296 (PEP08185 conjugado con DOTA, SEQ ID NO:148) después de un tratamiento con calor (90 °C) en tampón de pH bajo (~4,0). Dado que tales condiciones de reacción extremas tienen que ser usadas por ejemplo para el marcado con ⁶⁸Ga de proteínas modificadas con DOTA, la influencia del tratamiento con alto calor y bajo pH sobre la identidad estructural del polipéptido y su capacidad para unirse a HSA fue investigada midiendo la temperatura de fusión (T_m), las propiedades de repliegado y la unión a HSA.

Material y métodos

Análisis biosensor de la estabilidad al calor

- Se realizó un análisis biosensor en un instrumento Biacore 2000 (GE Healthcare) con HSA (Albucult®, Novozymes) inmovilizada por acoplamiento de amina sobre la capa de dextrano carboxilado de las superficies del chip CM-5 (calidad investigación; GE Healthcare) según las recomendaciones del fabricante. La superficie 1 del chip fue activada y desactivada y usada como celda de referencia (superficie blanco) durante las inyecciones, mientras que la superficie 2 comprendió HSA inmovilizada a 724 unidades de resonancia (UR). Se diluyó PEP08296 (50 µl, 100 µg) en un tubo Falcon de 15 ml con 450 µl de acetato de sodio 0,2 M (NaAc) pH 5,5 hasta una concentración de péptido final de 0,2 mg/ml. Después de la adición de 1,5 ml de HCl 0,05 M (lo que es similar a las condiciones y volumen usados para eluir un generador de ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga) la muestra se incubó durante 10 minutos a 90 °C o TA (control) y después se transfirió a TA. Se añadieron 6 ml de citrato de sodio 0,1 M para neutralizar el pH. El PEP08296 tratado con calor (0,8 y 4 nM) se inyectó a un caudal constante de 50 µl/min durante 5 minutos, seguido de disociación en HBS-EP durante 15 minutos. Las superficies fueron regeneradas con una inyección de 25 µl de HCl 10 mM. Los resultados se analizaron con un programa informático BIAevaluation (GE Healthcare). Las curvas de la superficie blanco se restaron de las curvas de las superficies de los ligandos.

Determinación de la temperatura de fusión (T_m)

Se disolvió PEP08296 en PBS hasta una concentración final de 0,5 mg/ml. Se preparó PBS con un pH de aproximadamente 4,0 añadiendo 9,5 µl de HCl 100 mM a 100 µl de PBS. El análisis de dicroísmo circular (CD) se realizó como se describe en el Ejemplo 3.

5 Análisis CD de estabilidad al calor

Para investigar la reversibilidad estructural de PEP08296 después del tratamiento con calor, se registraron dos espectros CD entre 195 y 250 nm por muestra a 20 °C. Después del primer espectro, se ejecutó un ciclo VTM con calentamiento hasta 90 °C como se describe anteriormente, seguido de la recogida del segundo espectro CD entre 195 y 250 nm a 20 °C. Además, se incubó el PEP08296 en tampón PBS pH 4,0 o tampón PBS pH 7,2 durante 12 minutos a 90 °C en un termomezclador (500 rpm, intervalo de mezcla 10 s encendido, 30 s apagado). Después de la incubación, las muestras fueron enfriadas en hielo, seguido de centrifugación a 13.000 rpm durante 1 minuto, y se registró un espectro CD entre 195 y 250 nm a 20 °C.

Resultados

Se usó un análisis biosensor para investigar si el tratamiento con calor en combinación con pH bajo, es decir, las condiciones comunes necesitadas para el marcado con ⁶⁸Ga del polipéptido, afectarían a la capacidad de PEP08296 de unirse a HSA. La Figura 10 muestra el resultado de este análisis de unión realizado con un instrumento Biacore 2000. Dos concentraciones diferentes de PEP08296, 0,8 nM y 4 nM, se inyectaron sobre una superficie con 724 UR de albúmina de suero humano inmovilizada. El tratamiento con calor durante 10 min a 90 °C, pH 4,0, redujo ligeramente la capacidad de unión de PEP08296 a HSA, indicando un cambio estructural potencial de la molécula.

Se usó CD para investigar además el cambio estructural potencial de la molécula. Espectros CD similares antes y después del calentamiento probarían que una muestra es estructuralmente reversible. En el primer experimento, las muestras fueron calentadas con un gradiente de temperatura de 20 °C a 90 °C. Los espectros CD antes y después del tratamiento con calor fueron similares en el experimento de determinación de T_m con los mínimos típicos a 207 y 221 nm, indicando α-helicidad, es decir, el calentamiento de tiempo corto hasta 90 °C en tampón de pH 4 o bien pH 7,2 no tuvo efecto sobre la estructura de PEP08296.

Sin embargo, el pretratamiento de PEP08296 durante 12 minutos a 90 °C mostró un contenido de hélice alfa ligeramente reducido de PEP08296 si se incubó a pH 4,0, pero sin cambio en el contenido de hélice alfa si se incubó a pH 7,2. Las superposiciones típicas de los dos espectros CD antes y después del calentamiento se muestran en la Figura 11.

Los resultados de la determinación de la temperatura de fusión (T_m) se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. T_m de PEP08296

Designación	T _m (°C)
PEP08296 a pH 7,2	59
PEP08296 a pH 4,0	62

Ejemplo 11:

Obtención de imágenes de acumulación de sangre usando un polipéptido de unión a albúmina marcado con ⁶⁸Ga

En los experimentos que constituyen este ejemplo, la distribución en cuerpo entero de PEP08296 marcado con ⁶⁸Ga (PEP08185 conjugado con DOTA, SEQ ID NO:148) en ratas fue seguida por la obtención dinámica de imágenes a lo largo de 1,5 horas. Debido a la fuerte asociación entre el polipéptido marcado y la albúmina de suero, el polipéptido marcado se puede usar por ejemplo para estudiar la acumulación de sangre y la permeabilidad tisular.

Material y métodos

40 Marcado con ⁶⁸Ga de PEP08296

Se eluyó ⁶⁸Ga como ⁶⁸GaCl₃ del generador de ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga (Obninsk, Rusia) con HCl 0,1 M, se convirtió en ⁶⁸GaCl₄- con HCl concentrado, se atrapó en una columna de intercambio aniónico (Chromafix-HCO₃) y posteriormente se eluyó con agua de 18 MΩ, como se describió previamente (Velikyan et al (2008), Nucl Med Biol 35:529-536).

El marcado se realizó esencialmente como se describe en Tolmachev et al. (EJNMMI 37:1356-1367, 2010). El eluato de ⁶⁸Ga concentrado (150-200 µl) se añadió a PEP08296 (≥100 µg en tampón de acetato de sodio 0,2 M pH 5,5) y el

pH se ajustó a 3,5-4 usando acetato de sodio (1,25 M) o HCl (0,1 M). La mezcla marcadora se incubó a 90 °C durante 15 min antes de enfriar, y la proteína marcada se aisló por purificación de exclusión de tamaños en una columna NAP-5 eluida con suero salino tamponado fisiológicamente.

- 5 La pureza radioquímica e identidad de la proteína marcada con ^{68}Ga fue evaluada por radio-HPLC usando detectores UV (210 nm) y de radioactividad en serie y una columna Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare) eluida con suero salino tamponado fisiológicamente.

PET de animales pequeños

- 10 Se anestesió una rata (277 g) con isoflurano (inicialmente 5 %, después 2 % mezclado con 7:3 aire/ O_2), controlado por un vaporizador E-Z usando máscaras no re-respiradoras Microflex de Euthanex Corporation, y se mantuvo en una almohadilla calefactora (37 °C) mientras se tumbaba dentro de un sistema microPET Focus120 (Siemens, CTI Concorde Microsystems). Se dispensó en una jeringuilla ^{68}Ga -PEP08296, 33 MBq, diluido con suero salino hasta 0,5 ml, y se inyectó por la vena de la cola. Se adquirieron datos del cuerpo entero moviendo el lecho en un protocolo de movimiento de lecho constante durante 1,5 h. Los datos fueron procesados con MicroPET Manager y corregidos para aleatorios, tiempo muerto y decaimiento. Se reconstruyeron imágenes por proyección de fondo filtrado 2D estándar usando un filtro rampa, y se evaluaron usando el programa informático Inveon Research Workplace (Siemens Medical Solutions).

Resultados

- 20 Los patrones de distribución básicos (Figura 12) para PEP08296 fueron muy similares al de la albúmina marcada con radioisótopos tales como ^{68}Ga -DOTA, ^{64}Cu -DOTA y ^{11}C (véase p.ej. Hoffend et al (2005), Nucl Med Biol 32:287-292 y Lu et al (2008), "[1- ^{11}C]Butanol and [Methyl- ^{11}C]Albumin for Blood Flow and Blood Pool Imaging", participante en el XIth Turku PET Symposium, 24-27 de mayo de 2008). En breve, se observaron altas concentraciones de radioactividad en vasos sanguíneos principales en todo el barrido. Los órganos con grandes volúmenes de sangre (hígado, bazo y riñón) también estuvieron delineados claramente, como lo fue la radiactividad de la acumulación de sangre cardiaca. La radioactividad en la vejiga urinaria aumentó durante el periodo de observación, siendo esta observación de eliminación renal consistente con observaciones previas con trazadores basados en albúmina marcada y con la del metabolismo de albúmina en sí.

- 30 El patrón de distribución general de radioactividad y el muy lento aclaramiento en plasma después de la inyección intravenosa de ^{68}Ga -PEP08296 es consistente con su esperada unión muy rápida y fuerte con la albúmina. Estos resultados por lo tanto apoyan aplicaciones adicionales del radiotrazador como agente de obtención de imágenes de acumulación de sangre *in vivo* para el uso con estudios de tomografía de emisión de positrones de permeabilidad tisular, tanto durante el desarrollo de enfermedad como durante intervención terapéutica.

Ejemplo 12:

Solubilidad de un polipéptido de unión a albúmina

- 35 La solubilidad de PEP07986 (SEQ ID NO:163) en tampón fisiológico fue investigada por concentraciones consecutivas de la muestra usando ultrafiltración, seguido de medida de concentración e investigación del estado de agregación. Las concentraciones determinadas por lecturas directas de absorbancia a 280 nm fueron consistentes con las concentraciones determinadas por filtración en gel, mostrando una solubilidad de no más que 42 mg/ml, sin agregados detectados.

