

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 099**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 14/195 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2013 PCT/EP2013/072359**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14064237**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2013 E 13783052 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2912054**

54 Título: **Polipéptido de unión a albúmina**

30 Prioridad:

25.10.2012 EP 12189932
25.10.2012 US 201261718238 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

JONASSON, PER y
EKLUND, PÅR

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 639 099 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

Polipéptido de unión a albúmina

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a polipéptidos que se unen a un dominio de unión a albúmina, ABD. Los polipéptidos tienen diversas aplicaciones industriales y farmacéuticas, por ejemplo, la utilización como un ligando de afinidad en la tecnología de separación o como un agente de detección en el diagnóstico molecular.

Antecedentes

10 La albúmina de suero es la proteína más abundante en sueros de mamíferos (35-50 g/l, es decir, 0,53-0,75 mM, en seres humanos) y varias estrategias han sido descritas para acoplar covalentemente un péptido o proteína a una molécula portadora que permitirá la asociación *in vivo* con la albúmina de suero, p.ej. en el documento WO91/01743, y en el documento WO01/45746 y por Dennis et al. (J Biol Chem 277:35035-43, 2002). El documento WO91/01743 describe, entre otros, el uso de péptidos de unión a albúmina o proteínas derivadas de la proteína G estreptocócica (SpG) para aumentar la semivida de otras proteínas. La idea es fusionar el péptido/proteína de unión a la albúmina derivado de bacterias a un péptido/proteína terapéuticamente interesante, que se ha demostrado que
15 tiene una eliminación rápida de la sangre. La proteína de fusión 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 fusionado. La semivida de la albúmina del suero es directamente proporcional al tamaño del animal, donde, por ejemplo, la albúmina de suero humana (HSA) tiene una vida media de 19 días y la albúmina de suero de conejo tiene una vida media de aproximadamente 5 días (McCurdy et al., J Lab Clin Med 143:115, 2004).

20 La proteína G estreptocócica (SpG) es un receptor bi-funcional presente sobre 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 estructural y funcionalmente diferentes (Guss et al., EMBO J 5:1567, 1986), más precisamente tres dominios de unión a Ig y tres dominios de unión a albúmina de suero (Olsson et al., Eur J Biochem 168:319, 1987). Se ha determinado la estructura de uno de los tres dominios de unión a la albúmina de suero en SpG, mostrando un pliegue del haz de tres hélices (Kraulis et al., FEBS Lett 378: 190, 1996, Johansson et al, J. Biol. Chem. 277:8114-20, 2002). Se definió un motivo de 46 aminoácidos como ABD (dominio de unión a albúmina) y posteriormente se denominó también G148-GA3 (GA para la unión a albúmina relacionada con la proteína G y G148 de la cepa de *Streptococo* de la cual se obtiene).

30 Se desarrollaron variantes artificiales de GA3-G148 que tenían una afinidad muy mejorada para la albúmina de suero humana (Jonsson et al., Prot Eng Des Sel 21:515 - 27, 2008; documento WO2009/016043), así como también se modificaron genéticamente variantes de alta afinidad con propiedades estimuladoras del sistema inmunitario reducidas (documento WO2012/004384). Estas últimas fueron motivadas por el hecho de que unos pocos epítomos de células T y B fueron identificados experimentalmente dentro de GA3-G148 (Goetsch et al., Clin Diagn Lab Immunol 10:125-32, 2003), haciendo este dominio como tal menos adecuado para su uso en composiciones farmacéuticas para la administración a seres humanos. A lo largo del presente texto, GA3-G148, así como los diversos derivados modificados genéticamente del mismo presentados p.ej. en los documentos WO2009/016043 y WO2012/004384, se denominan colectivamente "ABD". Por lo tanto, en la presente descripción, "ABD" denota estas clases de polipéptidos de unión a albúmina, en lugar de un polipéptido especificado con una secuencia de aminoácidos específica.

40 También se han modificado genéticamente variantes de ABD para crear nuevas especificidades de unión, como se describe en Nilvebrant et al., (2011) PLoS One 6(10):e25791, Alm et al., (2010) Biotechnology J 5(6):605-617 y Ahmad et al., (2012) Proteins 80 (3):774-89.

45 Los dominios de unión a albúmina que tienen orígenes distintos de la Proteína G estreptocócica son discutidos por De Château y Björck (1994) J Biol Chem 269(16):12147-51, Lejon et al., (2004) J Biol Chem 279(41): 42924-8, Cramer et al., (2007) FEBS Lett 581(17):3178-82 y He et al., (2007) Protein Sci 16(7):1490-4.

50 Con el interés creciente en la incorporación de un dominio de unión a albúmina a composiciones terapéuticas o de diagnóstico sigue existiendo una necesidad creciente de estrategias de purificación baratas y eficaces para el aislamiento de moléculas covalentemente conectadas a ABD, producidas por ejemplo mediante expresión recombinante en sistemas procariontes o eucariotas, o por conjugación química directa con ABD. Una estrategia general para la purificación de proteínas expresadas de forma recombinante consistiría en incluir una etiqueta de afinidad comúnmente utilizada, tal como una etiqueta de polihistidina, una proteína de unión a quitina (CBP), una proteína de unión a maltosa (MBP), una etiqueta de glutatión-S-transferasa (GST) o una etiqueta FLAG, y realizar una separación de afinidad clásica utilizando resinas comerciales desarrolladas específicamente para cada etiqueta. Sin embargo, para ciertas aplicaciones y, en particular, para las moléculas que se van a utilizar como agentes terapéuticos, el producto final debe ser homogéneo. Debido a que la etiqueta debería eliminarse, p.ej., por escisión enzimática o química, es necesario asegurar una escisión completa para obtener un producto homogéneo, o sufrir una pérdida de rendimiento al retirar el producto parcialmente escindido. Ambos problemas sirven para aumentar el coste de producción del producto. Por lo tanto, una estrategia más motivada sería utilizar el propio radical ABD como
55

una etiqueta de purificación. Un ejemplo de esto consistiría en acoplar albúmina recombinante a un soporte sólido (véase por ejemplo Jonsson et al., Prot Eng Des Sel 21: 515-27, 2008; Andersen et al., J Biol Chem 286:5234-41, 2011). A partir de un soluto bruto, los compuestos que comprenden una etiqueta ABD son capturados por la albúmina, los contaminantes no específicamente adsorbidos son eliminados y los compuestos etiquetados con ABD son recuperados posteriormente interrumpiendo la interacción específica pero reversible con la albúmina. Sin embargo, la albúmina es una molécula portadora natural grande con varios sitios de interacción para diferentes proteínas, ácidos grasos, esteroides, iones, etc., y por lo tanto, la unión de fondo de componentes tanto específicos como no específicos puede contaminar la muestra recuperada. A pesar del hecho de que se ha desarrollado la albúmina humana recombinante, sigue siendo costoso incluirla como ligando de afinidad en la producción a gran escala de agentes terapéuticos, en particular porque es incompatible con los procedimientos convencionales de limpieza *in situ*, que tendrían que aplicarse para el uso repetido de la matriz acoplada a albúmina. Además, se pueden requerir condiciones de elución más duras para recuperar moléculas que contienen variantes de ABD con una afinidad excepcionalmente alta por la albúmina. Tales condiciones pueden ser desfavorables también para la molécula etiquetada con ABD.

La Proteína A de *Staphylococcus aureus* se ha utilizado durante mucho tiempo como un ligando de afinidad en la producción industrial de anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión de Fc, debido a la afinidad nativa de la Proteína A para la porción Fc de IgG. La proteína A en su totalidad, así como sus respectivos dominios de unión a Fc individuales, han servido posteriormente como puntos de partida para el diseño racional de ligandos de afinidad modificados genéticamente con propiedades mejoradas. Para una introducción, véanse los artículos de Nord K y colaboradores en Prot Eng (Nord et al., Prot Eng. 8:601-608; 1995) y en Nat Biotech (Nord et al., Nat Biotech 15:772-777; 1997).

Se encuentra disponible más información de carácter general sobre esta tecnología en Tashiro et al., (1997) J Mol Biol 272 (4):573-590, Nygren (2008) FEBS J 275 (11):2668-2667, y Löfblom et al., (2010) FEBS Lett 584 (12):2670-2680. Se describe un armazón mejorado para tales moléculas en el documento EP2077272. Ligandos específicos y modificados genéticamente con afinidad para diferentes dianas son descritos por Wahlberg et al., (2003), en Proc Natl Acad Sci USA 100 (6):3185-3190, documentos WO2009/019117, WO2011/056124 y WO2013/126006.

Un objeto de la presente descripción es proporcionar nuevos agentes de unión a ABD. Además, un objeto de la descripción es proporcionar nuevos agentes de unión a ABD para su uso en biotecnología, por ejemplo en aplicaciones de purificación y separación de proteínas.

Descripción de la invención

Estos objetos, y otros objetos evidentes para el experto en la técnica a partir de la presente descripción, se pueden lograr mediante uno o más de los diversos aspectos de la invención descritos a continuación.

De este modo, en un primer aspecto, la descripción proporciona un polipéptido de unión a ABD, que comprende un motivo de unión ABD BM, cuyo motivo consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

i)

$$EX_2X_3X_4AX_6X_7EIX_{10}X_{11}LPNLX_{16}X_{17}X_{18}QX_{20}X_{21}AFIX_{25}X_{26}LX_{28}D$$

en donde, independientemente entre sí,

X_2 se selecciona entre F, I y L;

X_3 se selecciona entre H, K, N, Q, R, S, T y V;

X_4 se selecciona entre A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y;

X_6 se selecciona entre F, I, L e Y;

X_7 se selecciona entre A, H, I, K, L, N, Q, R, S, T y V;

X_{10} se selecciona entre G, H, K, N, Q, R y S;

X_{11} se selecciona entre A, D, F, G, I, K, L, N, Q, R, S, T, V e Y;

X_{16} se selecciona entre N y T;

X_{17} se selecciona entre F, H, L, S y T;

X_{18} se selecciona entre D, E, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T y V;

X_{20} se selecciona entre H, K y R;

X_{21} se selecciona entre I, L y V;

X₂₅ se selecciona entre F, I, L, V e Y;

X₂₆ se selecciona entre K y S;

X₂₈ se selecciona entre D y E;

y

- 5 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 89% con la secuencia definida en i), uniéndose el polipéptido a un ABD que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre los SEQ ID NO: 161 y 162.

10 La definición anterior de una clase de polipéptidos de unión a ABD relacionados por la secuencia se basa en un análisis estadístico de una serie de variantes de polipéptidos aleatorios de un armazón parental, que se seleccionaron por su interacción con ABD en varios experimentos de selección diferentes. El motivo de unión a ABD identificado, o "BM", corresponde a la región de unión a la diana del armazón parental, cuya región constituye dos hélices alfa dentro de un dominio de proteína de haz de triple hélice. En el armazón parental, los residuos aminoácidos variados de las dos hélices del BM constituyen una superficie de unión para la interacción con la porción Fc constante de los anticuerpos. En la presente invención, la variación aleatoria de residuos de la superficie de unión y la subsiguiente selección de variantes han reemplazado la capacidad de interacción con Fc por una capacidad de interacción con ABD.

15 El polipéptido de unión a ABD descrito en la presente memoria muestra un conjunto de características que, por ejemplo, cuando se acopla a un soporte sólido, lo hace adecuado como ligando de afinidad para la purificación de moléculas que comprenden ABD. Por ejemplo, en comparación con el uso de albúmina humana como ligando de afinidad, el polipéptido de unión a ABD descrito demuestra las siguientes ventajas:

- Mayor capacidad de purificación por ml de matriz acoplada al ligando.
- Compatibilidad con procedimientos repetidos para la limpieza *in situ*, por ejemplo utilizando hidróxido de sodio 0,5 M, lo que hace que el polipéptido de unión a ABD sea útil en la producción a gran escala de agentes terapéuticos.
- 25 • Capacitación de condiciones de elución más suaves, por ejemplo la elución a un pH más alto, que hace posible la purificación de una gama más amplia de moléculas diferentes que comprenden ABD.

30 En el contexto de la purificación de una proteína diana que contiene ABD, el polipéptido de unión a ABD de la presente descripción puede ser útil en una o más de las diferentes fases de purificación. Por lo tanto, se puede utilizar sin limitación en una o más de una primera etapa de captura, en cualquier etapa de purificación intermedia o en una etapa final de refinado.

35 El experto en la técnica apreciará que la purificación satisfactoria de una proteína diana, utilizando una resina que comprende un polipéptido de unión de ABD de acuerdo con la presente descripción, se puede lograr independientemente de dónde se encuentre el radical ABD en la proteína diana. Por lo tanto, el radical ABD puede colocarse en el extremo N o en el extremo C de la proteína diana. Alternativamente, la proteína diana puede ser una proteína de fusión que comprende un radical ABD flanqueado por otros radicales de proteínas en ambos lados.

40 En el contexto de la presente descripción, "ABD" se refiere a dominios de unión a albúmina de tres hélices de la proteína G estreptocócica y sus derivados. En particular, "ABD" se puede referir a GA3-G148 (Johansson *et al.*, más arriba) o variantes de GA3-G148 que tienen una afinidad mejorada por la albúmina (documento WO2009/016043), así como variantes de alta afinidad con propiedades inmunoestimuladoras reducidas (documento WO2012/004384). En otras palabras, en la presente descripción, "ABD" indica las clases de polipéptidos de unión a la albúmina descritos en los trabajos referenciados, en lugar de un polipéptido especificado con una secuencia de aminoácidos específica.

45 Como entenderá el experto en la técnica, la función de cualquier polipéptido, tal como la capacidad de unión a ABD del polipéptido de la presente descripción, depende de la estructura terciaria del polipéptido. Por lo tanto, es posible hacer cambios menores en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido sin afectar a su función. Así, la invención abarca polipéptidos que comprenden variantes modificadas del BM que son de tal manera que la secuencia resultante es idéntica en al menos 89% a una secuencia definida por i). En una realización de la presente invención, dichas variantes modificadas del BM son de tal manera que son idénticas en 93% a una secuencia definida por i). En otra realización más, dichas variantes de BM son idénticas en 96% a una secuencia definida por i).

50 En algunas realizaciones, tales cambios se pueden realizar en todas las posiciones de las secuencias de los polipéptidos de unión a ABD como se describe en la presente memoria. En otras realizaciones, tales cambios se pueden realizar solamente en las posiciones no variables, también designadas como residuos de aminoácidos del armazón. En tales casos, no se permiten cambios en las posiciones variables, es decir, las posiciones indicadas con una "X" en la secuencia i). Por ejemplo, es posible que un residuo de aminoácido perteneciente a un cierto

agrupamiento funcional de residuos de aminoácidos (p.ej., hidrófobo, hidrófilo, polar, etc.) pueda ser intercambiado por otro residuo de aminoácido del mismo grupo funcional.