Material y métodos

- 40 Se disolvió PEP07986 liofilizado en tampón NaPi (fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 7,2) a una concentración de 3 mg/ml. Se pre-enjuagaron unidades filtradoras centrífugas Amicon Ultra, con corte de 3 kDa, (Millipore, N° de Cat. UFC800324) con 2 ml de tampón NaPi por centrifugación a 4.000 g durante 20 min en una centrífuga de rotor de palas oscilantes (Multifuge, Heraeus). Se aplicaron 1.620 μl de 3 mg/ml de PEP07986 a una primera unidad filtradora centrífuga y se realizó la centrifugación a 4.000 g, 20 °C, durante 7 min. Se retiró una muestra de 25 μl (muestra 1 UF) para análisis adicional, y el resto de la muestra se transfirió a una segunda unidad filtradora centrífuga. La centrifugación y retirada de muestra se repitió tres veces con tiempos de giro de 8, 9 y 20 min respectivamente (muestra UF 2, 3 y 4 respectivamente). Las lecturas de absorbancia se realizaron usando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 y diluyendo las muestras UF 1-4 en tampón NaPi 2, 4, 6 y veces respectivamente. Las concentraciones se calcularon usando el coeficiente de extinción 1 Abs 280 = 1,955 mg/ml. La filtración en gel se realizó en un sistema 1100 HPLC (Agilent Technologies) usando una columna Superdex75 10/300 GL (GE Healthcare) que había sido equilibrada en tampón NaPi. Se aplicaron 10 μl de cada muestra UF a la columna; Se usó tampón NaPi como tampón de ejecución, y el caudal fue 0,5 ml/min. Se recogió también un cromatograma de la ovalbúmina de peso molecular estándar (GE Healthcare), inyectada a una concentración de 5 mg/ml. Las concentraciones se determinaron integrando el área bajo la curva.

55

Resultados

5 Las concentraciones determinadas por lecturas directas de absorbancia a 280 nm y las concentraciones determinadas por filtración en gel se muestran en la Tabla 5. La solubilidad de PEP07986 (SEQ ID NO:163) es al menos 42 mg/ml en tampón fisiológico (fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 7,2). No se detectaron agregados por filtración en gel, como muestra la Figura 13.

Tabla 5. Concentraciones determinadas después de la concentración consecutiva de PEP07986 (SEQ ID NO:163)

Muestra	Concentraciones (mg/ml) determinadas por	
	Espectrofotómetro	Filtración en gel
UF2	12,1	12,4
UF3	22,2	22,1
UF4	42,7	42,6

Listado de secuencias

<110> AFFIBODY AB

5 <120> POLIPÉPTIDOS

<130> 21052821

<150> US 61/399.285

10 <151> 09-07-2010

<150> US 61/403.561

<151> 17-09-2010

15 <160> 203

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 1

Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

30 <210> 2

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 2

40 Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 3

<211> 46

45 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 3

Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

5 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 4

<211> 46

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

15 <400> 4

Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 5

20 <211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 5

Leu Ala Ser Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 6

<211> 46

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

40 <400> 6

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Ser Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

5 <210> 7
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 7

Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 8
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 8

25 Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

30 <210> 9
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 9

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 10

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 10

Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 11

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 11

Leu Ala Ser Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

25 <210> 12

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 12

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Ser Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 13

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 13

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro

15 35 40 45

<210> 14

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 14

25 <210> 15

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 15

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 15

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 16

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 16

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15

<210> 17

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 17

25

Leu Ala Glu Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 18

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 18

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 19

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 19

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 20

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 20

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

25 <210> 21

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 21

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 22

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 22

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 23

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 23

Leu Ala Glu Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 24

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 24

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro

35 40 45

<210> 25

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 25

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 26

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 26

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 27

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 27

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

5 <210> 28
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 28

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

15 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 29
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 29

25 Leu Ala Gln Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

30 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 30
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 30

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Gln Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 31

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 31

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 32

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 32

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 33

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 33

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 34

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 34

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 35

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 35

Leu Ala Gln Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro

35

40

45

<210> 36

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 36

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Gln Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 37

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 37

Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 38

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 38

Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

25 Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 39

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 39

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 40

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 40

Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 41

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 41

Leu Ala Ser Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 42

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 42

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Ser Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 43

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 43

Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 44

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 44

Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 45

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 45

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 46

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 46

Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro

35

40

45

15

<210> 47

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 47

25

Leu Ala Ser Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 48

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 48

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Ser Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 49

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 49

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15

<210> 50

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 50

25

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 51

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 51

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 52

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 52

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 53

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 53

Leu Ala Glu Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 54

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 54

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 55

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 55

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 56

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 56

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 57

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 57

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

5 <210> 58
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 58

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

15 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 59
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 59

25 Leu Ala Glu Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

30 <210> 60
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 60

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 61

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 61

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 62

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 62

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 63

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 63

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 64

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 64

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 65

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 65

Leu Ala Gln Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 66

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 66

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Gln Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 67

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 67

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 68

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 68

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro

35

40

45

<210> 69

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 69

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 70

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 70

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 71

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 71

Leu Ala Gln Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

25 Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 72

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 72

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Gln Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 73

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 73

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 74

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 74

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 75

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 75

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 76

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 76

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 77

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 77

Leu Ala Cys Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

25 <210> 78

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 78

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Cys Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 79

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 79

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 80

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 80

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 81

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 81

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 82

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 82

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15

<210> 83

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 83

25

Leu Ala Cys Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 84

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 84

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Cys Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 85

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 85

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 86

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 86

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

25 <210> 87

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 87

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 88

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 88

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 89

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 89

Leu Ala Cys Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 90

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 90

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Cys Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

5 <210> 91
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado
<400> 91

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

15 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

20 <210> 92
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado
<400> 92

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

30 <210> 93
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado
<400> 93

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

5 <210> 94
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 94

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 95
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 95

25 Leu Ala Cys Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

30 <210> 96
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 96

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Cys Ala Lys Ser Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 97

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 97

Leu Ala Gln Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 98

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 98

Leu Ala Gln Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 99

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 99

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Gln Ala Lys Cys Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 100

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 100

Leu Ala Gln Ala Lys Cys Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 101

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 101

Leu Ala Gln Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 102

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 102

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Gln Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 103

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 103

Leu Ala Gln Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 104

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 104

Leu Ala Gln Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

25 Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 105

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 105

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Gln Ala Lys Cys Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 106

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 106

Leu Ala Gln Ala Lys Cys Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 107

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 107

Leu Ala Gln Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 108

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 108

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Gln Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 109

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 109

Leu Ala Ser Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 110

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 110

Leu Ala Ser Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 111

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 111

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Ser Ala Lys Cys Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 112
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 112

Leu Ala Ser Ala Lys Cys Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 113
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 113

Leu Ala Ser Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 114
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 114

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Ser Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 115

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 115

Leu Ala Ser Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15

<210> 116

<211> 46

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 116

25

Leu Ala Ser Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 117

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35

<400> 117

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Ser Ala Lys Cys Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 118

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 118

Leu Ala Ser Ala Lys Cys Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 119

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 119

Leu Ala Ser Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

25 <210> 120

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 120

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Ser Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 121

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 121

Leu Ala Glu Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 122

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 122

Leu Ala Glu Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

25 <210> 123

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 123

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Cys Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro

35 40 45

<210> 124

5 <211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 124

Leu Ala Glu Ala Lys Cys Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 125

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 125

25 Leu Ala Glu Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly

1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 126

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 126

<210> 126

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 126

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

5 <210> 127
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 127

Leu Ala Glu Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 128
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 128

25 Leu Ala Glu Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

30 <210> 129
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 129

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Cys Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 130

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

10

<400> 130

Leu Ala Glu Ala Lys Cys Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 131

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 131

Leu Ala Glu Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

25

<210> 132

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 132

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 133
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 133

Leu Ala Cys Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 134
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 134

Leu Ala Cys Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 135
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 135

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Cys Ala Lys Cys Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 136

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 136

Leu Ala Cys Ala Lys Cys Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 137

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 137

Leu Ala Cys Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

25 Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 138

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 138

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Cys Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 139

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 139

Leu Ala Cys Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 140

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 140

75

25 <210> 141

Leu Ala Cys Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 141

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 141

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Cys Ala Lys Cys Ser Ala Asn Ser Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 142

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 142

Leu Ala Cys Ala Lys Cys Ser Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 143

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 143

Leu Ala Cys Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

25 <210> 144

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 144

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Cys Ala Lys Cys Ala Ala Asn Ser Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 145

<211> 49

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 145

Gly Ser Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser
1 5 10 15

Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr
20 25 30

Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

Gly

15 <210> 146

<211> 49

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 146

25 <210> 147

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial

Gly

<210> 147

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

Gly

<210> 147

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

ES 2 540 114 T3

<400> 147

Gly Ser Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys
1 5 10 15

Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr
20 25 30

Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

Gly

5

<210> 148

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 148

15

Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys
1 5 10 15

Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr
20 25 30

Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

Gly

<210> 149

<211> 50

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

25

<400> 149

Gly Ser Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser
1 5 10 15

Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr
20 25 30

Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

Cys Gly
50

<210> 150
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado
 <400> 150
 10
 Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr
 20 25 30
 Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45
 Cys Gly
 50
 <210> 151
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado
 20
 <400> 151
 Gly Cys Ser Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp
 1 5 10 15
 Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys
 20 25 30
 Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu
 35 40 45
 Pro Gly
 50
 25
 <210> 152
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado
 <400> 152

ES 2 540 114 T3

Gly Cys Ser Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp
1 5 10 15

Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys
20 25 30

Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu
35 40 45

Pro Gly
50

5 <210> 153
<211> 47
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 153

Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr
1 5 10 15

Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val
20 25 30

15 Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 154
<211> 49
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 154

25 Gly Ser Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp
1 5 10 15

Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys
20 25 30

Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu
35 40 45

Pro

30 <210> 155
<211> 49
<212> PRT
<213> Artificial I

<220>

ES 2 540 114 T3

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 155

Gly Ser Ser Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp
1 5 10 15

Ala Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys
20 25 30

Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu
35 40 45

5 Pro

<210> 156

<211> 49

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

15 <400> 156

Gly Ser Ser Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys
20 25 30

Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu
35 40 45

Pro

<210> 157

20 <211> 47

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 157

Gly Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr
1 5 10 15

Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val
20 25 30

Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

30

<210> 158

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

5

<400> 158

Gly Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr
1 5 10 15

Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val
20 25 30

Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

10

<210> 159

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 159

Gly Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr
1 5 10 15

Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val
20 25 30

Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

20

<210> 160

<211> 47

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

30

<400> 160

Ala Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr
1 5 10 15

Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val
20 25 30

Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

35

<210> 161

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 540 114 T3

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 161

Gly Ser Ser Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp
1 5 10 15

Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys
20 25 30

Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu
35 40 45

5 Pro

<210> 162

<211> 48

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

15 <400> 162

Gly Ser Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser
1 5 10 15

Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr
20 25 30

Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

20 <210> 163

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 163

Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser
1 5 10 15

Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr
20 25 30

Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

30 <210> 164

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 164

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Arg Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

5 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 165

<211> 46

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

15 <400> 165

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Glu Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

20 <210> 166

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 166

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

30 Gly Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 167

<211> 46

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

ES 2 540 114 T3

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 167

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Glu Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

5 Gly Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 168

<211> 46

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

15 <400> 168

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Arg Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Glu Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

20 <210> 169

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 169

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Lys Ala Leu Pro
35 40 45

30 <210> 170

<211> 46

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

40 <400> 170

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ser Leu Pro
35 40 45

5 <210> 171
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 171

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Arg Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

15 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 172
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 172

25 Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Glu Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

30 <210> 173
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 173

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 174

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 174

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Glu Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 175

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 175

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Arg Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Glu Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 176

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 176

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Lys Ala Leu Pro
35 40 45

5 <210> 177
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 177

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

15 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ser Leu Pro
35 40 45

<210> 178
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 178

25 Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Arg Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

30 <210> 179
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 179

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Glu Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

5
<210> 180
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

10
<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 180

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15
<210> 181
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

20
<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 181

25
Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Glu Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

30
<210> 182
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

35
<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 182

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Arg Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Glu Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 183

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 183

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Lys Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 184

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 184

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ser Leu Pro
35 40 45

<210> 185

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 185

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Arg Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 186

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 186

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Glu Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 187

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 187

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro

35

40

45

<210> 188

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 188

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Glu Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 189

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 189

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Arg Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Glu Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 190

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 190

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

25 Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Lys Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 191

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 191

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ser Leu Pro
35 40 45

<210> 192
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 192

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Arg Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 193
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 193

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Glu Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 194
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 194

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 195

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 195

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Glu Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 196

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 196

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Arg Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Glu Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

25 Gly Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 197

<211> 46

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

35 <400> 197

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Lys Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 198

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 198

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ser Leu Pro

15 35 40 45

<210> 199

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 199

25 Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu
35 40 45

<210> 200

<211> 45

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 200

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu
35 40 45

<210> 201
<211> 45
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 201

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu
35 40 45

<210> 202
<211> 45
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 202

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu
35 40 45

<210> 203
<211> 45
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a albúmina diseñado

<400> 203

ES 2 540 114 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu
35 40 45

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de unión a albúmina, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de
i) LAX₃AKEAANA ELDX₁₄YGVSDF YKRLIDKAKT VEGVEALKDA ILAALP
en donde, independientemente uno de otro
- 5 X₃ se selecciona de E y S; y
X₁₄ se selecciona de A, S, C y K;
y
ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad a la secuencia definida en i).
- 10 2. Polipéptido de unión a albúmina según la reivindicación 1, que se une a albúmina de tal modo que el valor k_{off} de la interacción es como máximo 5 x 10⁻⁵ s⁻¹, por ejemplo como máximo 5 x 10⁻⁶ s⁻¹.
3. Polipéptido de unión a albúmina según la reivindicación 1, cuya secuencia de aminoácidos se selecciona de una cualquiera de SEQ ID NO: 1-26, SEQ ID NO:28-29, SEQ ID NO:31-32, SEQ ID NO:34-35, SEQ ID NO:37-62, SEQ ID NO:64-65, SEQ ID NO:67-68, SEQ ID NO:70-71, SEQ ID NO:73-74, SEQ ID NO:76-77, SEQ ID NO:79-80, SEQ ID NO:82-83, SEQ ID NO:85-86, SEQ ID NO:88-89, SEQ ID NO:91-92, SEQ ID NO:94-95, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:109-110, SEQ ID NO:112-116, SEQ ID NO:118-122, SEQ ID NO:124-128, SEQ ID NO:130-13 SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:164-167, SEQ ID NO:169-174, SEQ ID NO:176-181, SEQ ID NO:183-188, SEQ ID NO:190-195 and SEQ ID NO:197-203, por ejemplo seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO:1-26, SEQ ID NO:28-29, SEQ ID NO:31-32, SEQ ID NO:34-35, SEQ ID NO:37-62, SEQ ID NO:64-65, SEQ ID NO:67-68, SEQ ID NO:70-71, SEQ ID NO:73-74, SEQ ID NO:76-77, SEQ ID NO:79-80, SEQ ID NO:82-83, SEQ ID NO:85-86, SEQ ID NO:88-89, SEQ ID NO:91-92, SEQ ID NO:94-95, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:109-11 SEQ ID NO:112-116, SEQ ID NO:118-122, SEQ ID NO:124-128, SEQ ID NO:130-133, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:139 y SEQ ID NO:143.
- 15 4. Polipéptido de unión a albúmina según la reivindicación 3, cuya secuencia de aminoácidos se selecciona de una cualquiera de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49 y SEQ ID NO:55.
- 20 5. Polipéptido de unión a albúmina según cualquier reivindicación precedente, que se une a albúmina de suero humano.
6. Proteína de fusión o conjugado, que comprende
i) un primer resto que consiste en un polipéptido de unión a albúmina según cualquier reivindicación precedente; y
ii) un segundo resto que consiste en un polipéptido que tiene una actividad biológica deseada.
- 25 7. Polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado según cualquier reivindicación precedente, que comprende además una etiqueta.
8. Polinucleótido que codifica un polipéptido de unión a albúmina o una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 30 9. Método para producir un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende expresar un polinucleótido según la reivindicación 8.
10. Método para producir un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 por síntesis peptídica no biológica usando aminoácidos y/o derivados de aminoácidos que tienen cadenas laterales reactivas protegidas, comprendiendo la síntesis peptídica no biológica
- 40 acoplamiento por etapas de los aminoácidos y/o los derivados de aminoácidos para formar un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que tiene cadenas laterales reactivas protegidas,
retirada de los grupos protectores de las cadenas laterales reactivas del polipéptido, y
plegado del polipéptido en disolución acuosa.
11. Proteína de fusión o conjugado según la reivindicación 6, para uso como medicamento.
- 45 12. Proteína de fusión o conjugado según la reivindicación 6, para uso en diagnóstico.
13. Composición, que comprende

un compuesto que *per se* tiene una solubilidad en agua de no más que 100 µg/ml; acoplado a

un polipéptido de unión a albúmina, una proteína de fusión o conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el compuesto y el polipéptido de unión a albúmina, una proteína de fusión o conjugado están acoplados covalentemente.

5 14. Método de preparación de una composición según la reivindicación 13, que comprende

a) proporcionar un compuesto que *per se* tiene una solubilidad en agua de no más que 100 µg/ml; y

b) acoplar covalentemente el compuesto a un polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, formando así una composición que comprende un complejo covalente de compuesto y polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado.

10 15. Método para aumentar la solubilidad acuosa de un compuesto, que comprende

proporcionar un compuesto que *per se* tiene una solubilidad en agua de no más que 100 µg/ml;

acoplar covalentemente el compuesto a un polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, formando así un complejo covalente de compuesto y polipéptido de unión a albúmina; y

15 mezclar dicho complejo de compuesto y polipéptido de unión a albúmina, proteína de fusión o conjugado con albúmina bajo condiciones que promuevan la asociación no covalente del polipéptido de unión a albúmina con albúmina de suero humano;

por lo que la solubilidad en agua del compuesto en dicho complejo es mayor que la solubilidad en agua del compuesto *per se*.

20

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
PP001	LASAKAANA ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:1
PP002	LASAKAANA ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:2
PP003	LASAKESANS ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:3
PP004	LASAKESANA ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:4
PP005	LASAKSAANA ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:5
PP006	LASAKSAANS ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:6
PP007	LASAKAANA ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:7
PP008	LASAKAANA ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:8
PP009	LASAKESANS ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:9
PP010	LASAKESANA ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:10
PP011	LASAKSAANA ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:11
PP012	LASAKSAANS ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:12
PP013	LAEAKAANA ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:13
PP014	LAEAKAANA ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:14
PP015	LAEAKESANS ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:15
PP016	LAEAKESANA ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:16
PP017	LAEAKSAANA ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:17
PP018	LAEAKSAANS ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:18
PP019	LAEAKAANA ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:19
PP020	LAEAKAANA ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:20
PP021	LAEAKESANS ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:21
PP022	LAEAKESANA ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:22
PP023	LAEAKSAANA ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:23
PP024	LAEAKSAANS ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:24
PP025	LAQAKAANA ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:25
PP026	LAQAKAANA ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:26
PP027	LAQAKESANS ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:27
PP028	LAQAKESANA ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:28
PP029	LAQAKSAANA ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:29
PP030	LAQAKSAANS ELDAYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:30
PP031	LAQAKAANA ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:31
PP032	LAQAKAANA ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:32
PP033	LAQAKESANS ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:33
PP034	LAQAKESANA ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:34
PP035	LAQAKSAANA ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:35
PP036	LAQAKSAANS ELDSYGVSDF YKRLIDKAT VEGVEALRDA ILAALP	SEQ ID NO:36