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

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- En una realización, X_2 en la secuencia i) se selecciona entre F y L.
 - En una realización, X_2 en la secuencia i) es F.
 - En una realización, X_2 en la secuencia i) es L.
 - En una realización, X_3 en la secuencia i) se selecciona entre H, K, R, T y V.
 - En una realización, X_3 en la secuencia i) se selecciona entre H, K, R y V.
 - En una realización, X_3 en la secuencia i) se selecciona entre H, K y V.
 - En una realización, X_3 en la secuencia i) se selecciona de K y R.
 - En una realización, X_3 en la secuencia i) es K.
 - En una realización, X_3 en la secuencia i) es R.
 - En una realización, X_3 en la secuencia i) es V.
 - En una realización, X_4 en la secuencia i) se selecciona entre A, H, I, L, N, V y W.
 - En una realización, X_4 en la secuencia i) se selecciona entre H, L, N y V.
 - En una realización, X_4 en la secuencia i) es V.
 - En una realización, X_4 en la secuencia i) es N.
 - En una realización, X_4 en la secuencia i) es H.
 - En una realización, X_4 en la secuencia i) es L.
 - En una realización, X_4 en la secuencia i) se selecciona entre A, L, N, V y W.
 - En una realización, X_4 en la secuencia i) se selecciona entre A, N, V y W.
 - En una realización, X_4 en la secuencia i) se selecciona entre A, N y W.
 - En una realización, X_6 en la secuencia i) se selecciona entre F y L.
 - En una realización, X_6 en la secuencia i) es F.
 - En una realización, X_6 en la secuencia i) es L.
 - En una realización, X_7 en la secuencia i) se selecciona entre K, L, N, Q, R y S.
 - En una realización, X_7 en la secuencia i) se selecciona entre K, N, Q, R y S.
 - En una realización, X_7 en la secuencia i) se selecciona entre K, Q, R y S.
 - En una realización, X_7 en la secuencia i) se selecciona de K y R.
 - En una realización, X_7 en la secuencia i) es K.
 - En una realización, X_7 en la secuencia i) es R.
 - En una realización, X_{10} en la secuencia i) se selecciona entre H, K, N y R.
 - En una realización, X_{10} en la secuencia i) se selecciona entre H, K y N.
 - En una realización, X_{10} en la secuencia i) se selecciona entre K, N y R.

ES 2 639 099 T3

- En una realización, X_{10} en la secuencia i) se selecciona de K y R.
- En una realización, X_{10} en la secuencia i) es N.
- En una realización, X_{10} en la secuencia i) es K.
- En una realización, X_{10} en la secuencia i) es R.
- 5 En una realización, X_{10} en la secuencia i) es H.
- En una realización, X_{11} en la secuencia i) se selecciona entre A, F, L, R, T e Y.
- En una realización, X_{11} en la secuencia i) se selecciona entre A, F, T e Y.
- En una realización, X_{11} en la secuencia i) es T.
- En una realización, X_{11} en la secuencia i) es A.
- 10 En una realización, X_{11} en la secuencia i) es Y.
- En una realización, X_{11} en la secuencia i) es F.
- En una realización, X_{11} en la secuencia i) se selecciona entre A, L, T e Y.
- En una realización, X_{11} en la secuencia i) se selecciona entre T e Y.
- En una realización, X_{16} en la secuencia i) es T.
- 15 En una realización, X_{17} en la secuencia i) se selecciona entre F, H y L.
- En una realización, X_{17} en la secuencia i) se selecciona entre F y H.
- En una realización, X_{17} en la secuencia i) se selecciona entre H y L.
- En una realización, X_{17} en la secuencia i) es F.
- En una realización, X_{17} en la secuencia i) es H.
- 20 En una realización, X_{17} en la secuencia i) es L.
- En una realización, X_{18} en la secuencia i) se selecciona entre D, H, I, K y Q.
- En una realización, X_{18} en la secuencia i) se selecciona entre D, H y Q.
- En una realización, X_{18} en la secuencia i) se selecciona entre H y Q.
- En una realización, X_{18} en la secuencia i) es H.
- 25 En una realización, X_{18} en la secuencia i) es Q.
- En una realización, X_{18} en la secuencia i) es D.
- En una realización, X_{20} en la secuencia i) se selecciona entre K y R.
- En una realización, X_{20} en la secuencia i) se selecciona entre H y R.
- En una realización, X_{20} en la secuencia i) es R.
- 30 En una realización, X_{20} en la secuencia i) es K.
- En una realización, X_{21} en la secuencia i) se selecciona entre I y L.
- En una realización, X_{21} en la secuencia i) es I.
- En una realización, X_{21} en la secuencia i) es L.
- En una realización, X_{25} en la secuencia i) se selecciona entre I, L y V.
- 35 En una realización, X_{25} en la secuencia i) se selecciona entre V e I.
- En una realización, X_{25} en la secuencia i) es I.
- En una realización, X_{25} en la secuencia i) es V.

En una realización, X_{25} en la secuencia i) es L.

En una realización, X_{26} en la secuencia i) es K.

En una realización, X_{28} en la secuencia i) es D.

En una realización, la secuencia i) se define como sigue: independientemente entre sí,

- 5 x_2 se selecciona entre F y L;
 x_3 se selecciona entre H, K, R, T y V;
 x_4 se selecciona entre A, H, I, L, N, V y W;
 x_6 se selecciona entre F y L;
 x_7 se selecciona entre K, L, N, Q, R y S;
- 10 x_{10} se selecciona entre H, K, N y R;
 x_{11} se selecciona entre A, F, L, R, T e Y;
 x_{16} es T;
 x_{17} se selecciona entre F, H y L;
 x_{18} se selecciona entre D, H, I, K y Q;
- 15 x_{20} se selecciona entre H y R;
 x_{21} se selecciona entre I y L;
 x_{25} se selecciona entre I, L y V;
 x_{26} es K; y
 x_{28} es D.

20 En una realización, la secuencia i) se define como sigue: independientemente entre sí,

- x_2 se selecciona entre F y L;
 x_3 se selecciona entre H, K, T y V;
 x_4 se selecciona entre H, L, N y V;
 x_6 se selecciona entre F y L;
- 25 x_7 se selecciona entre K, R, Q y S;
 x_{10} se selecciona entre H, K y N;
 x_{11} se selecciona entre A, F, T e Y;
 x_{16} es T;
 x_{17} se selecciona entre F, H y L;
- 30 x_{18} se selecciona entre D, H y Q;
 x_{20} es R;
 x_{21} se selecciona entre I y L;
 x_{25} se selecciona entre I, L y V;
 x_{26} es K; y
- 35 x_{28} es D.

En una realización más específica que define una subclase del polipéptido de unión a ABD, la secuencia i) satisface al menos cuatro de las ocho condiciones I - VIII:

I. X_2 se selecciona entre F y L;

II. X_6 se selecciona entre F y L;

III. X_{16} es T;

IV. X_{20} se selecciona entre H y R;

5 V. X_{21} se selecciona entre I y L;

VI. X_{25} se selecciona entre I y V;

VII. X_{26} es K; y

VIII. X_{28} es d

10 En algunos ejemplos de un polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el primer aspecto, la secuencia i) satisface al menos cinco de las ocho condiciones I-VIII. Más específicamente, la secuencia i) puede satisfacer al menos seis de las ocho condiciones I-VIII, tales como al menos siete de las ocho condiciones I-VIII, tales como todas las condiciones I-VIII.

15 Según se describe con detalle en la sección experimental a continuación, la selección de variantes de polipéptidos de unión a ABD ha conducido a la identificación de numerosas secuencias de motivos de unión a ABD individuales (*BM*). Estas secuencias constituyen realizaciones individuales de la secuencia i) de acuerdo con este aspecto. Las secuencias de los motivos de unión a ABD individuales se presentan en la Figura 1 y como los SEQ ID NO: 1-52. En algunas realizaciones de este aspecto, la secuencia i) se selecciona entre uno cualquiera de los SEQ ID NO: 1-52. Más específicamente, la secuencia i) se puede seleccionar entre uno cualquiera de los SEQ ID NO: 1-7, tal como entre los SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. En particular, la secuencia i) puede ser el SEQ ID NO: 1.

20 En algunas realizaciones de la presente descripción, el *BM* como se definió anteriormente "forma parte de" un dominio de proteína de haz de tres hélices. Se entiende que esto significa que la secuencia del *BM* es "insertada" en o "injertada" sobre la secuencia del dominio del haz de tres hélices original, de manera que el *BM* reemplaza un motivo estructural similar del dominio original. Por ejemplo, sin desear estar limitado por la teoría, se cree que el *BM* constituye dos de las tres hélices de un haz de tres hélices y, por lo tanto, puede reemplazar dicho motivo de dos hélices dentro de cualquier haz de tres hélices. Como comprenderá un experto en la técnica, la sustitución de dos hélices del dominio de haz de tres hélices por el *BM* de dos hélices tiene que ser realizada de manera que no afecte a la estructura básica del polipéptido. Es decir, el plegamiento general de la cadena principal de $C\alpha$ del polipéptido de acuerdo con esta realización de la invención es sustancialmente el mismo que el del dominio de proteína del haz de tres hélices del que forma una parte, p.ej. teniendo los mismos elementos de estructura secundaria en el mismo orden etc. Así, un *BM* de acuerdo con la invención "forma parte" de un dominio de haz de tres hélices si el polipéptido de acuerdo con esta realización de la invención tiene el mismo pliegue que el dominio original, lo que implica que las propiedades estructurales básicas son compartidas; dando como resultado, esas propiedades p.ej. espectros de CD similares. El experto en la técnica conoce otros parámetros que son relevantes.

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

40 En realizaciones en las que el polipéptido de unión a ABD de la invención forma parte de un dominio de proteína de haz de tres hélices, el polipéptido de unión a ABD puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

45 iii)

K-[*BM*]-DPSQS $X_a X_b$ LLX_c EAKKL NDX_dQ;

en donde

[*BM*] es un motivo de unión a ABD como se ha definido anteriormente;

X_a se selecciona entre A y S;

50 X_b se selecciona entre N y E;

X_c se selecciona entre A, S y C;

X_d se selecciona entre A y S;

y

5 iii). iv) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 81% con una secuencia definida por

10 Como se discutió anteriormente, los polipéptidos que comprenden cambios menores en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores sin afectar en gran medida a la estructura terciaria y su función están también dentro del alcance de la presente descripción. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la secuencia iv) tiene una identidad de al menos 83%, tal como al menos 85%, tal como al menos 87%, tal como al menos 89%, tal como al menos 91%, tal como al menos 93%, tal como al menos 95%, tal como al menos 97% con una secuencia definida por iii).

En una realización del polipéptido de unión a ABD como se ha definido anteriormente, X_a en la secuencia iii) es A. En una realización alternativa, X_a en la secuencia iii) es S.

15 En una realización del polipéptido de unión a ABD como se ha definido anteriormente, X_b en la secuencia iii) es N. En una realización alternativa, X_b en la secuencia iii) es E.

En una realización del polipéptido de unión a ABD como se ha definido anteriormente, X_c en la secuencia iii) es A. En una realización alternativa, X_c en la secuencia iii) es S. En otra realización alternativa, X_c en la secuencia iii) es C.

En una realización del polipéptido de unión a ABD como se ha definido anteriormente, X_d en la secuencia iii) es A. En una realización alternativa, X_d en la secuencia iii) es S.

20 En una realización del polipéptido de unión a ABD como se ha definido anteriormente, en la secuencia iii), X_a es A; X_b es N; X_c es A y X_d es A.

En una realización adicional del polipéptido de unión a ABD como se ha definido anteriormente, en la secuencia iii), X_a es A; X_b es N; X_c es C y X_d es A.

25 En una realización adicional del polipéptido de unión a ABD como se ha definido anteriormente, en la secuencia iii), X_a es S; x_b es E; X_c es S y X_d es S.

En una realización adicional del polipéptido de unión a ABD como se ha definido anteriormente, en la secuencia iii), X_a es S; X_b es E; X_c es C y X_d es S.

En una realización adicional del polipéptido de unión a ABD como se ha definido anteriormente, en la secuencia iii), X_a es S; X_b es E; X_c es A y X_d es A.

30 En una realización adicional del polipéptido de unión a ABD como se ha definido anteriormente, en la secuencia iii), X_a es S; x_b es E; X_c es C y X_d es A.

35 En una realización adicional más, la secuencia iii) en la definición de polipéptidos de unión a ABD anterior se selecciona entre los SEQ ID NO: 53-104, en particular entre los SEQ ID NO: 53-59. En una realización adicional, la secuencia iii) se selecciona entre los SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56. En particular, la secuencia iii) puede ser el SEQ ID NO: 53.

También, en una realización adicional, se proporciona un polipéptido de unión a ABD como se ha definido anteriormente, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

v)

YAK-[BM]-DPSQS SELLX_c EAKKL NDSQA P;

40 en donde [BM] Es un motivo de unión a ABD como se ha definido anteriormente y X_c se selecciona entre S y C; y

vi) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 83% con una secuencia definida por v).

45 En otra realización, se proporciona un polipéptido de unión a ABD como se ha definido anteriormente, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

vii)

YAK-[BM]-DPSQS SELLX_c EAKKL NDAQA P;

en donde [BM] es un motivo de unión a ABD como se ha definido anteriormente y X_c se selecciona entre A y C; y

viii) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 83% con una secuencia definida por vii).

5 Alternativamente, se proporciona un polipéptido de unión a ABD como se ha definido anteriormente, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

ix)

FNK-[BM]-DPSQS ANLLX_c EAKKL NDAQA P;

10 en donde [BM] es un motivo de unión a ABD como se ha definido anteriormente y X_c se selecciona entre A y C; y

x) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 83% con una secuencia definida por ix).

15 Como se discutió anteriormente, los polipéptidos que comprenden cambios menores en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores sin afectar en gran medida a la estructura terciaria y su función están también dentro del alcance de la presente descripción. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los polipéptidos de unión a ABD como se definen anteriormente pueden tener, por ejemplo, una secuencia que es idéntica en al menos 84%, al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, o al menos 98% a una secuencia definida por v), vii) o ix).

20 En algunas realizaciones, el motivo de unión a ABD puede formar parte de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre

ADNNFNK-[BM]-DPSQSANLLSEAKKLNESQAPK;

ADNKFNK-[BM]-DPSQSANLLAEAKKLNDQAQAPK;

ADNKFNK-[BM]-DPSVSKEILAEAKKLNDQAQAPK;

ADAQQNNFNK-[BM]-DPSQSTNVLGEAKKLNESQAPK;

25 AQHDE-[BM]-DPSQSANVLGEAQLNDSQAPK;

VDNKFNK-[BM]-DPSQSANLLAEAKKLNDQAQAPK;

AEAKYAK-[BM]-DPSESELLSEAKKLNSQAPK;

VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDQAQAPK;

VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNSQAPK;

30 AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNSQAPK;

VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNSQAPK;

VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNSQAPK; y

AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNSQAPK.