Figura 1

PP037	LASAKEAANA	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:37
PP038	LASAKEAANS	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:38
PP039	LASAKESANS	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:39
PP040	LASAKESANA	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:40
PP041	LASAKSAANA	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:41
PP042	LASAKSAANS	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:42
PP043	LASAKEAANA	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:43
PP044	LASAKEAANS	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:44
PP045	LASAKESANS	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:45
PP046	LASAKESANA	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:46
PP047	LASAKSAANA	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:47
PP048	LASAKSAANS	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:48
PP049	LAEAKEAANA	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:49
PP050	LAEAKEAANS	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:50
PP051	LAEAKESANS	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:51
PP052	LAEAKESANA	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:52
PP053	LAEAKSAANA	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:53
PP054	LAEAKSAANS	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:54
PP055	LAEAKEAANA	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:55
PP056	LAEAKEAANS	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:56
PP057	LAEAKESANS	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:57
PP058	LAEAKESANA	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:58
PP059	LAEAKSAANA	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:59
PP060	LAEAKSAANS	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:60
PP061	LAQAKEAANA	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:61
PP062	LAQAKEAANS	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:62
PP063	LAQAKESANS	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:63
PP064	LAQAKESANA	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:64
PP065	LAQAKSAANA	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:65
PP066	LAQAKSAANS	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:66
PP067	LAQAKEAANA	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:67
PP068	LAQAKEAANS	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:68
PP069	LAQAKESANS	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:69
PP070	LAQAKESANA	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:70
PP071	LAQAKSAANA	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:71
PP072	LAQAKSAANS	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:72
PP073	LACAKEAANA	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:73

Figura 1

PP074	LACAKEAANS	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:74
PP075	LACAKESANS	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:75
PP076	LACAKESANA	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:76
PP077	LACAKSAANA	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:77
PP078	LACAKSAANS	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:78
PP079	LACAKEAANA	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:79
PP080	LACAKEAANS	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:80
PP081	LACAKESANS	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:81
PP082	LACAKESANA	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:82
PP083	LACAKSAANA	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:83
PP084	LACAKSAANS	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:84
PP085	LACAKEAANA	ELDSYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:85
PP086	LACAKEAANS	ELDSYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:86
PP087	LACAKESANS	ELDSYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:87
PP088	LACAKESANA	ELDSYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:88
PP089	LACAKSAANA	ELDSYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:89
PP090	LACAKSAANS	ELDSYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:90
PP091	LACAKEAANA	ELDAYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:91
PP092	LACAKEAANS	ELDAYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:92
PP093	LACAKESANS	ELDAYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:93
PP094	LACAKESANA	ELDAYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:94
PP095	LACAKSAANA	ELDAYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:95
PP096	LACAKSAANS	ELDAYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:96
PP097	LAQAKCAANA	ELDAYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:97
PP098	LAQAKCAANS	ELDAYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:98
PP099	LAQAKCSANS	ELDAYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:99
PP100	LAQAKCSANA	ELDAYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:100
PP101	LAQAKCAANA	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:101
PP102	LAQAKCAANS	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:102
PP103	LAQAKCAANA	ELDSYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:103
PP104	LAQAKCAANS	ELDSYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:104
PP105	LAQAKCSANS	ELDSYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:105
PP106	LAQAKCSANA	ELDSYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:106
PP107	LAQAKCAANA	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:107
PP108	LAQAKCAANS	ELDKYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:108
PP109	LASAKCAANA	ELDAYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:109
PP110	LASAKCAANS	ELDAYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVZALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:110

Figura 1

PP111	LASAKCSANS ELDAYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:111
PP112	LASAKCSANA ELDAYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:112
PP113	LASAKCAANA ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:113
PP114	LASAKCAANS ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:114
PP115	LASAKCAANA ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:115
PP116	LASAKCAANS ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:116
PP117	LASAKCSANS ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:117
PP118	LASAKCSANA ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:118
PP119	LASAKCAANA ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:119
PP120	LASAKCAANS ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:120
PP121	LAEAKCAANA ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:121
PP122	LAEAKCAANS ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:122
PP123	LAEAKCSANS ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:123
PP124	LAEAKCSANA ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:124
PP125	LAEAKCAANA ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:125
PP126	LAEAKCAANS ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:126
PP127	LAEAKCSANS ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:127
PP128	LAEAKCSANA ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:128
PP129	LAEAKCAANA ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:129
PP130	LAEAKCAANS ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:130
PP131	LAEAKCSANS ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:131
PP132	LAEAKCSANA ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:132
PP133	LAEAKCAANA ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:133
PP134	LAEAKCAANS ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:134
PP135	LAEAKCSANS ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:135
PP136	LAEAKCSANA ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:136
PP137	LAEAKCAANA ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:137
PP138	LAEAKCAANS ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:138
PP139	LAEAKCSANS ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:139
PP140	LAEAKCSANA ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:140
PP141	LAEAKCAANA ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:141
PP142	LAEAKCAANS ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:142
PP143	LAEAKCSANS ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:143
PP144	LAEAKCSANA ELDYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:144
PP145	GSILASAKCAA NAELDSYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:145
PP146	GSILASAKCAA NAELDSYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:146
PP147	GSILASAKCAA NAELDSYGVSDF YKRLIDKANT VEGVEALKDA IIAALP	SEQ ID NO:147

Figura 1

PEP08185	GSLAEAKAA	NAELDCYGV	DFYRLIDKA	KTVGVVEALK	DAILAALPG	SEQ ID NO:148
PP149	GSLASAKAA	NAELDSYGV	DFYRLIDKA	KTVGVVEALK	DAILAALPG	SEQ ID NO:149
PP150	GSLAEAKAA	NAELDSYGV	DFYRLIDKA	KTVGVVEALK	DAILAALPG	SEQ ID NO:150
PP151	GCSLASAKA	ANAELORYGV	SDFYRLIDK	AKTVGVVEAL	KDAILAALPG	SEQ ID NO:151
PP152	GCSLAEAKA	ANAELORYGV	SDFYRLIDK	AKTVGVVEAL	KDAILAALPG	SEQ ID NO:152
PEP07913	GLAEAKVLAN	RELDKYGVS	TYNRLINAK	TVEGVKALID	ETILAALP	SEQ ID NO:153
PEP06923	GSSLAEAKVL	ANRELDKYG	SDFYRLINK	AKTVGVVEAL	KHILAALP	SEQ ID NO:154
PEP07271	GSSLASAKA	ANAELDAYGV	SDFYRLIDK	AKTVGVVEAL	KDAILAALP	SEQ ID NO:155
PEP07554	GSSLASAKA	ANAELDSYGV	SDFYRLIDK	AKTVGVVEAL	KDAILAALP	SEQ ID NO:156
PEP07912	GLASAKAAN	AEILDSYGVSD	FYRLIDKAK	TVEGVKALD	AILAALP	SEQ ID NO:157
PEP07914	GLAEAKAAN	AEILDSYGVSD	FYRLIDKAK	TVEGVKALD	AILAALP	SEQ ID NO:158
PEP07911	GLASAKAAN	AEILDCYGVSD	FYRLIDKAK	TVEGVKALD	AILAALP	SEQ ID NO:159
PEP07834	ALASAKAAN	AEILDCYGVSD	FYRLIDKAK	TVEGVKALD	AILAALP	SEQ ID NO:160
PEP07844	GSSLASAKA	ANAELORYGV	SDFYRLIDK	AKTVGVVEAL	KDAILAALP	SEQ ID NO:161
PEP07983	GSLASAKAA	NAELDSYGV	DFYRLIDKA	KTVGVVEALK	DAILAALP	SEQ ID NO:162
PEP07986	GSLAEAKAA	NAELDSYGV	DFYRLIDKA	KTVGVVEALK	DAILAALP	SEQ ID NO:163
PP164	LAEAKAANR	ELDSYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:164
PP165	LAEAKAANA	ELDSYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:165
PP166	LAEAKAANA	ELDSYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:166
PP167	LAEAKAANA	ELDSYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:167
PP168	LAEAKAANR	ELDSYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:168
PP169	LAEAKAANA	ELDSYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:169
PP170	LAEAKAANA	ELDSYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:170
PP171	LAEAKAANR	ELDAYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:171
PP172	LAEAKAANA	ELDAYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:172
PP173	LAEAKAANA	ELDAYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:173
PP174	LAEAKAANA	ELDAYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:174
PP175	LAEAKAANR	ELDAYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:175
PP176	LAEAKAANA	ELDAYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:176
PP177	LAEAKAANA	ELDAYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:177
PP178	LAQAKAANR	ELDAYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:178
PP179	LAQAKAANA	ELDAYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:179
PP180	LAQAKAANA	ELDAYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:180
PP181	LAQAKAANA	ELDAYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:181
PP182	LAQAKAANR	ELDAYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:182
PP183	LAQAKAANA	ELDAYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:183
PP184	LAQAKAANA	ELDAYGVSD	FYRLIDKANT	VEGVVEALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:184

Figura 1

PP185	LAQAKEAANR	ELDSYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVKALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:185
PP186	LAQAKEAANA	ELDSYGVSDF	YKRLIEKAKT	VEGVKALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:186
PP187	LAQAKEAANA	ELDSYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVKALKEA	ILAAALP	SEQ ID NO:187
PP188	LAQAKEAANA	ELDSYGVSDF	YKRLIEKAKT	VEGVKALKEA	ILAAALP	SEQ ID NO:188
PP189	LAQAKEAANR	ELDSYGVSDF	YKRLIEKAKT	VEGVKALKEA	ILAAALP	SEQ ID NO:189
PP190	LAQAKEAANA	ELDSYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVKALKDA	ILKALP	SEQ ID NO:190
PP191	LAQAKEAANA	ELDSYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVKALKDA	ILASLP	SEQ ID NO:191
PP192	LAQAKEAANR	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVKALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:192
PP193	LAQAKEAANA	ELDCYGVSDF	YKRLIEKAKT	VEGVKALKDA	ILAAALP	SEQ ID NO:193
PP194	LAQAKEAANA	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVKALKEA	ILAAALP	SEQ ID NO:194
PP195	LAQAKEAANA	ELDCYGVSDF	YKRLIEKAKT	VEGVKALKEA	ILAAALP	SEQ ID NO:195
PP196	LAQAKEAANR	ELDCYGVSDF	YKRLIEKAKT	VEGVKALKEA	ILAAALP	SEQ ID NO:196
PP197	LAQAKEAANA	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVKALKDA	ILKALP	SEQ ID NO:197
PP198	LAQAKEAANA	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVKALKDA	ILASLP	SEQ ID NO:198
PP199	LAQAKEAANA	ELDSYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVKALKDA	ILAAAL	SEQ ID NO:199
PP200	LAQAKEAANA	ELDAYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVKALKDA	ILAAAL	SEQ ID NO:200
PP201	LAQAKEAANA	ELDSYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVKALKDA	ILAAAL	SEQ ID NO:201
PP202	LAQAKEAANA	ELDSYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVKALKDA	ILAAAL	SEQ ID NO:202
PP203	LAQAKEAANA	ELDCYGVSDF	YKRLIDKAKT	VEGVKALKDA	ILAAAL	SEQ ID NO:203