En una realización, el polipéptido de unión a ABD comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

35 xi)

VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDQAQAPK;

en donde [BM] Es un motivo de unión a ABD como se ha definido anteriormente; y

xii) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 84% con la secuencia definida en xi).

40 De nuevo, los polipéptidos que comprenden cambios menores en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores sin afectar en gran medida a la estructura terciaria y su función están también dentro del alcance de la presente descripción. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los polipéptidos de unión a ABD como se definen anteriormente pueden tener, por ejemplo, una secuencia que es idéntica en al menos 86%, al menos 87%, al menos 89%, al menos 91%, al menos 93%, al menos 94% , al menos 96%, o al menos 98% a la secuencia definida por xi).

La secuencia xi) en tal polipéptido se puede seleccionar entre uno cualquiera de los SEQ ID NO: 105-156. En particular, la secuencia xi) se puede seleccionar entre uno cualquiera de los SEQ ID NO: 105-111, por ejemplo se puede seleccionar entre los SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107 y SEQ ID NO: 108. En una realización específica de este polipéptido, la secuencia xi) es el SEQ ID NO: 105.

5 El polipéptido de la invención puede estar en forma monomérica o multimérica. En una realización de la presente invención, el polipéptido de unión a ABD está presente en forma multimérica, que comprende al menos dos unidades monoméricas de polipéptido de unión a ABD, cuyas secuencias de aminoácidos pueden ser iguales o diferentes. Las formas multiméricas del polipéptido pueden ser ventajosas porque pueden tener propiedades de unión mejoradas.

10 En una realización, dichas unidades monoméricas de polipéptido de unión a ABD están acopladas covalentemente entre sí. En una realización particular, las unidades monoméricas de polipéptido de unión a ABD se expresan como una proteína de fusión.

15 Los polipéptidos se pueden unir mediante acoplamiento covalente utilizando métodos conocidos de la química orgánica, o se pueden expresar como uno o más polipéptidos de fusión en un sistema para la expresión recombinante de polipéptidos, o se pueden unir de cualquier otra forma, ya sea directamente o a través de un conector, por ejemplo un conector de aminoácidos. En una realización, dicho polipéptido de unión a ABD está en forma dimerica. Las posibles formas multiméricas también incluyen formas triméricas. Las formas multiméricas del polipéptido pueden comprender un número adecuado de secuencias polipeptídicas como se ha definido anteriormente.

20 El experto entenderá que se pueden hacer varias modificaciones y/o adiciones a un polipéptido de unión a ABD de acuerdo con cualquier aspecto descrito en la presente memoria con el fin de adaptar el polipéptido a una aplicación específica sin apartarse del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, cualquier polipéptido de unión a ABD descrito en la presente memoria puede comprender otros aminoácidos C-terminales y/o N-terminales. Semejante polipéptido debe entenderse como un polipéptido que tiene residuos de aminoácidos adicionales en la primera y/o última posición en la cadena polipeptídica, es decir, en el extremo N- y/o C-terminal. De este modo, un polipéptido de unión a ABD puede comprender cualquier número adecuado de residuos de aminoácidos adicionales, por ejemplo al menos un residuo de aminoácido adicional. Cada residuo de aminoácido adicional puede ser añadido individual o colectivamente, por ejemplo, para mejorar la producción, la purificación, la estabilización *in vivo* o *in vitro*, el acoplamiento o la detección del polipéptido. Dichos residuos de aminoácidos adicionales pueden comprender uno o más residuos de aminoácidos añadidos para el acoplamiento químico, que podría permitir por ejemplo el acoplamiento del polipéptido de unión a ABD a una resina o matriz, por ejemplo una resina basada en Sefarosa o una resina de acoplamiento SulfoLink. Un ejemplo de esto es la adición de un residuo de cisteína como un residuo de aminoácido adicional, o como uno de un número de residuos de aminoácidos adicionales. En una realización, el polipéptido de unión de ABD descrito en la presente memoria comprende un residuo de cisteína en el extremo C-terminal del polipéptido, por ejemplo en el extremo C-terminal. En una realización, dicha cisteína es una parte de un tripeptido VDC adicional C-terminal. En una realización, dicha cisteína es una C C-terminal sola.

35 En una realización particularmente específica, el polipéptido de unión a ABD comprende un dímero de dos dominios de unión de ABD como se ha definido anteriormente, así como un residuo de cisteína C - terminal.

40 Tales residuos de aminoácidos adicionales pueden proporcionar también una "etiqueta" para la purificación o detección del polipéptido, tal como una etiqueta His₆ o una etiqueta "myc" (c-myc) o una etiqueta "FLAG" para la interacción con anticuerpos específicos de la etiqueta o la cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) en el caso de la etiqueta His₆.

Los aminoácidos adicionales descritos anteriormente se pueden acoplar al polipéptido de unión a ABD por medio de conjugación química (utilizando métodos de química orgánica conocidos) o por medio de cualquier otro método, tal como la expresión del polipéptido de unión a ABD como una proteína de fusión.

45 En un aspecto adicional, se proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de unión a ABD como se ha descrito anteriormente. Un vector de expresión que comprende tal polinucleótido puede permitir la producción de un polipéptido de unión a ABD, por ejemplo por medio de la expresión en una célula anfitriona. Tales herramientas para la expresión del polipéptido de unión a ABD descrito en la presente memoria están incluidas en la presente descripción, así como los métodos que las utilizan para la producción recombinante del polipéptido de unión a ABD.

50 En otra realización de la presente invención se proporciona una combinación del polipéptido de unión a ABD y un agente detectable. En una realización particular, el agente detectable se selecciona entre un agente fluorescente y un agente radiactivo. Los agentes detectables fluorescentes incluyen polipéptidos fluorescentes, tales como proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja, luciferasa y variantes de los mismos. Los agentes radiactivos detectables útiles en este contexto incluyen, por ejemplo, radionúclidos tales como ³H e ¹²⁵I.

55 Aunque la invención se ha descrito con referencia a diversas realizaciones ilustrativas, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar diversos cambios y que se pueden sustituir equivalentes 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 esté limitada a ninguna realización particular contemplada para llevar a cabo esta invención, sino que la invención incluirá todas las realizaciones que caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

5 La Figura 1 es una lista de secuencias de aminoácidos de ejemplos de motivos de unión a ABD comprendidos en los polipéptidos de unión a ABD de la invención (SEQ ID NO: 1-52), ejemplos de polipéptidos de unión a ABD de 49 unidades de acuerdo con la invención (SEQ ID NO: 53-104), ejemplos de polipéptidos de unión a ABD de 58 unidades de acuerdo con la invención (SEQ ID NO: 105-156) así como las secuencias de variantes de dominio de unión a albúmina (SEQ ID NO: 157-162) utilizadas para la selección y escrutinio, o utilizadas en proteínas de fusión para la ilustración de la invención.

La Figura 2 muestra la respuesta en ELISA para una selección de variantes Z analizadas con 2 µg/ml de PEP07911 biotinilado, como se describe en el Ejemplo 1. Las respuestas se normalizaron dividiendo las absorbancias con la señal del control positivo en la placa de ELISA.

15 La Figura 3 muestra la respuesta para una selección de variantes Z en un análisis ELISA de bloqueo, realizado como se describe en el Ejemplo 1. Las preparaciones de periplasma de variantes Z se sometieron a ensayo frente a 0,2 µg/ml de PEP07911 con o sin la adición de un exceso de 10x HSA. Las barras de color negro corresponden a muestras sin HSA y las barras de color gris a muestras con HSA añadido como agente de bloqueo.

La Figura 4 muestra el resultado del estudio de la columna I descrito en el Ejemplo 3. Las barras en el diagrama representan las cantidades relativas de la muestra liberada de cada una de las resinas acopladas a la variante Z de unión a ABD después de las diferentes etapas de lavado y elución especificadas en la Tabla 1.

La Figura 5 muestra el resultado del estudio de la columna II descrito en el Ejemplo 3. La Figura 5A representa las cantidades relativas de muestra liberada de cada una de las resinas acopladas a la variante Z de unión a ABD, o de una resina de HSA-Sefarosa incluida como referencia, después de una primera (a) o segunda (b) elución con citrato de sodio 0,1 M, pH 3,0 o HAc 0,5 M, pH 2,5, respectivamente. La Figura 5B muestra el resultado del análisis SDS-PAGE de las fracciones correspondientes eluidas de la resina acoplada a la variante Z en la Figura 5A. "M" se refiere al patrón de Proteína pre-coloreada de Novex Sharp (Invitrogen, PM: 216, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 3,5 kDa) y "Muestra cargada" hace referencia al extracto bacteriano, que contiene PEP08515, cargado inicialmente en cada resina acoplada con variante Z. Se cargaron 20 µl de cada uno de los productos eluido de las resinas acopladas con variante Z, 5 µl de patrón de proteína o extracto bacteriano en una calle del gel de SDS-PAGE. La Figura 5C muestra el resultado del análisis SDS-PAGE de las fracciones correspondientes eluidas de la resina de HSA Sefarosa en la Figura 5A. Calle 1: Primera elución con citrato sódico 0,1 M, pH 3,0 (pH 3 (a)). Calle 2: Segunda elución con citrato sódico 0,1 M, pH 3,0 (pH 3 (b)). Calle 3: Primera elución con HAc 0,5 M, pH 2,5 (pH 2,5 (a)). Calle 4: Segunda elución con HAc 0,5 M, pH 2,5 (pH 2,5 (b)). Se cargaron 20 µl de cada producto eluido en el gel de SDS-PAGE. "M" se refiere al patrón de Proteína pre-coloreada de Novex Sharp (Invitrogen, PM: 216, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 3,5 kDa) de los cuales se cargaron 5 µl.

La Figura 6 muestra un cromatograma de purificación por afinidad, llevado a cabo como se describe en el Ejemplo 4, de una proteína de fusión a ABD sobre una resina de EAH-Sefarosa acoplada con His₆-(Z06677)₂-Cys (línea continua). Se incluye como referencia la purificación de una muestra idéntica sobre una resina de Sefarosa acoplada con HSA (línea discontinua). El punto de inyección de la muestra se indica con una flecha. A y B indican las fracciones de flujo continuo, y C y D las fracciones eluidas, de la resina acoplada con His₆-(Z06677)₂-Cys y la resina acoplada a HSA, respectivamente. La elución se realizó con un gradiente de pH lineal que variaba de pH 5,5 a pH 2,3. El pH (línea de puntos) se controló mediante el medidor de pH incorporado del sistema de HPLC.

La Figura 7 muestra la capacidad de unión dinámica de His₆-(Z06677)₂-Cys acoplado a resina de EAH-Sefarosa (línea continua), medida después de incubaciones alcalinas repetidas llevadas a cabo como se indica y como se describe adicionalmente en el Ejemplo 4. La capacidad de unión de HSA acoplada a resina de Sefarosa (línea discontinua) se incluye como referencia.

La Figura 8A muestra un cromatograma de purificación por afinidad de la proteína de fusión a ABD PEP10986 sobre agarosa anti-ABD llevada a cabo como se describe en el Ejemplo 7. El punto de inyección de muestra se indica mediante una flecha. Se muestra la señal de absorbancia a 280 nm (línea continua). FT y E se refieren a la fracción de flujo continuo y a la fracción eluida, respectivamente. La elución se realizó con HAc 0,1 M, pH 2,9 y el pH (línea de puntos) se controló mediante el medidor de pH incorporado del sistema de HPLC.

La Figura 8B muestra el resultado del análisis de SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas de la purificación descrita en el Ejemplo 7. Calle 1: Extracto bacteriano aclarado cargado sobre la columna, Calle 2: Fracción E1, Calle 3: Fracción E2 y Calle 4: Fracción E3. "M" se refiere al patrón de Proteína pre-coloreada de Novex Sharp (Invitrogen, PM: 216, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 3,5 kDa). Se cargaron 5 µl de cada muestra en las calles respectivas del gel de SDS-PAGE, excepto para la calle 2 donde se cargaron 1,25 µl.

La Figura 9A muestra un cromatograma de purificación por afinidad de la proteína de fusión a ABD PEP03973 sobre

agarosa anti-ABD llevada a cabo como se describe en el Ejemplo 8. El punto de inyección de muestra se indica mediante una flecha. Se muestra la señal de absorbancia a 280 nm (línea continua). FT y E se refieren a la fracción de flujo continuo y a la fracción eluida, respectivamente. La elución se realizó con HAc 0,1 M, pH 2,9 y el pH (línea de puntos) se controló mediante el medidor de pH incorporado del sistema de HPLC.

5 La Figura 9B muestra el resultado del análisis de SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas de la purificación descrita en el Ejemplo 8. Calle 1: Extracto bacteriano aclarado cargado en la columna, Calle 2 y Calle 3: Flujo continuo, Calle 4: Fracción E1, Calle 5: Fracción E2, Calle 6: Fracción E3, Calle 7: Fracción E4, Calle 8: Fracción E5. "M" se refiere al patrón de Proteína pre-coloreada de Novex Sharp (Invitrogen, PM: 216, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 3,5 kDa). Se cargaron 5 µl de cada muestra en las calles respectivas del gel de SDS-PAGE.

10 La Figura 10A muestra un cromatograma de purificación por afinidad de la proteína de fusión a ABD PEP06548 sobre agarosa anti-ABD llevada a cabo como se describe en el Ejemplo 9. El punto de inyección de muestra se indica mediante una flecha. Se muestra la señal de absorbancia a 280 nm (línea continua). FT y E se refieren a la fracción de flujo y a la fracción eluida, respectivamente. La elución se realizó con HAc 0,1 M, pH 2,9 y el pH (línea de puntos) se controló mediante el medidor de pH incorporado del sistema de HPLC.

15 La Figura 10B muestra el resultado del análisis de SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas de la purificación descrita en el Ejemplo 9. Calle 1: Extracto bacteriano aclarado cargado en la columna, Calle 2: Fracción E1. "M" se refiere al patrón de Proteína pre-coloreada de Novex Sharp (Invitrogen, PM: 216, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 3,5 kDa). Se cargaron 5 µl en la calle M y la calle 1 y se cargaron 5,8 µl en la calle 2 del gel de SDS-PAGE.

20 La Figura 11A muestra un cromatograma de la purificación de la proteína de fusión a ABD PEP17081 sobre agarosa anti-ABD llevada a cabo como se describe en el Ejemplo 10. Se muestran la señal de absorbancia a 280 nm (línea continua) y la conductividad (línea punteada). El punto de inyección de muestra se indica mediante una flecha. FT y E se refieren a la fracción de flujo continuo y a la fracción eluida, respectivamente.

25 La Figura 11B muestra el resultado del análisis de SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas de diferentes etapas de la purificación descritas en el Ejemplo 10. Calle M: 5 µl de Patrón de Proteína pre-coloreada de Novex Sharp, Invitrogen (216, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 3,5 kDa). Calle 1: se cargaron 5 µl del producto lisado de *E. coli* tratado térmicamente, aclarado en la columna de agarosa anti-ABD. Calle 2: 5 µl del flujo continuo de la columna de agarosa anti-ABD (FT en la Figura 11A). Calle 3: 3,6 µl de la agrupación eluida de la columna de agarosa anti-ABD (E en la Figura 11A). Calle 4: 12 µl de PEP17081 purificado adicionalmente por RPC (cromatografía de fase inversa) y con tampón intercambiado.

30 La Figura 12A muestra un cromatograma de purificación por afinidad de la Proteína 1, que comprende ABD035 (SEQ ID NO: 159) fusionado en su extremo C a una hormona proteica, sobre agarosa anti-ABD realizada como se describe en el Ejemplo 11. El punto de inyección de muestra se indica mediante una flecha. Se muestran la señal de absorbancia a 280 nm (línea continua) y la conductividad (línea punteada). FT, W y E se refieren a la fracción de flujo continuo, fracciones de lavado y fracción eluida, respectivamente. La primera etapa de lavado, W1, se realizó con 4 CV de TST y la segunda etapa de lavado, W2, con 3 CV de NH₄Ac 5 mM, pH 5,5.

35 La Figura 12B muestra el resultado del análisis de SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas de la purificación descrita en el Ejemplo 11. Calles 1 - 3: proteína purificada por SEC: 10 µg (1), 5 µg (2) y 1 µg (3). Calle 4: Muestra de proteína cargada en la columna de agarosa anti-ABD, es decir, la proteína purificada por SEC se diluyó 1:10 en TST. Calle 5: FT concentrado 20 veces. Calle 6: W1 concentrado 60 veces. Calles 7, 8 y 9: Proteína eluida: 10 µg (7), 5 µg (8) y 1 µg (9), respectivamente. Las calles marcadas con "M" se cargaron con un marcador de peso molecular de proteína (PM: 200, 116,3, 97,4, 66,3, 55,4, 36,5, 31, 21,5, 14,4, 6, 3,5, 2,5 kDa). Las flechas indican bandas débiles de proteínas contaminantes que eran visibles en el gel de SDS-PAGE en muestras purificadas sólo por SEC, pero que se eliminaron eficazmente por purificación sobre la resina de agarosa anti-ABD.

45 La Figura 13A muestra un cromatograma de purificación por afinidad de la Proteína 2, que comprende ABD035 (SEQ ID NO: 159) fusionado en su extremo N a una hormona peptídica, sobre agarosa anti-ABD realizada como se describe en el Ejemplo 12. El punto de inyección de muestra se indica mediante una flecha. Se muestran la señal de absorbancia a 280 nm (línea continua) y la conductividad (línea punteada). FT, W y E se refieren a la fracción de flujo continuo, fracciones de lavado y fracción eluida, respectivamente. La primera etapa de lavado, W1, se realizó con 8 CV de TST y la segunda etapa de lavado, W2, con 3 CV de NH₄Ac 5 mM, pH 5,5.

50 La Figura 13B muestra el resultado del análisis de SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas de la purificación descrita en el Ejemplo 12. Calle 1: Muestra de proteína cargada en la columna de agarosa anti-ABD. Calle 2: FT. Calles 4-6: Fracciones lavadas. Calles 7-13: Fracciones de proteína eluidas dentro del doble pico marcado en la figura 13A. Las fracciones correspondientes al primer pico dentro del pico doble se cargaron en las calles 7-10. Las calles marcadas con "M" se cargaron con un marcador de peso molecular de proteína (PM: 200, 116,3, 97,4, 66,3, 55,4, 36,5, 31, 21,5, 14,4, 6, 3,5, 2,5 kDa).

Ejemplos

Se utilizaron los siguientes materiales a lo largo de este trabajo, excepto cuando se indique lo contrario:

- *Escherichia coli* Cepa XL1-Blue (Agilent Technologies, núm. de catálogo 200268)
- Dominios de unión a la albúmina ABD001 (SEQ ID NO: 157), C-ABD001 (SEQ ID NO: 158), ABD035 (SEQ ID NO: 159), PP013 (SEQ ID NO: 160), PEP07986 (SEQ ID NO: 161), PEP07911 (SEQ ID NO: 162), producidos esencialmente como se describe en los documentos WO2009/016043 o WO2012/004384.

5 Ejemplo 1

Selección y escrutinio de las variantes Z de unión a ABD

Materiales y métodos

10 Biotinilación de la proteína diana: ABD001 con una cisteína N-terminal (C-ABD001; SEQ ID NO: 158) y PEP07911 (SEQ ID NO: 162) se biotinilaron utilizando EZ-Link Maleimide PEG₂-Biotin (Pierce, núm. de catálogo 21901). En resumen, la proteína se disolvió en fosfato sódico 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5. Se añadió ditiotreitól (DTT) a una concentración final de 20 mM y las muestras se incubaron durante 1 h a 34°C mezclando por volteo. El tampón se intercambió por tampón de conjugación (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0) utilizando columnas PD-10 desechables (GE Healthcare, núm. de catálogo 17-0851-01). Se añadió un exceso molar de 5 veces (5x) de EZ-Link Maleimide PEG₂-Biotin (disuelto en tampón de conjugación) a las muestras de proteína y la incubación prosiguió durante 2 h a temperatura ambiente (RT) mediante mezclado por volteo. El intercambio subsiguiente de tampón por PBS (fosfato 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, pH 7,4) se realizó utilizando columnas PD-10. Se biotiniló PEP07986 (SEQ ID NO: 161) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante a RT durante 30 min utilizando No-Weigh EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, núm. de catálogo 21327) con un exceso molar de 10x. El intercambio subsiguiente de tampón por PBS se realizó utilizando una casete de diálisis (Slide-a-lyzer 3,5 K, 3500 MWCO, Pierce, núm. de catálogo 66333) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 Selección por presentación en fagos de las variantes Z de unión a ABD: Se utilizó una biblioteca de variantes aleatorias de la proteína Z presentada sobre el bacteriófago, construida en el fagémido pAY02047 esencialmente como describen Grönwall et al. (J Biotechnol, 128:162-183, 2007), para seleccionar los polipéptidos de unión a ABD. La biblioteca, Zlib004Naive.I, utiliza la molécula de unión a ADN polimerasa de *Taq* Z03639 (descrita por Gunneriusson et al., en Protein Eng. 12: 873-878, 1999, donde se denominó $Z_{TaqS1-1}$) como compañero de fusión. La biblioteca tenía un tamaño real de $1,4 \times 10^{10}$ variantes

20 Las provisiones de partida de fago se prepararon en un fermentador de 20 l. Se inocularon células de provisión de partida en glicerol que contenía la biblioteca de fagémidos Zlib004Naive.I en 20 l de TSB-YE (Caldo de Soja tratado con Tripsina-Extracto de levadura, 30 g/l TSB, 5 g/l de extracto de levadura) con un suplemento de glucosa al 2% y 100 µg/ml de ampicilina. Los cultivos se hicieron crecer a 37°C en un fermentador (Belach Bioteknik, BR20). Cuando las células alcanzaron una densidad óptica (DO) de 0,7-0,8, se infectaron aproximadamente 2,6 l del cultivo utilizando un exceso molar de 10x de fago auxiliar M13K07 (New England Biolabs, núm. de catálogo N0315S). Las células se incubaron durante 30 minutos, después de lo cual el fermentador se llenó hasta 20 l con TSB-YE con un suplemento de IPTG 0,1 mM (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido, para la inducción de la expresión), 25 µg/ml de kanamicina y 12,5 µg/ml de carbenicilina, y las células se cultivaron a 30°C durante 22 h. Las células en el cultivo se sedimentaron por centrifugación a 15900 g y las partículas de fago que quedaban en el medio se hicieron precipitar dos veces en PEG/NaCl (polietilenglicol/cloruro sódico), se filtraron y se disolvieron en PBS y glicerol como describen Grönwall et al., más arriba. Las provisiones de partida de fago fueron almacenadas a -80°C antes de su uso.

30 Las selecciones se realizaron en tres ciclos contra las diferentes variantes de ABD biotinilado. La preparación de la provisión de partida de fago, el procedimiento de selección y la amplificación del fago entre ciclos de selección se realizaron esencialmente como se describe para la selección frente a otra diana en el documento WO2009/077175. Se utilizó PBS con un suplemento de gelatina al 0,1% y Tween20 al 0,1% como tampón de selección y los complejos diana-fago fueron capturados directamente por Dynabeads® M-280 Streptavidin (Dyna, núm. de catálogo 112.06). Se utilizó 1 mg de cuentas por 0,25 µg de ABD. Se utilizó *E coli* cepa XL1-Blue para la amplificación del fago. La selección se realizó en tres ciclos divididos en tres pistas: una pista que utilizaba PEP07911, una pista que utilizaba C-ABD001 y una pista que alternaba entre C-ABD001 y PEP07986. En el ciclo 1 de las selecciones, se utilizaron PEP07911 o C-ABD001 100 nM en las diferentes pistas de selección, y se realizaron dos lavados con PBST al 0,1% (PBS con un suplemento de Tween-20 al 0,1%). Se aplicó una rigurosidad mayor, utilizando una concentración reducida de diana y un mayor número de lavados, en los dos ciclos posteriores. Para las pistas de selección con una sola diana, se utilizaron PEP07911 o C-ABD001 50 nM seguido de 25 nM, en el ciclo 2 y 3, respectivamente. En la pista con la diana alternante, se utilizó PEP07986 75 nM en el ciclo 2 y se utilizó C-ABD001 40 nM en el ciclo 3. Para todas las pistas, se realizaron 4 y 8 lavados en el ciclo 2 y 3, respectivamente, utilizando PBST al 0,1%. Después del lavado, se hicieron eluir los fagos unidos con 500 µl de glicina-HCl 0,1 M, pH 2,2 seguido de neutralización inmediata con 50 µl de Tris-HCl, pH 8,0 y 450 µl de PBS. En el último ciclo de selección, todas las pistas se hicieron eluir primero con HAc 0,5 M, pH 4,0, seguido de elución con glicina-HCl como se ha descrito anteriormente. A continuación se trataron los diferentes productos eluidos por separado.

Escrutinio ELISA de variantes Z: Para verificar que las moléculas de la variante Z seleccionada podrían interactuar

con diferentes variantes de ABD, se realizaron análisis ELISA. Las variantes Z se produjeron inoculando colonias individuales de las selecciones en 1 ml de medio TSB-YE con un suplemento de 100 µg/ml de ampicilina e IPTG 0,1 mM en placas de pocillos profundos (Nunc, núm. catálogo 278752). Las placas se incubaron durante 18-24 horas a 37°C. Las células se sedimentaron por centrifugación, se resuspendieron en 400 µl de PBST al 0,05% y se congelaron a -80°C para liberar la fracción periplásmica de las células. Las muestras congeladas se descongelaron seguidamente en un baño de agua y la congelación-descongelación se repitió ocho veces. Se añadieron 400 µl de PBST al 0,05% a las muestras y las células se sedimentaron por centrifugación. El sobrenadante periplásmico contenía las variantes Z en forma de fusiones a la molécula de unión a ADN polimerasa de *Taq* Z03639, expresada como AQHDEALE-[Z#####]-VDYV-[Z03639]-YVPG. Z ##### se refiere a variantes Z de 58 residuos de aminoácidos individuales.

Se recubrieron placas ELISA de 96 pocillos de superficie media (Costar, núm. de catálogo 3690) con 50 µl/pocillo de tampón de recubrimiento (carbonato sódico 50 mM, pH 9,6) que contenía 4 µg/ml de un anticuerpo específico para variantes Z (Affibody, núm. catálogo 20.1000.01.0005) y se incubaron durante la noche a 4°C. La solución de anticuerpo se vertió y los pocillos se bloquearon con 100 µl de PBSC (PBS con un suplemento de caseína al 0,5%, Sigma, núm. de catálogo C8654) durante 2 h a RT. La solución de bloqueo se descartó y se añadieron 50 µl de solución periplásmica a los pocillos y se incubaron durante 1,5 horas a RT bajo agitación lenta. Los sobrenadantes se vertieron y los pocillos se lavaron 4 veces con PBST al 0,05%. A continuación se añadieron 50 µl de PEP07986 o PEP07911 biotinilados, a una concentración de 2 µg/ml en PBSC, a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 1 h a RT seguido de lavados como se ha descrito anteriormente. Se añadió a los pocillos estreptavidina- HRP (peroxidasa de rábano picante, Thermo Scientific, núm. de catálogo N100) diluida 1:30.000 en PBSC, y las placas se incubaron durante 45 min. Después del lavado como se ha descrito anteriormente, se añadieron 50 µl de sustrato ImmunoPure TMB (Thermo Scientific, núm. de catálogo 34021) a los pocillos y se trataron las placas de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La absorbancia de los pocillos se midió a 450 nm utilizando un lector de placas de múltiples pocillos, Victor³ (Perkin Elmer).

Como control positivo, se analizó una fracción periplásmica que contenía una variante Z que se unía a una proteína diana irrelevante pero especificada y expresada como anteriormente, frente a 5 µg/ml de esta proteína diana, biotinilada. Como control negativo, se analizó la misma preparación periplásmica frente a PEP07986 o PEP07911. Se realizó la secuenciación para los clones con valores de absorbancia positivos frente a PEP07986 o PEP07911.

Secuenciación: Los fragmentos de PCR se amplificaron en dos etapas a partir de colonias individuales utilizando un programa de PCR convencional y los cebadores AFFI-21 (5'-tgcttccggctcgtatgtgtgtg; SEQ ID NO:163) y AFFI-22 (5'-cggaaccagagccaccaccgg; SEQ ID NO:164). La secuenciación de fragmentos amplificados se realizó utilizando el oligonucleótido biotinilado AFFI-72 (5'-biotina-cggaaccagagccaccaccgg; SEQ ID NO: 165) y un kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, núm. de catálogo 4336919), utilizados de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las reacciones de secuenciación se purificaron mediante la unión a cuentas recubiertas con estreptavidina magnética (Detach Streptavidin Beads, Nordiag, núm. de catálogo 2012-01) utilizando Magnatrix 8000 (Biosolución Magnética) y se analizaron en ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems).