Figura 1

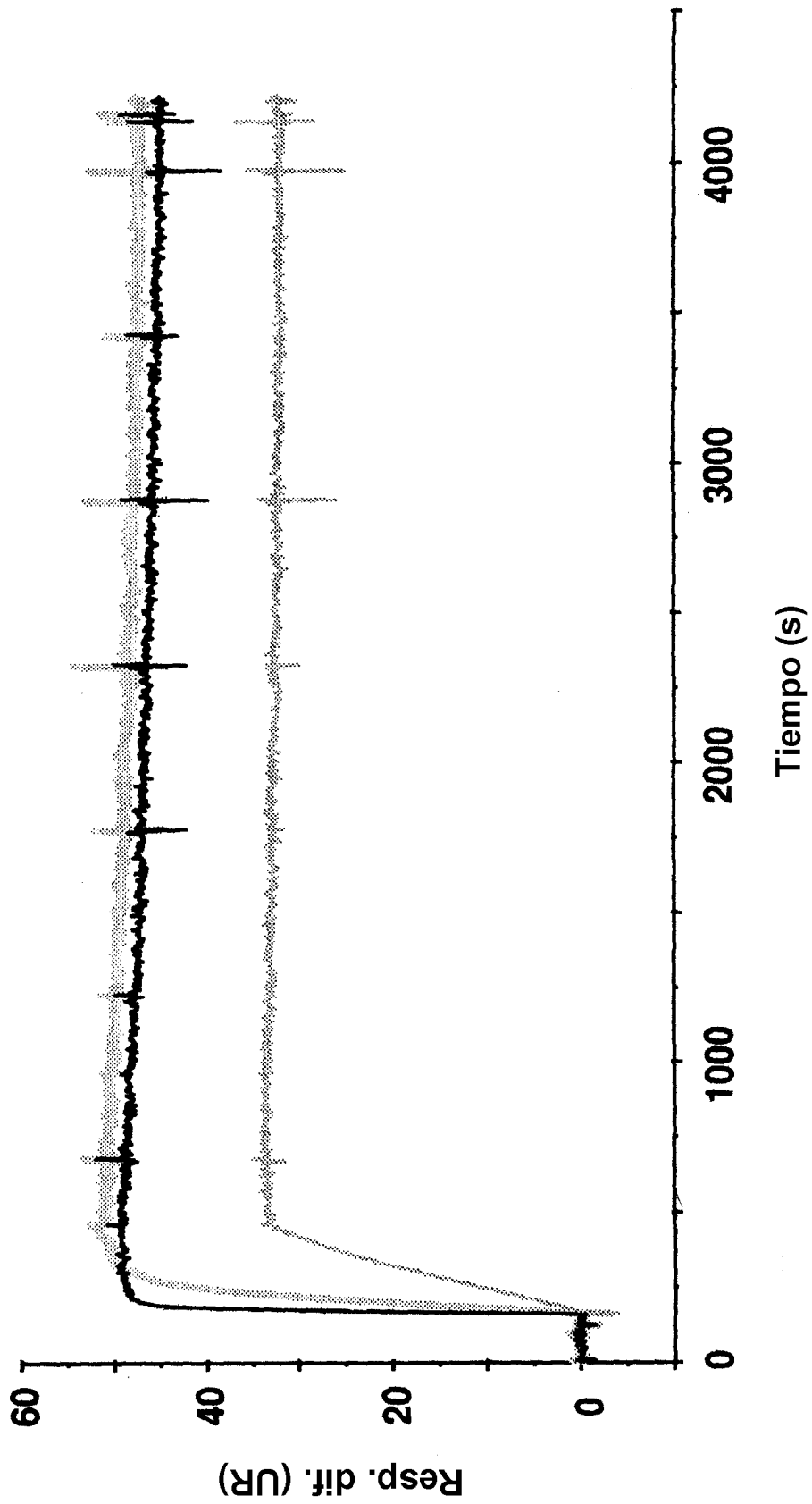


Figura 2

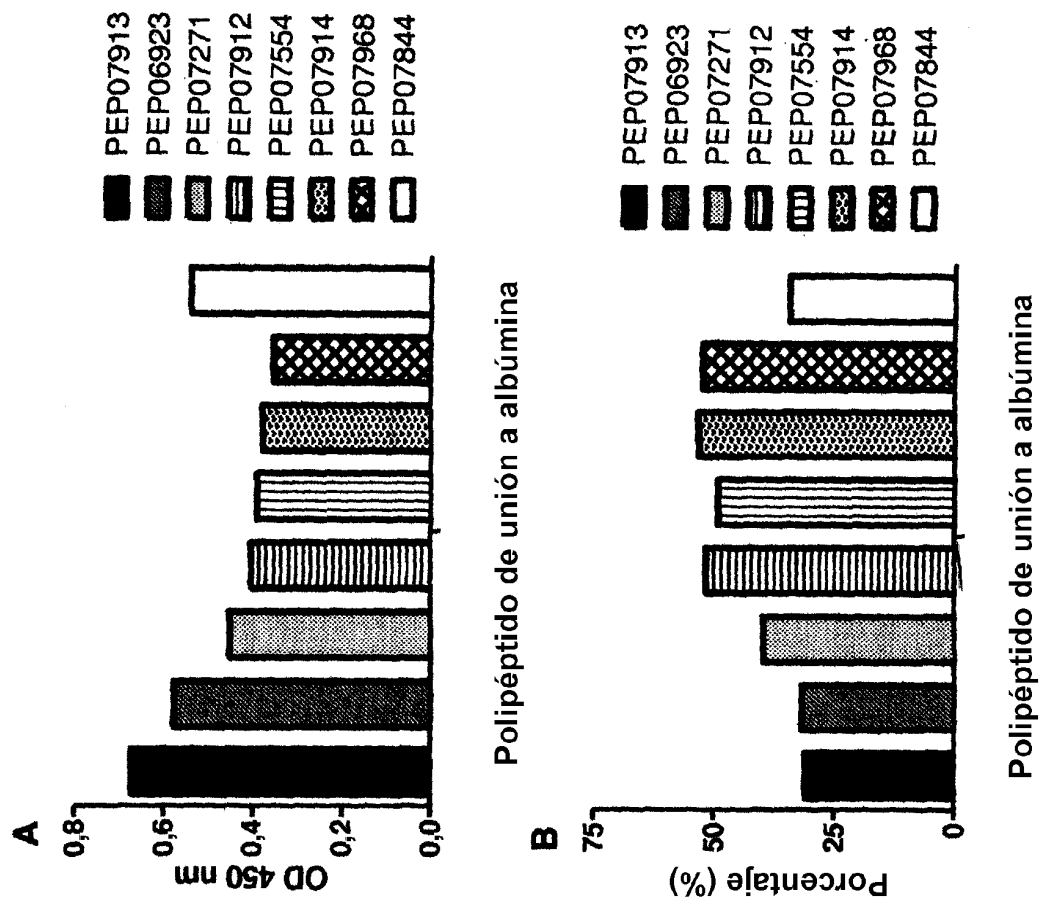
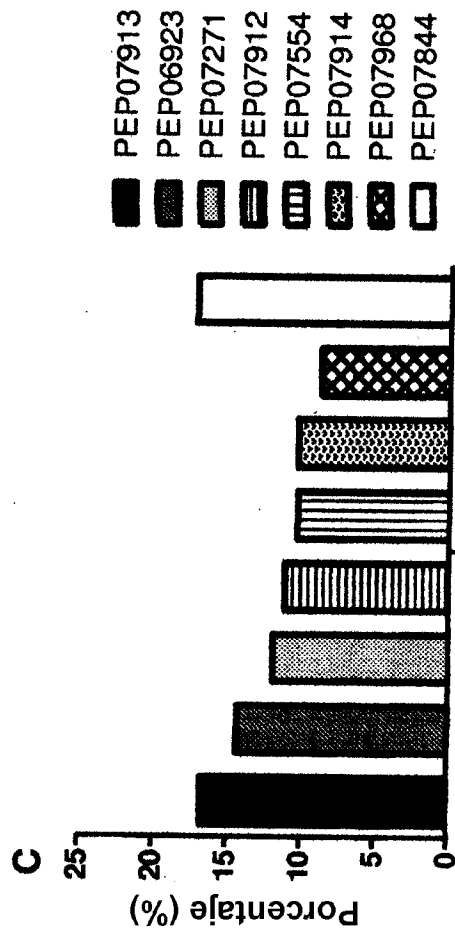