ELISA de bloqueo: Se sometió un subconjunto de clones del escrutinio con ELISA inicial a un ensayo de bloqueo de ELISA con el fin de dilucidar si su unión a la diana estaba afectada por la presencia de HSA. Para las variantes Z seleccionadas, se usaron las mismas fracciones periplásmicas que anteriormente. El análisis de bloqueo de ELISA se realizó como el análisis de escrutinio de ELISA, con la siguiente modificación del protocolo introducida en la etapa diana: se mezcló HSA con la proteína diana antes de la adición a la placa de análisis. Se mezclaron 0,2 µg/ml de PEP07911 biotinilado con un exceso molar de 10x HSA y a continuación se incubaron durante 15 minutos a RT para permitir la formación de complejos antes de la adición a la placa. Como control positivo, se analizó una fracción periplásmica que contenía una molécula que se unía a una proteína diana irrelevante y se expresó como anteriormente, frente a 5 µg/ml de proteína diana específica biotinilada. Como control negativo, se analizó la misma preparación periplásmica frente a PEP07911 biotinilado. Como blanco, se añadió PBSC en lugar de preparación periplásmica y se añadió PEP07911 biotinilado como diana. Todos los controles se prepararon como muestras con y sin adición de HSA de la misma manera que anteriormente.

Resultados

Selección por presentación en fagos de las variantes Z de unión a ABD: Se obtuvieron clones individuales después de tres ciclos de selecciones por presentación en fagos frente a diferentes variantes de ABD biotinilado. El rendimiento de partículas de fago (partículas de fago fuera/partículas de fago dentro) aumentó para cada ciclo, indicando un enriquecimiento en clones de unión a la diana.

Escrutinio ELISA de variantes Z: Los clones obtenidos después de tres ciclos de selección se produjeron en placas de 96 pocillos y se escrutaron para determinar la actividad de unión a ABD en ELISA. Los resultados de una selección de los clones positivos (señales que corresponden a al menos 2x el control negativo) analizados frente a PEP07911 se presentan en la Figura 2. La molécula de control específica para una proteína irrelevante proporcionó una señal positiva para la proteína específica, mientras que no se obtuvo ninguna señal frente a PEP07986 o PEP07911.

ELISA de bloqueo: Los clones positivos para PEP07986 o PEP07911 se sometieron a un análisis de bloqueo que incluía HSA, para ver si las variantes Z tenían sitios de unión solapantes con el ligando natural HSA. Para todos los clones sometidos a ensayo, la señal de unión a PEP07911 se extinguió completamente por la presencia de HSA, alcanzando el mismo nivel que el fondo (Figura 3). La unión del control positivo no se vio afectada por la adición de un exceso de HSA y el blanco no mostró ninguna señal de fondo.

Secuenciación: Se realizó la secuenciación para los clones con valores de absorbancia positivos frente a ABD en el escrutinio por ELISA. A cada variante se le asignó un número de identificación único #####, y las variantes individuales se denominan Z#####. Las secuencias de aminoácidos de las variantes Z de 58 residuos de aminoácido de longitud se enumeran en la Figura 1 y en la lista de secuencias como SEQ ID NO: 105-156. Los motivos de unión a ABD deducidos de estas variantes Z se denominan BM##### y se enumeran en la Figura 1 y en la lista de secuencias como SEQ ID NO: 1-52. Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de 49 residuos de aminoácidos de longitud que se ha pronosticado que constituyen el haz de tres hélices completo dentro de cada una de estas variantes Z se denominan P##### y se enumeran en la Figura 1 y en la lista de secuencias como SEQ ID NO: 53-104.

Ejemplo 2

Clonación y producción de variantes Z de unión a ABD

Materiales y métodos

Subclonación de variantes Z: Se amplificaron los ADN de siete variantes Z de unión a ABD, Z06608 (SEQ ID NO:107), Z06620 (SEQ ID NO:110) Z06638 (SEQ ID NO:106), Z06650 (SEQ ID NO:108), Z06677 (SEQ ID NO:105), Z06678 (SEQ ID NO:109) y Z06695 (SEQ ID NO:111), a partir del vector de la biblioteca pAY02047. Se aplicó una estrategia de subclonación para la construcción de moléculas de variantes Z diméricas con etiqueta His₆ N-terminal y Cys C-terminal utilizando técnicas de biología molecular convencionales y como se describe en detalle en el documento WO 2009/077175 para las variantes Z que se unen a otra diana. Los fragmentos del gen Z se subclonaron en el vector de expresión pAY01449 dando como resultado la secuencia codificada MGSSHHHHHHLQ-[Z#####][Z#####]-VDC.

Cultivo y purificación: Se transformaron células BL21 de *E coli* (DE3) (Novagen) con plásmidos que contenían el fragmento del gen dimérico de cada variante Z respectiva y se cultivaron a 37°C en 1 l de medio TSB + YE (Caldo de soja tratado con Tripsina con extracto de levadura) con un suplemento de 50 µg/ml de Kanamicina. A una DO₆₀₀ = 1, se añadió IPTG para inducir la expresión de la proteína a una concentración final de 0,17 mM y el cultivo se incubó a 37°C durante otras 5 h. Las células se cosecharon por centrifugación.

Se suspendieron nuevamente 4,8 g de cada sedimento celular en 30 ml de tampón de unión desnaturizante (fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, urea 8 M, pH 7,4) con un suplemento de 29 U/ml de Benzonase® (Merck, núm. de catálogo 10.1654.0001) y se incubaron con agitación a RT durante 1 h para liberar la proteína expresada. Los residuos celulares se eliminaron por centrifugación y cada sobrenadante se aplicó sobre una columna His GraviTrap IMAC de 1 ml (GE Healthcare, núm. de catálogo 11-0033 - 99). Los contaminantes se eliminaron mediante lavado con tampón de unión desnaturizante, tampón de unión nativo (fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, pH 7,4) y tampón de lavado (fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 60 mM, pH 7,4) y las variantes Z de unión a ABD se hicieron eluir posteriormente con tampón de elución (fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 250 mM, pH 7,4). Cada variante Z de unión a ABD purificada se transfirió a NH₄HCO₃ 10 mM por medio de cromatografía de exclusión por tamaño. Las concentraciones de proteína se determinaron midiendo la absorbancia a 280 nm, utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 y utilizando el coeficiente de extinción de la proteína respectiva. Las variantes Z de unión a ABD se liofilizaron y la pureza de los productos finales se analizó mediante SDS-PAGE teñida con Azul de Coomassie. Se confirmó la identidad de cada variante Z de unión de ABD purificada mediante análisis HPLC-MS.

Resultados

Cultivo y purificación: Las siete variantes Z de unión a ABD Z06608 (SEQ ID NO:107), Z06620 (SEQ ID NO:110), Z06638 (SEQ ID NO:106), Z06650 (SEQ ID NO:108), Z06677 (SEQ ID NO:105), Z06678 (SEQ ID NO:109) y Z06695 (SEQ ID NO:111), construidas como dímeros y con una etiqueta His₆ N-terminal y una Cys C-terminal, se expresaban bien en *E coli*. La cantidad de proteína purificada por IMAC a partir de 4,8 g de sedimentos bacterianos, determinada espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 280 nm, osciló entre 3 mg y 19 mg para las diferentes variantes Z de unión a ABD.

El análisis por SDS-PAGE de cada preparación de proteína final mostró que éstas contenían predominantemente la respectiva variante Z de unión a ABD. El peso molecular correcto de cada variante Z de unión a ABD se confirmó mediante HPLC-MS.

Ejemplo 3

Evaluación de las características de unión y elución de las variantes Z de unión a ABD

5 En este Ejemplo, se estudiaron las características de unión y elución de un conjunto de polipéptidos de unión a ABD, seleccionados y producidos como se describe en los Ejemplos 1 y 2, respectivamente, en un formato a pequeña escala utilizando columnas giratorias.

Materiales y métodos

10 Acoplamiento de las variantes Z de unión a ABD a la resina: Se resuspendió 1 mg de cada una de las variantes Z de unión a ABD liofilizadas Z6608, Z06620, Z06638, Z06650, Z06677, Z06678 y Z06695, en el formato His₆-(Z#####)₂-Cys producido como se describe en el Ejemplo 2, en un tampón reductor (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, DTT 20 mM, pH 8,5) y se incubó a RT durante 2 h. Las soluciones de proteína reducidas se transfirieron a un tampón de acoplamiento (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8,5), incluyendo DTT 50 mM, utilizando cromatografía de exclusión por tamaños y luego se mezclaron con porciones de 0,2 ml de SulfoLink Coupling Resin (Thermo Fisher Scientific, núm. catálogo 20401). Este procedimiento permite la reacción dirigida al sitio entre los grupos tiol de los residuos de cisteína C-terminales de las variantes Z de unión a ABD y los grupos yodoacetilo de la resina, formando un enlace tioéter covalente. La reacción de acoplamiento se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El grado de acoplamiento, definido como mg de variante Z de unión de ABD acoplada por ml de resina, se determinó como sigue: La cantidad de variante Z de unión a ABD acoplada se calculó restando la cantidad de material desacoplado de la cantidad original de muestra, basándose en las concentraciones obtenidas por las medidas espectrofotométricas de la absorbancia a 280 nm. La cantidad de variante Z de unión a ABD acoplada en mg se dividió a continuación por el volumen de la Resina de Acoplamiento SulfoLink.

15 Estudio de columna I: Evaluación de las resinas acopladas a variantes Z de unión a ABD utilizando una muestra pura: Se realizó un primer estudio de columna para someter a ensayo las propiedades de unión, lavado y elución de cada una de las siete variantes Z de unión a ABD acopladas a resina y utilizando una muestra previamente purificada de la proteína de fusión a ABD PEP08517. PEP08517 comprende el dominio de unión a albúmina PP013 (SEQ D NO: 160) fusionado en su extremo N a una variante de unión a citoquina de la proteína Z. Se transfirieron porciones de 0,1 ml de las resinas a tubos de ensayo y se añadieron 0,1 ml de una muestra pura de PEP08517 a 2 mg/ml en tampón de acoplamiento. Los tubos se incubaron sobre una rueda giratoria durante 1 hora a RT. Cada mezcla de muestra-resina se transfirió a una columna giratoria vacía. La proteína no unida se recogió por centrifugación (flujo continuo, FT). Se añadieron a continuación 0,1 ml de soluciones diferentes, especificadas en la Tabla 1, para lavar y posteriormente eluir las moléculas de PEP08517 unidas. Cada lavado y fracción de elución se recogió por centrifugación.

20 Las fracciones recogidas se analizaron en un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 280 nm.

Tabla 1: Especificación de la muestra y las soluciones en el estudio de columna I

Etapa	Muestra/Solución	Abreviatura
1	Muestra pura de PEP08517 en Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8,5	PEP08517
2	PEP08517 no unida	FT
3	KCl 2,68 mM, KH ₂ PO ₄ , 1,47 mM, NaCl 137 mM, Na ₂ HPO ₄ 8,1 mM, PH 7,4	PBS
4	Tris-HCl 5 mM, pH 8	Tris
5	HAc 0.5 M/NaAc, pH 4	pH 4 (a)
6	HAc/NaAc 0,5 M, pH 4	pH 4 (b)
7	HAc 0,5 M, pH 2,5	pH 2,5 (a)
8	HAc 0,5 M, pH 2,5	pH 2,5 (b)

35 Estudio de columna II: Evaluación de las resinas acopladas a variantes Z de unión a ABD utilizando un extracto bacteriano: Se llevó a cabo un segundo estudio de columna para someter a ensayo adicionalmente las propiedades de unión, lavado y elución de cuatro resinas acopladas a variantes Z de unión a ABD del estudio de columna I. Los

ligandos de estas resinas fueron His₆-(Z06608)₂-Cys, su₆-(Z06638)₂-Cys, His₆-(Z06677)₂-Cys e His₆-(Z06650)₂-Cys. Se incluyó como referencia una columna adicional cargada con HSA Sefarosa (albúmina de suero humano acoplada, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a través de aminas libres a Sefarosa 4 Fast Flow activado con CNBr, GE Healthcare, número de catálogo 17-0981). Un extracto bacteriano aclarado, preparado a partir de un sedimento de *E coli* por sonicación y centrifugación, se utilizó como muestra en este experimento. Se transfirieron 0,17 ml del extracto bacteriano, que contenía aproximadamente 0,5 mg de PEP08515 (que comprende el dominio de unión a albúmina PP013 (SEQ ID NO: 160) fusionado en su extremo N a una variante de unión a PDGFR-β (Receptor de Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas beta) de proteína Z) a columnas giratorias cargadas con cada resina respectiva acoplada con variante Z de unión a ABD o HSA Sefarosa. Se recogió el flujo continuo por centrifugación y se volvió a aplicar dos veces a las columnas. Se añadieron diferentes soluciones, especificadas en la Tabla 2, para eliminar las proteínas anfitrionas bacterianas y posteriormente hacer eluir las moléculas de PEP08515 unidas. Las fracciones de lavado y elución se recogieron por centrifugación y se analizaron en un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 280 nm, y mediante SDS-PAGE.

Tabla 2: Especificación de la muestra y soluciones en el estudio de columna II

Etapa	Muestra/Solución	Abreviatura	Volumen (ml)
1	Muestra: extracto bacteriano que contiene PEP08515	PEP08515	0,17
2	Flujo continuo I recogido después de la aplicación de muestra	FT I	0,17
3	Flujo continuo II recogido después de la re-aplicación del flujo continuo I	FT II	0,17
4	KCl 2,68 mM, KH ₂ PO ₄ 1,47 mM, NaCl 137 mM, Na ₂ HPO ₄ 8,1 mM, pH 7,4	PBS	4 X 0,2
5	NH ₄ Ac 5 mM, pH 5,5	NH ₄ Ac	2 X 0,2
6	Citrato sódico 0,1 M, pH 3,0	pH 3,0 (a)	0,1
7	Citrato sódico 0,1 M, pH 3,0	pH 3,0 (b)	0,1
8	HAc 0,5 M, pH 2,5	pH 2,5 (a)	0,1
9	HAc 0,5 M, pH 2,5	pH 2,5 (b)	0,1

Resultados

Eficacia de acoplamiento de polipéptidos de unión a ABD: El grado de acoplamiento de cada polipéptido de unión a ABD a la Resina de Acoplamiento SulfoLink se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3 Grado de acoplamiento de las variantes Z de unión a ABD a la Resina SulfoLink

Polipéptido de unión a ABD	Cantidad de polipéptido acoplado por ml de resina (mg)	Cantidad de polipéptido acoplado por ml de resina (μmol)
His ₆ -(Z06608) ₂ -Cys	2,8	0,19
His ₆ -(Z06620) ₂ -Cys	2,7	0,19
His ₆ -(Z06638) ₂ -Cys	2,9	0,20
His ₆ -(Z06650) ₂ -Cys	3,4	0,23
His ₆ -(Z06677) ₂ -Cys	2,2	0,15
His ₆ -(Z06678) ₂ -Cys	2,1	0,14
His ₆ -(Z06695) ₂ -Cys	3,9	0,27

Estudio de columna I: Evaluación de las resinas acopladas a variantes Z de unión a ABD utilizando una muestra pura: La cantidad de la muestra PEP08517 liberada de cada una de las siete resinas acopladas a la variante Z de unión a ABD después de las diferentes etapas de lavado y elución especificadas en la Tabla 1, y como se determina midiendo la absorbancia a 280 nm, se muestra en la Figura 4.

- 5 En las condiciones estudiadas, las resinas acopladas con las variantes Z de unión a ABD (His₆-(Z06608)₂-Cys, His₆-(Z06638)₂-Cys, His₆-(Z06650)₂-Cys) e His₆-(Z06677)₂-Cys, respectivamente, mostraron el perfil de elución más favorable con una fuga de muestra menor durante la aplicación de la muestra y el lavado y con la mayoría de la muestra liberada por elución con tampón de pH 2,5.

- 10 Ninguna de las resinas acopladas a variantes Z de unión a ABD eluye gran parte de la muestra a pH 4. Curiosamente, algunas resinas, por ejemplo His₆-(Z06608)₂-Cys, eluyeron la mayor parte de la muestra en la segunda adición de tampón de pH 2,5 ("pH 2,5 (b)"), mientras que por ejemplo His₆-(Z06677)₂-Cys eluyó la mayoría de la muestra en la primera adición de tampón de pH 2,5 ("pH 2,5 (a)"), indicando que se podría utilizar un pH de elución más alto con el ligando de afinidad His₆-(Z06677)₂-Cys en comparación con los otros candidatos.

- 15 Estudio de columna II: Evaluación de las resinas acopladas a variantes Z de unión a ABD utilizando un extracto bacteriano: Las cuatro resinas de acoplamiento de variantes Z de unión a ABD de mejor rendimiento del estudio de columna I, incluyendo los ligandos de afinidad His₆-(Z06608)₂-Cys, His₆-(Z06638)₂-Cys, His₆-(Z06650)₂-Cys e His₆-(Z06677)₂-Cys, se seleccionaron para estudios de unión, lavado y elución adicionales en los que se utilizó como muestra un extracto bacteriano que contenía PEP08515. La cantidad de PEP08515 liberada de cada una de las cuatro resinas acopladas con variante Z de unión a ABD, o de una resina de HSA-Sefarosa incluida como referencia, después de las diferentes etapas de elución especificadas en la Tabla 2 y como se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm, se muestra en la Figura 5A.

- 20 El análisis de SDS-PAGE de las mismas fracciones eluidas se muestra en la Figura 5B. Los resultados de los dos análisis concordaron bien, es decir, para un cierto ligando de afinidad, una fracción eluida con una lectura de absorbancia elevada también proporcionaba una banda gruesa en el gel de SDS-PAGE y viceversa para fracciones con una lectura de absorbancia más baja. Como en el estudio de columna I, la resina acoplada con His₆-(Z06677)₂-Cys liberó la mayoría de su proteína unida al intervalo de elución de pH más alto ("pH 3 (a)" y "pH 3 (b)").

25 La pureza de todas las muestras eluidas era generalmente muy alta (superior a 95%, según se estimó a partir del análisis de SDS-PAGE), pero se pudieron observar ligeras diferencias para las diferentes variantes Z de unión a ABD.

- 30 En comparación con la resina de HSA Sefarosa (análisis SDS-PAGE mostrado en la Figura 5C), las resinas acopladas a la variante Z de unión a ABD parecen tener una capacidad de unión más alta así como propiedades de elución más favorables a juzgar tanto por las lecturas de absorbancia como por el análisis de SDS-PAGE. La diferencia de capacidad no se puede deber a diferencias en la densidad del ligando; de hecho, el número de moléculas HSA acopladas sobre la HSA Sefarosa fue aproximadamente 1,5-2,2 veces mayor en comparación con las resinas acopladas a variante Z de unión a ABD.

Ejemplo 4

Caracterización adicional y estudios de columna de una variante Z de unión a ABD

Basándose en los resultados presentados en el Ejemplo 3, se seleccionó His₆-(Z06677)₂-Cys para la caracterización adicional y los estudios en columnas conectadas a un sistema de cromatografía.

40 *Materiales y métodos*

Determinación del punto de fusión por análisis de dicroísmo circular:

- 45 Se llevó a cabo un análisis de dicroísmo circular (CD) para determinar el punto de fusión (T_m) de His₆-(Z06677)₂-Cys. La muestra purificada se diluyó a 0,5 mg/ml en PBS. Se realizó una medición de temperatura variable (VTM), en la que se controló la absorbancia a 220 nm durante el calentamiento de la muestra de 20°C a 90°C, con un gradiente de temperatura de 5°C/min. La T_m se determinó a partir del punto medio de la transición en la gráfica de señal de CD frente a la temperatura. La medición del CD se realizó en un espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco Scandinavia AB) utilizando una célula con una longitud de trayectoria óptica de 1 mm.

- 50 Estudio cromatográfico del pH de elución: Se inmovilizó His₆-(Z06677)₂-Cys sobre EAH-Sefarosa 4B activada (GE Healthcare, núm. catálogo 17-0569-01). La activación e inmovilización se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se determinó el grado de acoplamiento como se describe en el Ejemplo 3. La EAH Sefarosa activada contiene un grupo yodoacetilo que permite el acoplamiento dirigido al sitio a través de la cisteína C-terminal del ligando de afinidad. Se cargaron 0,43 ml de la resina en una columna Tricorn 5/50 (GE Healthcare). Como referencia, se empaquetaron 0,47 ml de HSA Sefarosa (véase el Ejemplo 3) en el mismo tipo de columna.

El experimento de elución se realizó utilizando un sistema de cromatografía ÄKTAexplorer 10 (GE Healthcare). Las

dos columnas se anclaron al sistema y se equilibraron con PBS. Se cargaron 2 ml de una muestra que contenía 1 mg de PEP08519 (que comprende el dominio de unión a la albúmina PP013 (SEQ ID NO: 160) fusionado en su extremo N a una variante de unión a *Taq* Polimerasa de proteína Z) en cada columna seguido de lavado con PBS y citrato sódico 0,1 M, NaCl al 0,9%, pH 5,5. La proteína unida se hizo eluir mediante un gradiente de pH lineal que variaba de pH 5,5 a pH 2,3 (utilizando citrato de sodio 0,1 M, NaCl al 0,9%, pH 5,5 y citrato de sodio 0,1 M, NaCl al 0,9%, pH 2,3) a lo largo de 16 volúmenes de la columna (CV). El pH se controló mediante el medidor de pH incorporado del sistema ÄKTAexplorer.

Estudio de cromatografía de la capacidad de unión y resistencia al álcali de un polipéptido de unión de ABD: En este experimento, se sometieron a ensayo la capacidad de unión dinámica y la resistencia al álcali para la resina His₆-(Z06677)₂-Cys y una resina de HSA Sefarosa empaquetada en las columnas Tricorn 5/50 utilizadas en el estudio de cromatografía descrito en la sección anterior.

El experimento se realizó utilizando un sistema de cromatografía ÄKTAexplorer 10. Las dos columnas se anclaron al sistema y se equilibraron con PBS. Para el estudio de capacidad, se cargó en cada columna una muestra que contenía 0,25 mg/ml de PEP08519 en PBS a una velocidad de flujo de 0,2 ml/min (correspondiente a un tiempo de permanencia de 2,4 minutos) hasta que la absorbancia a 280 nm de la solución que emergía de las columnas alcanzó 10% de la absorbancia de la muestra original (es decir, 10% de ruptura). El volumen muerto (es decir, el volumen del tubo y la columna, medido haciendo circular una muestra a través de una columna que no contiene ligando de afinidad) se restó del volumen de la muestra. La proteína unida se hizo eluir con citrato sódico 0,1 M, NaCl al 0,9%, pH 2,3. Las columnas se reequilibraron después con PBS.

Después de las rondas de capacidad, las columnas se sometieron a un tratamiento alcalino aplicando 5 CV de NaOH 0,2 M a una velocidad de flujo de 1 ml/min, seguido de un período de incubación sin flujo. El tiempo de incubación total en álcali fue de 25 min. La neutralización de las columnas se realizó lavando con 5 CV de PBS a 1 ml/min, seguido de una nueva medición de capacidad como se ha descrito anteriormente.

Se llevaron a cabo dos tratamientos alcalinos más seguidos de medidas de capacidad como anteriormente, pero con la concentración de NaOH aumentada a 0,5 M y, en el último tratamiento con álcali, el tiempo de incubación se prolongó hasta 2 h.

Resultados

Análisis de dicroísmo circular: Se determinó que el punto de fusión de His₆-(Z06677)₂-Cys era de 54°C.

Estudio cromatográfico del pH de elución de una variante Z de unión a ABD: Se determinó que el grado de acoplamiento de His₆-(Z06677)₂-Cys a la resina de EAH Sefarosa activada era de 2,8 mg de polipéptido por ml de resina.

Como se muestra en la Figura 6, la elución de la molécula de fusión a ABD PEP08519 a partir de la columna que contenía la resina de His₆-(Z06677)₂-Cys apareció antes en el gradiente (es decir, a un pH más alto) que a partir de la columna con la resina de HSA Sefarosa, que también mostró una capacidad de unión inferior con una fracción más grande que emergía en el flujo continuo.

El pH al pico máximo para el pico eluido desde la columna de His₆-(Z06677)₂-Cys fue de 3,3, mientras que el pH correspondiente para la columna de HSA Sefarosa fue de 2,6.

Estudio cromatográfico de la capacidad de unión y la resistencia al álcali de una variante Z de unión a ABD: La capacidad de unión dinámica se determinó midiendo la cantidad de muestra cargada hasta el 10% de ruptura. Se determinó que la capacidad de unión dinámica de la columna de His₆-(Z06677)₂-Cys era de 3,0 mg de PEP08519 por ml de resina. La capacidad correspondiente para la columna de HSA Sefarosa se determinó a 0,5 mg por ml de resina. Como en el Ejemplo 3, la diferencia de capacidad no se puede explicar por la diferencia en la densidad de ligando, ya que se estimó que el número de moléculas de HSA inmovilizadas era el doble del número de moléculas de His₆-(Z06677)₂-Cys en sus respectivas resinas.

La capacidad de unión dinámica se volvió a medir después de cada incubación con álcali. Los resultados se muestran en la Figura 7. La columna de His₆-(Z06677)₂-Cys mantuvo su capacidad original después de todas las incubaciones. Esto indica una alta resistencia a condiciones alcalinas relativamente duras, que es una característica importante para procedimientos de limpieza in situ (CIP) que permiten el uso repetido de la columna. Por el contrario, la columna de HSA Sefarosa, incluida como referencia, perdía la mayor parte de su capacidad después de 25 min en NaOH 0,2 M.

Ejemplo 5

Estudios de columna de una variante Z de unión a ABD inmovilizada sobre diferentes resinas

En este ejemplo, la variante Z de unión de ABD His₆-(Z06677)₂-Cys se inmovilizó sobre cuatro tipos diferentes de resinas, y la capacidad de unión y la resistencia al álcali se evaluaron cromatográficamente.

Materiales y métodos

5 Acoplamiento de His₆-(Z06677)₂-Cys a diferentes resinas: Se disolvieron 4 mg de His₆-(Z06677)₂-Cys liofilizada (producida como se describe en el Ejemplo 2) en 1 ml de NaHCO₃ 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3. Se inmovilizó una mitad de la muestra sobre 0,67 ml de Sefarosa 4 Fast Flow activado con NHS (GE Healthcare, núm. de catálogo 17-0906) y se inmovilizó la mitad de la muestra sobre 0,67 ml de Sefarosa 4 Fast Flow activado con CNBr (GE Healthcare, núm. de catálogo 17-0981). Ambas reacciones de acoplamiento se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 Se disolvieron 2 mg de His₆-(Z06677)₂-Cys liofilizado en 0,5 ml de Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, DTT 20 mM, pH 8,5 y se incubaron durante 2 h. El DTT se eliminó por cromatografía de exclusión por tamaño y el polipéptido reducido se mezcló con 0,67 ml de Resina de Acoplamiento SulfoLink. La reacción de acoplamiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La cuarta resina evaluada en este experimento fue EAH Sefarosa inmovilizada con His₆-(Z06677)₂-Cys como se describe en el Ejemplo 4.

El grado de acoplamiento para cada resina se determinó como se describe en el Ejemplo 3.

15 Estudio cromatográfico de la capacidad de unión y la resistencia al álcali de cuatro resinas de unión a ABD: Las cuatro resinas acopladas a His₆-(Z06677)₂-Cys se empaquetaron en columnas Tricorn 5/50. Se sometió a ensayo la capacidad de unión dinámica, después de lo cual las resinas se sometieron a NaOH 0,5 M durante 2 h, seguido de un segundo ensayo de capacidad de unión dinámica. Los ensayos de capacidad y las incubaciones alcalinas se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 4.

20 *Resultados*

Acoplamiento de la variante Z de unión a ABD His₆-(Z06677)₂-Cys a diferentes resinas: El grado de inmovilización de His₆-(Z06677)₂-Cys a cada una de las cuatro resinas diferentes evaluadas en este experimento se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Grado de acoplamiento de His₆-(Z06677)₂-Cys a diferentes resinas

Tipo de resina	His ₆ -(Z06677) ₂ -Cys acoplado por ml de resina (mg)
Sefarosa 4 Fast Flow activada con NHS	2,6
Sefarosa 4 Fast Flow activada con CNBr	2,6
Resina de acoplamiento SulfoLink	1,9
Sefarosa activada con EAH	2,8

25 Estudio cromatográfico de la capacidad de unión y la resistencia al álcali de cuatro resinas de unión a ABD: La capacidad de unión dinámica determinada después del acoplamiento de His₆-(Z06677)₂-Cys a cada una de las cuatro resinas se presenta en la Tabla 6.

Tabla 6: Capacidad de unión dinámica de His₆-(Z06677)₂-Cys acoplado a diferentes resinas

Tipo de resina	Capacidad de unión dinámica	
	(mg de muestra/ml de resina)	(moles de muestra/moles de ligando)
Sefarosa 4 Fast Flow activada con NHS	0,9	0,4
Sefarosa 4 Fast Flow activada con CNBr	2,0	0,9
Resina de acoplamiento SulfoLink	2,3	1,4
Sefarosa activada con EAH	3,4	1,4

5 Se determinaron las capacidades de unión dinámica de las dos resinas acopladas con yodoacetilo, Resina de Acoplamiento SulfoLink y Sefarosa activada con EAH, a 2,3 y 3,4 mg de muestra por ml de resina, respectivamente. Sin embargo, al comparar la cantidad molar de muestra que se puede unir por mol de ligando de afinidad, estas resinas muestran la misma capacidad de unión dinámica (1,4 moles de muestra/mol de ligando His₆-(Z06677)₂-Cys). En otras palabras, para His₆-(Z06677)₂-Cys acoplado a la resina SulfoLink, las dos moléculas de Z dentro del dímero se unen a una molécula de muestra cada una en mayor medida en comparación con His₆-(Z06677)₂-Cys acoplado a la resina de EAH Sefarosa.