Figura 3



Polipéptido de unión a albúmina

Figura 3

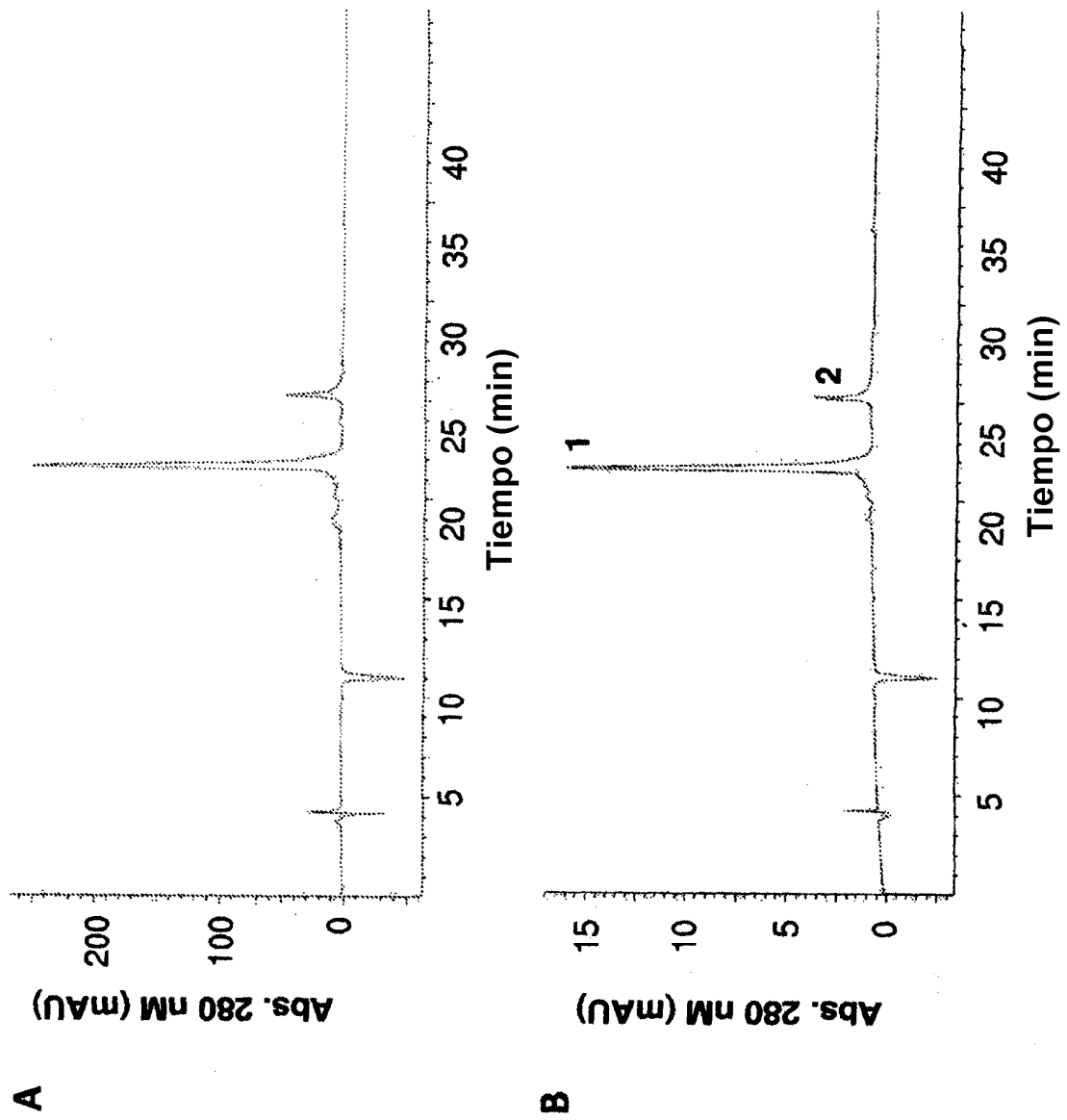


Figura 4

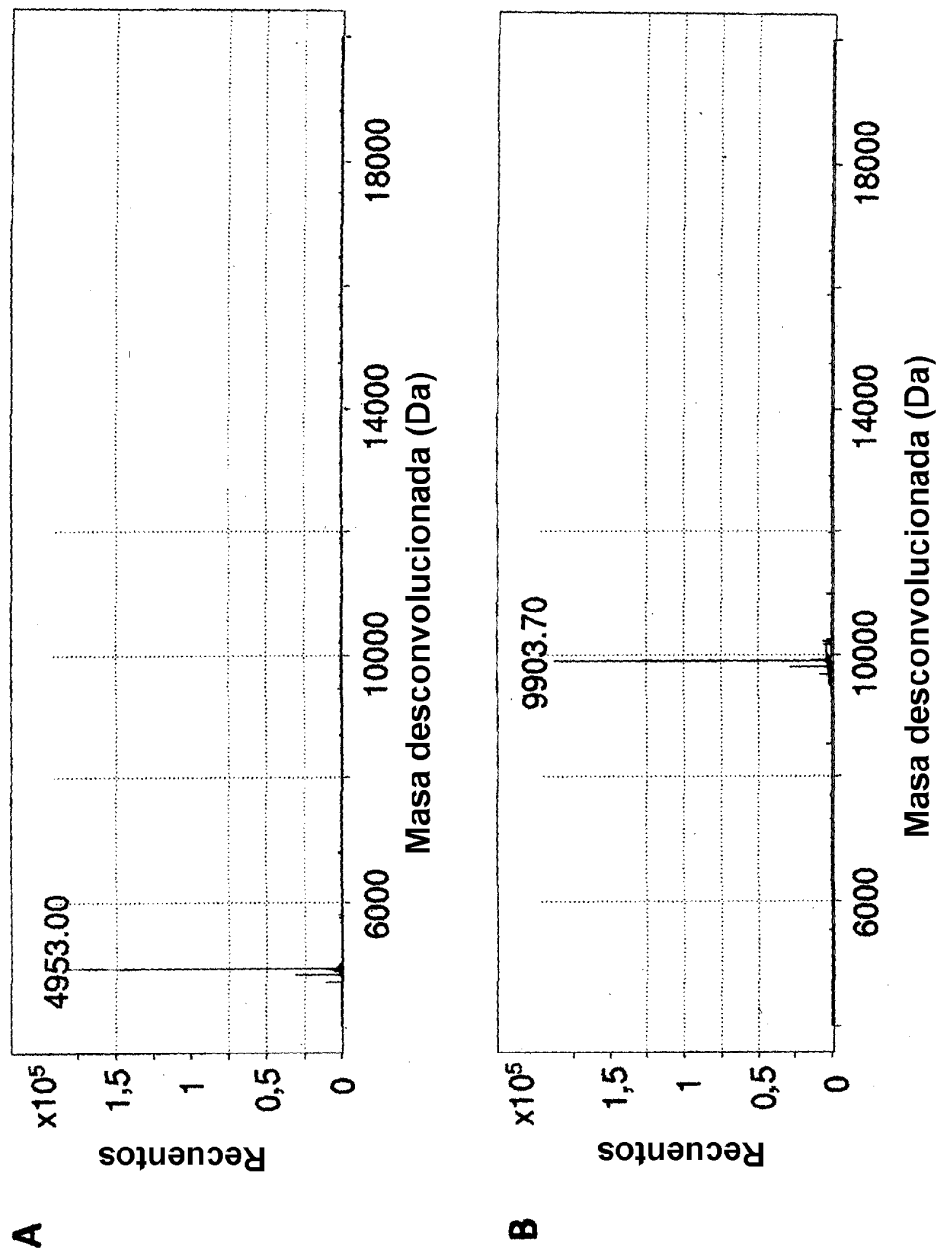


Figura 5

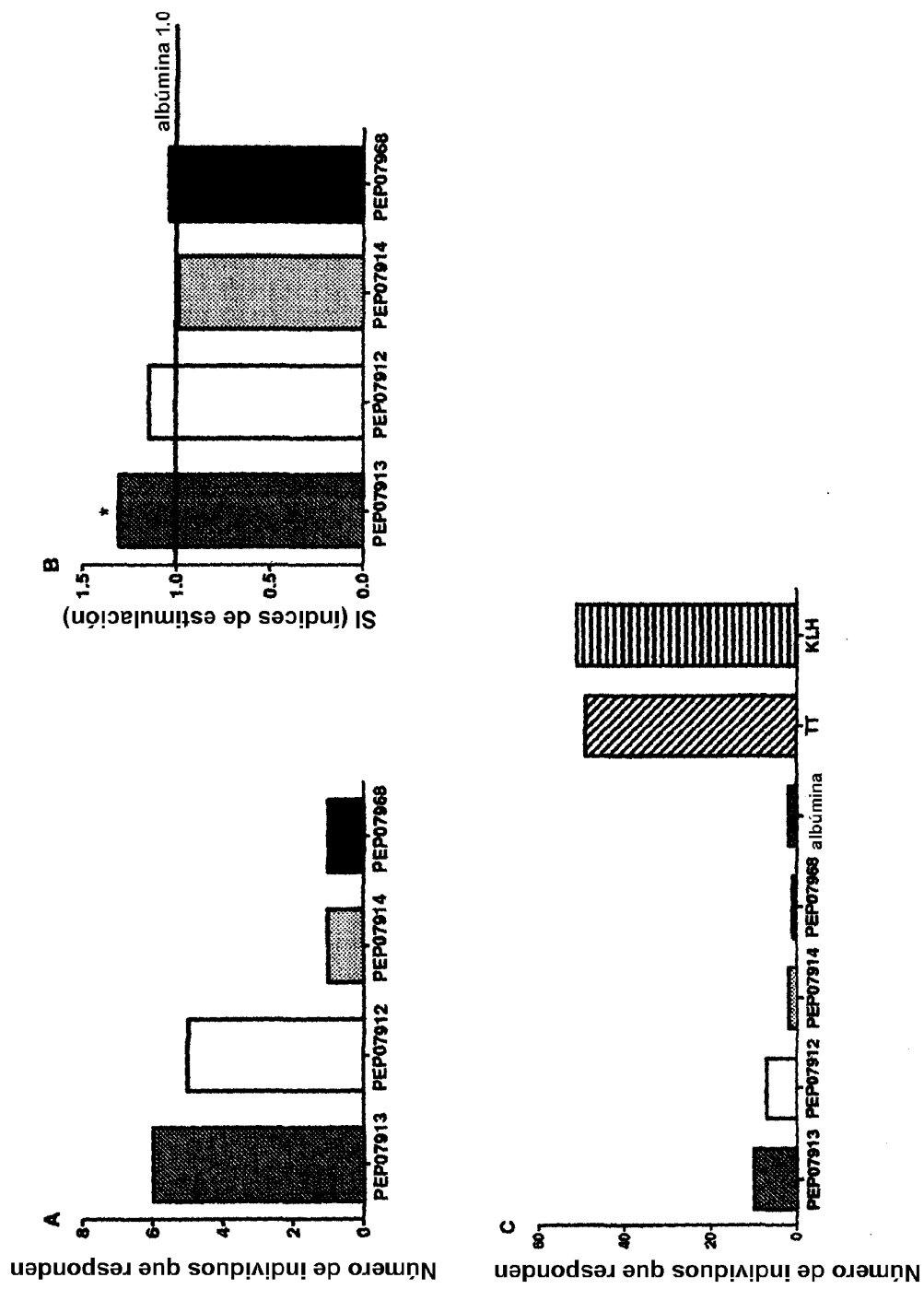


Figura 6

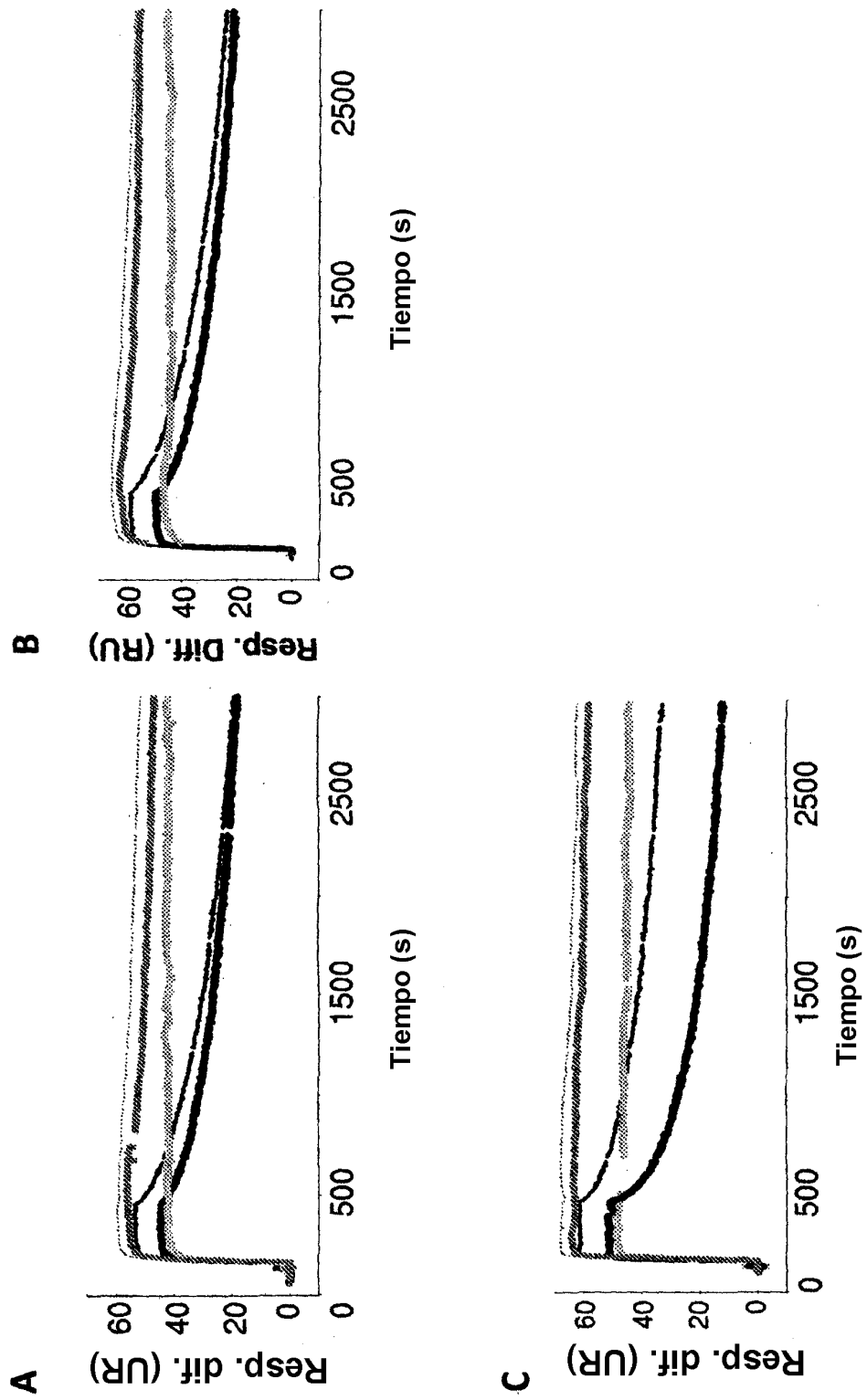


Figura 7

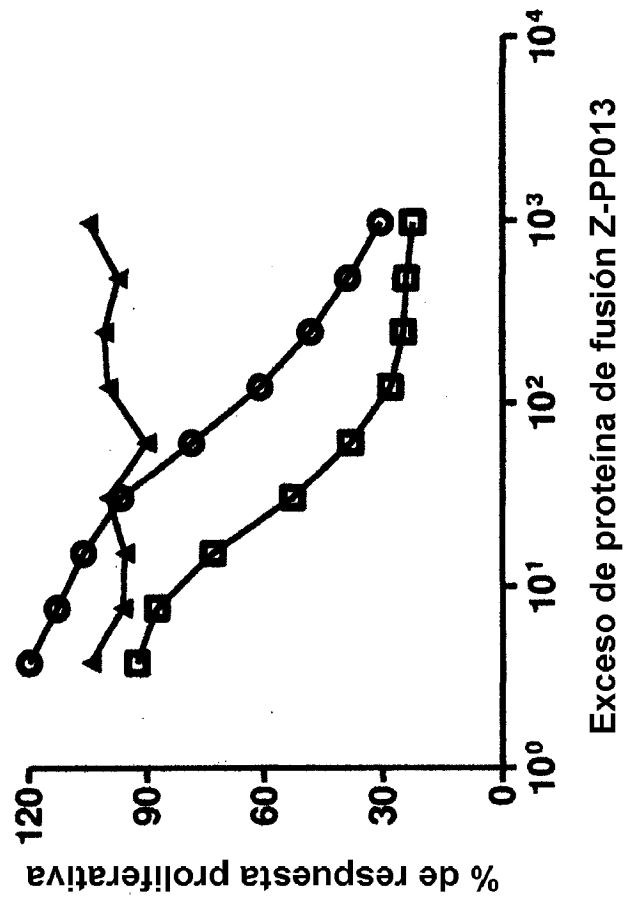


Figura 8

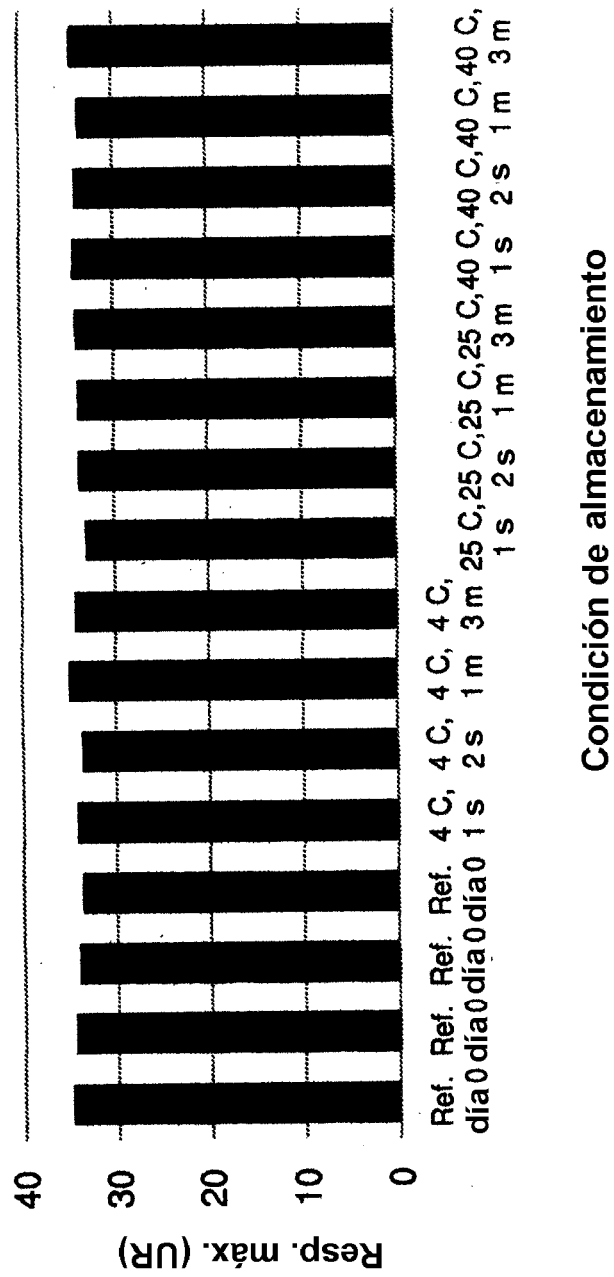


Figura 9