10 Las capacidades de unión dinámica de las dos resinas acopladas con amina, es decir, Sefarosa activada con NHS y Sefarosa activada con CNBr, fueron inferiores a las de las dos resinas acopladas con yodoacetilo. Esto indica que la inmovilización dirigida al sitio a través de una única cisteína, tal como se utiliza para el acoplamiento a las resinas de yodoacetilo, hace que los sitios de unión de la variante Z de unión a ABD sean más accesibles a las moléculas de muestra en la fase móvil.

15 La capacidad de unión dinámica de la resina de NHS fue inferior a la mitad en comparación con la resina de CNBr, a pesar de que la resina de NHS contiene un brazo espaciador que teóricamente mejoraría la capacidad, haciendo más accesibles los ligandos de afinidad.

20 Las capacidades de unión dinámica de las cuatro resinas diferentes después del tratamiento con álcali con NaOH 0,5 M durante 2 h se presentan en la Tabla 7. Las capacidades de unión dinámica de las resinas acopladas con yodoacetilo no se vieron afectadas por la incubación con álcali, mientras que las capacidades de las resinas acopladas con amina disminuyeron aproximadamente en 10%.

Tabla 7. Comparación de las capacidades de unión dinámica antes y después del tratamiento con álcali.

Tipo de resina	Capacidad de unión dinámica original (moles de muestra/moles ligando de afinidad)	Capacidad de unión dinámica después de la incubación con álcali (moles de muestra/moles de ligando de afinidad)
Sefarosa 4 Fast Flow activada con NHS	0,41	0,38
Sefarosa 4 Fast Flow activada con CNBr	0,92	0,81
Resina de acoplamiento SulfoLink	1,44	1,44
Sefarosa activada con EAH	1,44	1,44

Ejemplo 6

Producción de agarosa anti-ABD

25 Este Ejemplo describe una producción a mayor escala de la variante Z de unión a ABD Z06677 en un formato dimérico y con una Cys C-terminal, es decir, (Z06677)₂-Cys, y su posterior inmovilización sobre una Resina de Acoplamiento SulfoLink.

Materiales y métodos

30 Cultivo y purificación: Se subclonó la variante Z de unión a ABD Z06677 como un dímero en un vector de expresión en el que la expresión está regulada por un promotor de T7. El polipéptido de unión de ABD se expresó con la secuencia de aminoácidos N-terminal adicional GSSLQ y la secuencia de aminoácidos C-terminal adicional VDC. De este modo, el polipéptido expresado tiene la secuencia GSSLQ-[Z06677][Z06677]-VDC. Se transformaron células de *E coli* BL21 (DE3) (Novagen) con el plásmido y se cultivaron a 37°C en 20 l de medio TSB + YE (Caldo de Soja tratado con Trisfina con Extracto de Levadura) con un suplemento de 50 µg/ml de kanamicina. A una DO₆₀₀ = 1, se añadió IPTG, a una concentración final de 0,17 mM, para inducir la expresión de la proteína y el cultivo se incubó a 37°C durante otras 5 h. Las células se cosecharon por centrifugación.

35 Como se observa en el Ejemplo 4 y en el Ejemplo 5, se demostró que His₆-(Z06677)₂-Cys era resistente al álcali.

Esta propiedad se aprovechó en la purificación de (Z06677)₂-Cys, ya que las altas concentraciones de NaOH contribuyen tanto a la desorganización celular como a la purificación, y una gran parte de las proteínas anfitrionas de *E. coli* se desnaturalizan a pH alto, mientras que (Z06677)₂-Cys permanece en solución.

5 Se resuspendieron 165 g de sedimento de células 1,2 l de NaOH 0,5 M mediante el uso de Ultra-Turrax T-50 alcalino (IKA WERKE). La suspensión se incubó durante 1 hora a RT con agitación y después se congeló a -20°C. La muestra congelada se descongeló y se tituló a pH 8,2 mediante la adición de 300 ml de HCl 2 M y la base Tris a una concentración final de 20 mM. Los residuos celulares, la proteína desnaturalizada y el ADN se eliminaron por centrifugación. A la muestra aclarada, se le añadieron 800 ml de [Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, 4,6 g de DTT] y Benzonase® (Merck, núm. de catálogo 10.01654.0001) a una concentración final de 10 U/ml y se continuó la
10 incubación durante 1 h a RT. A continuación, se añadieron 300 g de sulfato de amonio a una concentración 1 M y la muestra se incubó a RT con agitación durante 40 min. La proteína precipitada después de la adición de sulfato de amonio se eliminó por centrifugación, seguido por filtración a través de un filtro de tapa de botella Nalgene (0,45 µm).

Se añadió acetonitrilo (ACN) a la muestra a una concentración de 2% (v/v). La muestra se cargó en una columna FineLine 35 (GE Healthcare) empaquetada con 125 ml de SOURCE 30 RPC (GE Healthcare) mediante el uso de un sistema de cromatografía ÄKTAexplorer 100 (GE Healthcare). La columna se lavó con ACN al 2% en agua Milli-Q que contenía TFA (ácido trifluoroacético) al 0,1% seguido de lavado con un tampón idéntico que contenía 4% de ACN. La proteína unida se hizo eluir aumentando la concentración de ACN de 4% a 25% de ACN sobre 15 CV. Las fracciones eluidas se recogieron y se analizaron mediante SDS-PAGE y LC-MS. Las fracciones relevantes se agruparon y se transfirieron a tampón de acoplamiento (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8,5) mediante
15 cromatografía de exclusión por tamaños utilizando una columna XK-50 (GE Healthcare) empaquetada con 500 ml de Sephadex G-25 (GE Healthcare). La muestra con el tampón intercambiado se analizó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 280 nm, y por medio de SDS-PAGE, cargando varias cantidades diferentes de (Z06677)₂-Cys, y posterior tinción con Azul de Comassie.

Acoplamiento del polipéptido de unión a ABD (Z06677)₂-Cys a la resina: La muestra que contenía (Z06677)₂-Cys a una concentración de 3,4 mg/ml en tampón de acoplamiento se redujo mediante la adición de DTT a una concentración 20 mM, seguido de incubación con agitación durante 1 h a RT. El DTT se eliminó mediante cromatografía de exclusión por tamaños utilizando una columna XK-50 empaquetada con 500 ml de Sephadex G-25, preequilibrada con tampón de acoplamiento. La (Z06677)₂-Cys reducida se mezcló con Resina de Acoplamiento SulfoLink (Thermo Scientific, núm. catálogo 20404) a una razón de 6 mg (Z06677)₂-Cys por ml de resina. La
20 reacción de acoplamiento subsiguiente se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero la incubación de la mezcla de proteína-resina se prolongó de 15 a 35 minutos. La eficacia de acoplamiento se estimó mediante análisis SDS-PAGE de la proteína desacoplada.

Resultados

Cultivo y purificación: La variante Z de unión de ABD dimérica purificada (Z06677)₂-Cys se analizó en un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 280 nm y mediante SDS-PAGE. (Z06677)₂-Cys carece de triptófanos, lo que da como resultado lecturas a baja absorbancia a 280 nm. Por lo tanto, la concentración de la molécula de la variante Z se estimó a partir del análisis de SDS-PAGE, que incluyó varias cantidades diferentes de (Z06677)₂-Cys. La inspección visual del gel de SDS-PAGE estimó la concentración de (Z06677)₂-Cys a 3,4 mg/ml a una pureza de aproximadamente 95%.
35

Acoplamiento del polipéptido de unión a ABD (Z06677)₂-Cys a la resina: Se estimó la densidad del ligando a 5,8 mg (Z06677)₂-Cys/ml de Resina de Acoplamiento SulfoLink inspeccionando visualmente un recorrido de gel de SDS - PAGE sobre la fracción de proteína desacoplada de la reacción de acoplamiento.
40

La resina acoplada a (Z06677)₂-Cys producida se denomina también "agarosa anti-ABD" y en los siguientes Ejemplos se utilizó para demostrar la amplia aplicabilidad de la resina, en términos de unión a diferentes radicales de dominios de unión a albúmina en fusión con diferentes proteínas de tamaño y funciones variables. Se muestra que se consigue una purificación satisfactoria independientemente de dónde se encuentre el radical ABD en la proteína diana. En otras palabras, el radical ABD se puede colocar en el extremo N, en el extremo C o incluso dentro de una proteína de fusión, de modo que esté flanqueado por otros radicales proteínicos a cada lado.
45

Ejemplo 7

50 Purificación de PEP10986 utilizando agarosa anti-ABD

En este ejemplo, se purificó PEP10986 (12,5 kDa), que comprendía un dominio de unión a albúmina (PP013, SEQ ID NO: 160) fusionado en su extremo N a una variante de unión a citoquina de la proteína Z, utilizando una columna empaquetada con agarosa anti-ABD.

Materiales y métodos

55 Se suspendieron células de *E. coli* sedimentadas que contenían PEP10986 soluble en tampón TST (Tris, Solución Salina, Tween: Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, NaCl 200 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 8,0) con un suplemento de 20

U/ml de Benzonase®. Las células se desorganizaron por sonicación y se eliminaron los restos celulares por centrifugación. La cromatografía se realizó utilizando un sistema ÄKTAexplorer 100. La muestra aclarada se aplicó sobre una columna XK-50 empaquetada con 100 ml de agarosa anti-ABD (preparada como se describe en el Ejemplo 6) y preequilibrada con TST. La columna se lavó con 8 CV de TST seguido por 8 CV de NH₄Ac pH 5,5. La proteína unida se hizo eluir aplicando 3 CV de HAc 0,1 M, pH 2,9. Las fracciones de flujo continuo, las fracciones de lavado y las fracciones eluidas se recogieron para análisis adicionales por medio de SDS-PAGE y HPLC-MS.

Para investigar la solidez y la estabilidad frente a los álcalis de la resina de agarosa anti-ABD, se realizaron posteriormente varias purificaciones, cada una seguida por un ciclo de CIP (Limpieza In Situ) de 2-3 volúmenes de columna de NaOH 0,5 M utilizando la misma columna que antes.

10 Resultados

El cromatograma de la purificación de PEP10986 sobre la resina de agarosa anti-ABD se presenta en la Figura 8A y el análisis SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas se muestra en la Figura 8B. Se agruparon las fracciones eluidas E1, E2 y E3, correspondientes a las calles 2, 3 y 4, respectivamente, en la Figura 8B. La masa correcta de PEP10986 se verificó por medio de análisis HPLC-MS y se estimó que la pureza era superior a 95% según se juzgó por análisis de SDS-PAGE. De acuerdo con el análisis espectrofotométrico, la agrupación contenía 908 mg de PEP10986 purificado, lo que corresponde a un rendimiento de aproximadamente 90%.

La robustez y la estabilidad frente a los álcalis de la resina de agarosa anti-ABD se confirmaron mediante purificaciones adicionales tanto de PEP10986 como de otras moléculas de fusión a ABD, seguidas cada una de un ciclo CIP (Limpieza In Situ) de 2-3 volúmenes de columna de NaOH 0,5 M, utilizando la misma columna que en este Ejemplo. Después de 23 ciclos CIP, no se había observado todavía disminución significativa de la capacidad.

Ejemplo 8

Purificación de PEP03973 utilizando agarosa anti-ABD

En este ejemplo, se purificó PEP03973 (12,4 kDa), que comprendía el dominio de unión a la albúmina de tipo salvaje (ABD001, SEQ ID NO: 157) fusionado en su extremo N a una variante de unión a HER2 (Receptor del factor de crecimiento Epidérmico Humano 2) de la proteína Z, utilizando una columna empaquetada con agarosa anti- ABD.

Materiales y métodos

Se suspendieron células de *E. coli* sedimentadas que albergaban PEP03973 soluble en tampón TST con un suplemento de 20 U/ml de Benzonase®. Las células se desorganizaron por sonicación y se eliminaron los restos celulares por centrifugación. La cromatografía se realizó utilizando un sistema ÄKTAexplorer 100. La muestra aclarada se aplicó sobre una columna XK-50 empaquetada con 100 ml de agarosa anti-ABD (preparada como se describe en el Ejemplo 6) y preequilibrada con TST. La columna se lavó con 5 CV de TST seguido de 3 CV de NH₄Ac pH 5,5. La proteína unida se hizo eluir aplicando 3 CV de HAc 0,1 M, pH 2,9. Las fracciones de flujo continuo, las fracciones de lavado y las fracciones eluidas se recogieron para análisis adicionales por medio de SDS-PAGE y HPLC-MS.

35 Resultados

El cromatograma de la purificación de PEP03973 sobre la resina de agarosa anti-ABD se presenta en la Figura 9A y el análisis SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas se muestra en la Figura 9B. Las fracciones eluidas E2, E3 y E4, correspondientes a las calles 5, 6 y 7, respectivamente, en la Figura 9B, se agruparon. La masa correcta de PEP03973 se verificó mediante análisis HPLC-MS y se estimó que la pureza era superior a 95% según se juzgó por análisis de SDS-PAGE. De acuerdo con el análisis espectrofotométrico, la agrupación contenía 1036 mg de PEP03973 purificado, lo que corresponde a un rendimiento de aproximadamente 97%.

Ejemplo 9

Purificación de PEP06548 utilizando agarosa anti-ABD

En este ejemplo, se purificó PEP06548 (20,3 kDa), que comprendía un dominio de unión a albúmina (ABD035, SEQ ID NO: 159, con la prolongación C-terminal VDC) fusionado en su extremo N a dos radicales (es decir, un dímero) de una variante de proteína Z que se une al TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), utilizando una columna empaquetada con agarosa anti-ABD. PEP06548 también comprende una etiqueta de hexahistidina N-terminal y un residuo de cisteína C-terminal.

Materiales y métodos

Se suspendieron células de *E. coli* sedimentadas que albergaban PEP06548 soluble en tampón TST con un suplemento de 27 U/ml de Benzonase®. Las células se desorganizaron por sonicación y se eliminaron los restos celulares por centrifugación. Las cisteínas C-terminales de las moléculas de la muestra de PEP06548 se redujeron por adición de DTT a una concentración final 20 mM, seguido de incubación durante 30 min a RT. La cromatografía

se realizó utilizando un sistema ÄKTAexplorer 100. La muestra aclarada y reducida se aplicó en una columna XK-16 empaquetada con 9 ml de agarosa anti-ABD y preequilibrada con TST. Este lote de agarosa anti-ABD se preparó esencialmente como se describe en el Ejemplo 6, excepto por una densidad de ligando menor de aproximadamente 2,3 mg (Z06677)₂-Cys por ml de resina. La columna se lavó con 5,5 CV de TST seguido por 3,3 CV de NH₄Ac 5 mM, pH 5,5. La proteína unida se hizo eluir aplicando 2,9 CV de HAc 0,1 M, pH 2,9. Las fracciones se recogieron para análisis adicionales por medio de SDS-PAGE y HPLC-MS.