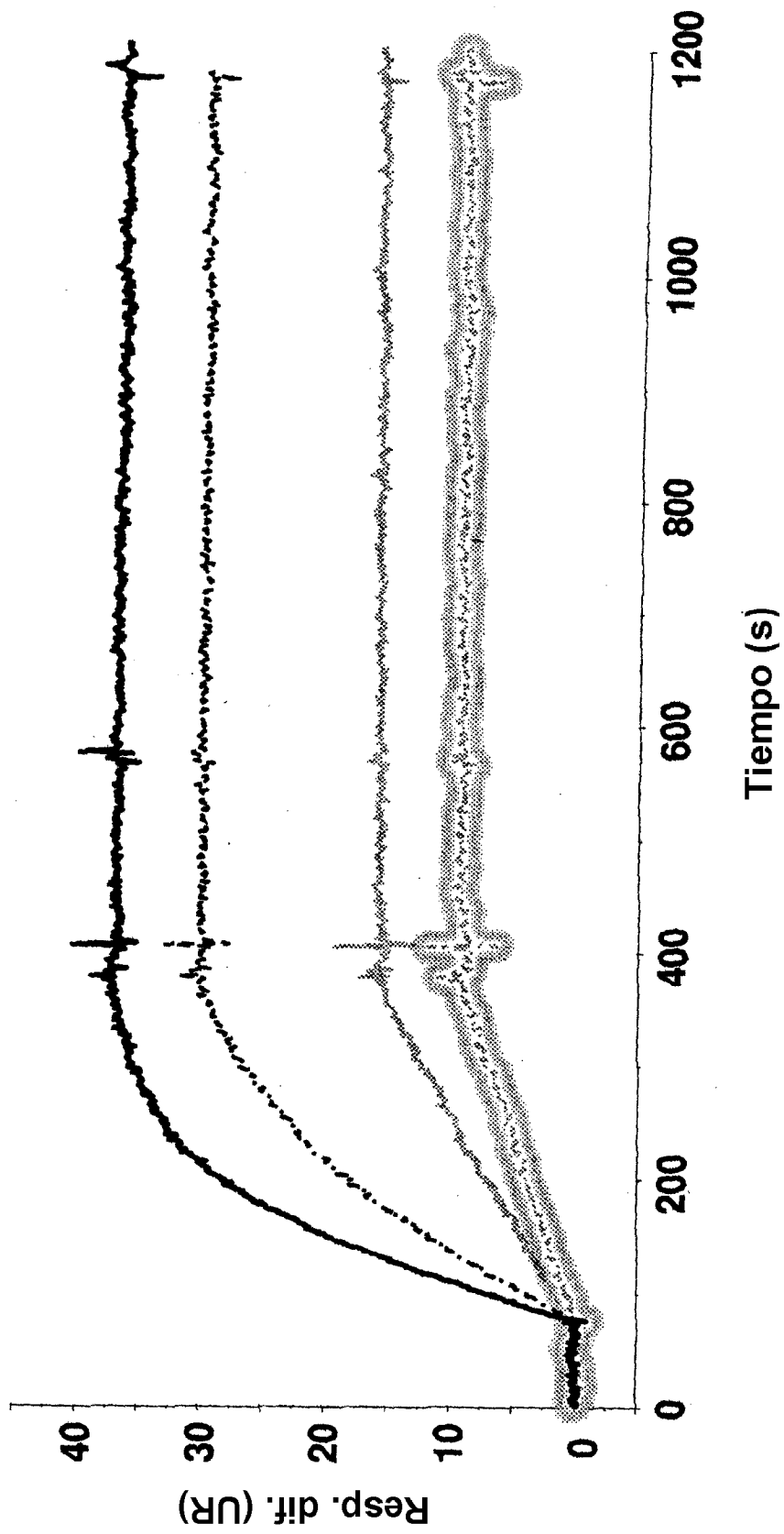


Figura 10

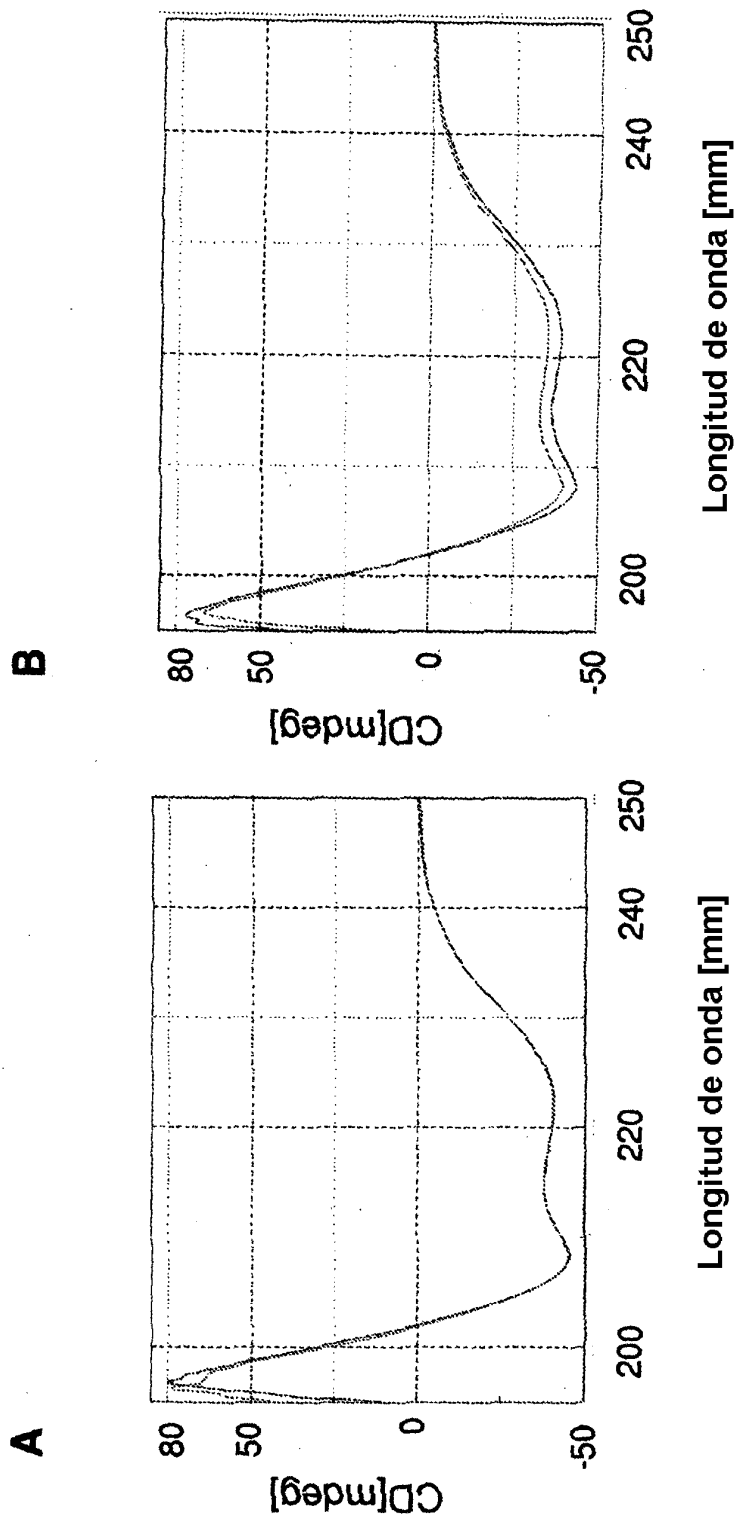


Figura 11

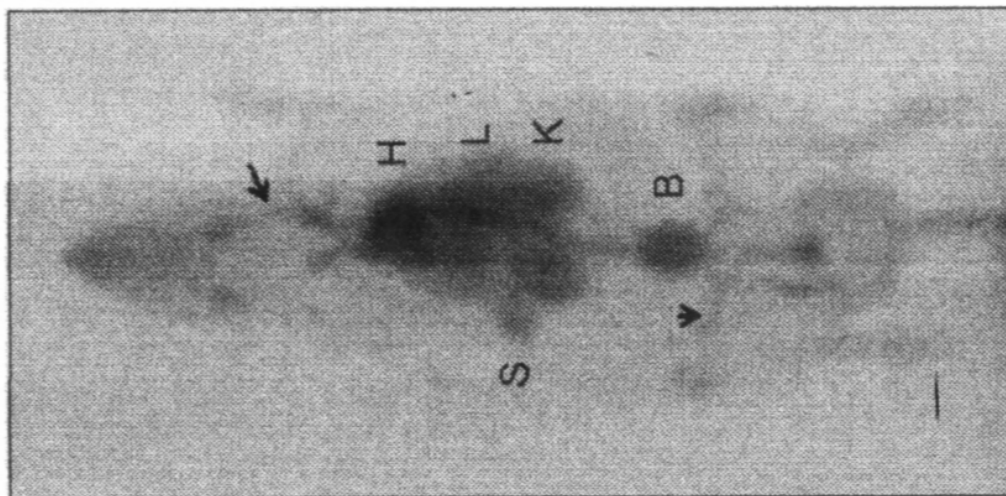


Figura 12

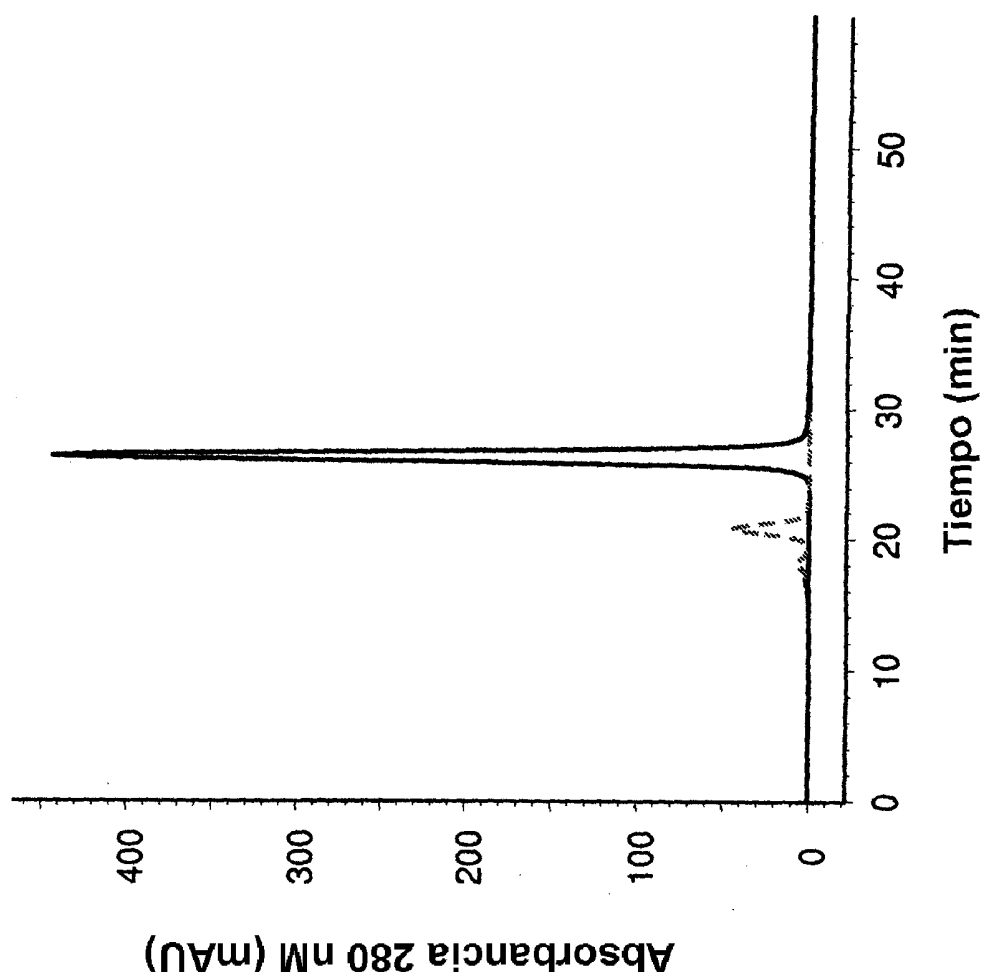


Figura 13