Resultados

El cromatograma de purificación de PEP06548 sobre la resina de agarosa anti-ABD se presenta en la Figura 10A y el análisis SDS-PAGE de la fracción eluida E1 se muestra en la Figura 10B. Se estimó que la pureza era superior a 95% según se juzgó a partir del análisis de SDS-PAGE. Las bandas de aproximadamente 40 kDa se obtuvieron muy probablemente de dímeros formados por reacción entre las cisteínas C-terminales de las moléculas de la muestra. Las masas correctas de PEP06548, así como una porción menor de la variante dimérica, se identificaron también en análisis HPLC-MS.

De acuerdo con las mediciones de absorbancia, se obtuvieron 3,7 mg de PEP06548 purificado por ml de resina, o aproximadamente una molécula de PEP06548 por ligando (Z06677)₂-Cys.

Ejemplo 10

Purificación de PEP17081 utilizando agarosa anti-ABD

En este ejemplo, se purificó PEP17081 (18,6 kDa), que comprendía un dominio de unión a albúmina (PEP07986, SEQ ID NO: 161) fusionado a dos radicales de una variante de unión a citoquina de la proteína Z en el formato Z-PEP07986-Z utilizando una columna empaquetada con agarosa anti-ABD. También se describe la purificación subsiguiente.

Materiales y métodos

Se suspendieron células de *E. coli* sedimentadas que albergaban PEP17081 soluble en tampón TST. Las células se desorganizaron por tratamiento térmico en un baño de agua (83°C, 10 min), seguido de enfriamiento en hielo. Se añadió Benzonase® a una concentración final de 15 U/ml para reducir la viscosidad causada por los ácidos nucleicos. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación y filtración (filtro de 0,45 µm).

Se realizó una primera etapa de purificación mediante cromatografía de afinidad con agarosa anti-ABD utilizando un sistema ÄKTApurifier 100. La muestra aclarada se aplicó sobre una columna XK-26 empaquetada con 25 ml de agarosa anti-ABD y preequilibrada con 2x TST (es decir, tampón TST con todos los componentes a doble concentración). La columna se lavó con 5 CV de 2 x TST seguido por 8 CV de NH₄Ac 5 mM, pH 5,5. La proteína unida se hizo eluir aplicando 3 CV de HAc 0,1 M, pH 2,9. Las fracciones se recogieron para análisis adicionales por medio de SDS-PAGE y HPLC-MS.

Se llevó a cabo una segunda etapa de purificación por medio de RPC, utilizando un sistema ÄKTAexplorer 100. La proteína eluida de la columna de agarosa anti-ABD se complementó con acetonitrilo hasta una concentración final de 10% y se cargó sobre una columna HR-16 (GE Healthcare) empaquetada con 24 ml de SOURCE 15 RPC (GE Healthcare) y preequilibrada con acetonitrilo al 10%, ácido trifluoroacético al 0,1% (TFA) en agua Milli-Q (Disolvente A). La columna se lavó con disolvente 3,9 CV de Disolvente A. El material unido se hizo eluir con un gradiente lineal de 15 CV de concentración creciente de acetonitrilo al 80%, TFA al 0,1% en agua Milli-Q (Disolvente B), terminando con Disolvente B al 50%. Las fracciones se recogieron para análisis adicionales por medio de SDS-PAGE y HPLC-MS.

Se llevó a cabo una tercera etapa de purificación e intercambio de tampón mediante cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) utilizando un sistema ÄKTAexplorer 100. Se agruparon las fracciones seleccionadas eluidas de la columna RPC y se intercambió el tampón a 1x PBS en una columna XK-50 empaquetada con 500 ml de Sephadex G-25 (GE Healthcare). Las fracciones se recogieron para análisis adicionales por medio de SDS-PAGE y HPLC-MS.

Resultados

El cromatograma de la purificación de PEP17081 sobre la resina de agarosa anti-ABD se presenta en la Figura 11A, y el análisis de SDS-PAGE se muestra en la Figura 11B.

Tratamiento térmico de las células de *E. coli* sirvió tanto como una etapa de desorganización de células como de una etapa de purificación. PEP17081 es resistente al calor, mientras que muchas otras proteínas de *E. coli* no lo son y por consiguiente precipitan debido al calentamiento. Como resultado, el material cargado en la columna de agarosa anti-ABD era relativamente puro (calle 1, Figura 11 B).

La gran mayoría de PEP17081 se unió a la resina de agarosa anti-ABD, lo que se demuestra por la aparente ausencia de PEP17081 en la muestra de flujo continuo (calle 2, Figura 11B). De acuerdo con el análisis espectrofotométrico, la agrupación eluida contenía 330 mg de PEP17081, que correspondía a una capacidad de

unión de 13 mg de PEP17081 por ml de resina y un rendimiento que excedía de 95%. Se estimó que la pureza de PEP17081 eluida era superior a 95% según se juzgó a partir del análisis SDS-PAGE (calle 3, Figura 11B). Se obtuvo un aumento adicional en la pureza después de RPC e intercambio del tampón por SEC (calle 4, Figura 11 B). La masa correcta de PEP17081 se verificó mediante análisis HPLC-MS.

5 Ejemplo 11

Purificación de una hormona proteica utilizando agarosa anti-ABD

En este ejemplo, se purificó la Proteína 1 (22,6 kDa, pI 10), que comprendía un dominio de unión a albúmina (ABD035, SEQ ID NO: 159) fusionada en su extremo C a una hormona proteica, en un sistema ÄKTAexplorer utilizando una columna empaquetada con agarosa anti-ABD.

10 *Materiales y métodos*

La proteína 1 se expresó en *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión. Después de la solubilización y replegamiento de los cuerpos de inclusión, el material se sometió tres veces a cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) para el intercambio del tampón y la purificación. Se cargaron 8 mg de la Proteína 1 purificada por SEC, en PBS diluido 1:10 en TST, a 0,5 ml/min en una columna XK 16/20 (GE Healthcare) empaquetada con 10-12 ml de agarosa anti-ABD y preequilibrada con TST. La columna se lavó con 4 CV de TST, seguido de un lavado adicional de 3 CV con NH₄Ac 5 mM, pH 5,5, a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La proteína unida se hizo eluir con 3 CV de HAc 0,1 M, pH 2,9, y luego se neutralizó a pH 7 con Tris-HCl 1 M, pH 9. Las fracciones de flujo continuo, las fracciones de lavado y las fracciones eluidas se recogieron para su análisis posterior por SDS-PAGE. Se hicieron correr geles Bis-Tris NuPAGE (Invitrogen) al 4-12% en forma no reductora y la proteína se tiñó con Simply Blue (Life Technologies). La columna se reequilibró con TST después de la elución y se limpió *in situ* (CIP) con 3 CV de NaOH 0,5 M seguido de 3 CV de TST. Entre purificaciones, la resina se almacenó en TST + etanol del 20%.

Resultados

El cromatograma de la purificación de la Proteína 1 sobre la resina de agarosa anti-ABD se presenta en la Figura 12A y el análisis de SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas se muestra en la Figura 12B. La pureza de la Proteína 1 purificada por SEC cargada sobre la columna de agarosa anti-ABD era alta. Sin embargo, las bandas débiles de proteína contaminante eran visibles en el gel de SDS-PAGE, véanse las flechas en la Figura 12B. Estos contaminantes se eliminaron eficazmente por purificación en la columna de agarosa anti-ABD. Una muestra de la etapa de lavado concentrada 60 veces se analizó en SDS-PAGE y reveló contaminantes (así como fugas de Proteína 1, calle 6, Figura 12B). No se observaron contaminantes en la muestra de proteína eluida (calles 7-9, Figura 12B). Se estimó que la pureza de la muestra eluida era superior al 98% según se juzgó a partir del análisis de SDS-PAGE. La masa correcta de la Proteína 1 eluida se verificó por análisis HPLC-MS.

De los 8 mg iniciales de Proteína 1 purificada por SEC, se recogieron 5,4 mg en las fracciones eluidas de la columna de agarosa anti-ABD, dando como resultado un rendimiento de aproximadamente 68%. Aunque no se detectó ninguna proteína en la muestra de flujo continuo cargada en la calle 5 (Figura 12B), hubo alguna fuga de Proteína 1 tras el lavado con TST así como tras la eliminación de dímeros y proteínas contaminantes.

Ejemplo 12

Purificación de una hormona peptídica utilizando agarosa anti-ABD

En este ejemplo, se expresó la Proteína 2 (9,5 kDa, pI 6,6), que comprendía un dominio de unión a albúmina (ABD035, SEQ ID NO: 159) fusionada en su extremo N a una hormona peptídica, en *Pichia Pink* y se purificó en una sola etapa en un sistema ÄKTAexplorer utilizando una columna empaquetada con agarosa anti-ABD.

Materiales y métodos

Se liofilizaron 100 ml de sobrenadante de *Pichia Pink* que contenía Proteína 2 secretada y se resuspendieron en 2 ml de DMSO (dimetilsulfóxido) y posteriormente se diluyeron con 200 ml de TST. La muestra se cargó a 1 ml/min en una columna XK 16/20 empaquetada con 10-12 ml de agarosa anti-ABD y preequilibrada con TST. La columna se lavó con 8 CV de TST, seguido de un lavado adicional de 3 CV con NH₄Ac 5 mM, pH 5,5. El lavado habitual de 4 CV de TST se incrementó debido a la alta densidad de proteínas contaminantes de los medios. La proteína unida se hizo eluir con 3 CV de HAc 0,1 M, pH 2,9 y a continuación se ajustó a pH 4 con Tris-HCl 1 M, pH 9. La columna se reequilibró con TST después de la elución seguido de CIP y almacenamiento en TST + etanol del 20%. Las fracciones de flujo continuo, las fracciones de lavado y las fracciones eluidas se recogieron para su análisis posterior por SDS-PAGE.

Resultados

El cromatograma de purificación de la Proteína 2 en la resina de agarosa anti-ABD se presenta en la Figura 13A y el análisis SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas se muestra en la Figura 13B. El pico de elución de la columna de agarosa anti-ABD contenía 3-5 mg de Proteína 2, lo que corresponde a un rendimiento de aproximadamente 75%

(estimado a partir de una transferencia de Western). La masa correcta de la Proteína 2 eluida se verificó por medio de análisis HPLC-MS. Se estimó que la pureza era superior a 98% según se juzgó a partir del análisis de SDS-PAGE seguido de tinción con Simply Blue. No se pudo detectar ninguna proteína de medio contaminante en las fracciones de elución (calles 7-13, Figura 13B). Se reconoce que la Proteína 2 corre menos en los geles de SDS-PAGE como indican los patrones de peso molecular incluidos en los geles.

Lista pormenorizada de realizaciones

1. Polipéptido de unión a ABD, que comprende un motivo de unión a ABD BM, cuyo motivo consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

i) EX₂X₃X₄AX₆X₇EIX₁₀X₁₁LPNLX₁₆X₁₇X₁₈QX₂₀X₂₁AFIX₂₅X₂₆LX₂₈D

10 en donde, independientemente entre sí,

X₂ se selecciona entre F, I y L;

X₃ se selecciona entre H, K, N, Q, R, S, T y V;

X₄ se selecciona entre A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y;

X₆ se selecciona entre F, I, L e Y;

15 X₇ se selecciona entre A, H, I, K, L, N, Q, R, S, T y V;

X₁₀ se selecciona entre G, H, K, N, Q, R y S;

X₁₁ se selecciona entre A, D, F, G, I, K, L, N, Q, R, S, T, V e Y;

X₁₆ se selecciona entre N y T;

X₁₇ se selecciona entre F, H, L, S y T;

20 X₁₈ se selecciona entre D, E, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T y V;

X₂₀ se selecciona entre H, K y R;

X₂₁ se selecciona entre I, L y V;

X₂₅ se selecciona entre F, I, L, V e Y;

X₂₆ se selecciona entre K y S;

25 X₂₈ se selecciona entre D y E;

y

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 89% con la secuencia definida en i).

2. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 1, en donde X₂ en la secuencia i) se selecciona entre F y L.

30 3. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 2, en donde X₂ en la secuencia i) es F.

4. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 2, en donde X₂ en la secuencia i) es L.

5. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados precedentes, en donde X₃ en la secuencia i) se selecciona entre H, K, R, T y V.

35 6. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 5, en donde X₃ en la secuencia i) se selecciona entre H, K, R y V.

7. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 6, en donde X₃ en la secuencia i) se selecciona entre K y R.

8. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 7, en donde X₃ en la secuencia i) es K.

9. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 7, en donde X₃ en la secuencia i) es R.

40 10. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados precedentes, en donde X₄ en la secuencia i) se selecciona entre A, H, I, L, N, V y W.

11. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 10, en donde X_4 en la secuencia i) se selecciona entre H, L, N y V.
12. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 11, en donde X_4 en la secuencia i) es V.
- 5 13. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados precedentes, en donde X_6 en la secuencia i) se selecciona entre F y L.
14. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 13, en donde X_6 en la secuencia i) es F.
15. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 13, en donde X_6 en la secuencia i) es L.
16. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados precedentes, en donde X_7 en la secuencia i) se selecciona entre K, L, N, Q, R y S.
- 10 17. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 16, en donde X_7 en la secuencia i) se selecciona entre K, N, Q, R y S.
18. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 17, en donde X_7 en la secuencia i) se selecciona entre K, Q, R y S.
- 15 19. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 18, en donde X_7 en la secuencia i) se selecciona entre K y R.
20. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 19, en donde X_7 en la secuencia i) es K.
21. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 19, en donde X_7 en la secuencia i) es R.
22. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados precedentes, en donde X_{10} en la secuencia i) se selecciona entre H, K, N y R.
- 20 23. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 22, en donde X_{10} en la secuencia i) se selecciona entre H, K y N.
24. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 22, en donde X_{10} en la secuencia i) se selecciona entre K, N y R.
25. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 23 ó 24, en donde X_{10} en la secuencia i) es N.
- 25 26. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 24, en donde X_{10} en la secuencia i) se selecciona entre K y R.
27. Polipéptido de unión a ABD según el apartado 26, en donde X_{10} en la secuencia i) es K.
28. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 26, en donde X_{10} en la secuencia i) es R.
- 30 29. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados precedentes, en donde X_{11} en la secuencia i) se selecciona entre A, F, L, R, T e Y.
30. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 29, en donde X_{11} en la secuencia i) se selecciona entre A, F, T e Y.
31. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 30, en donde X_{11} en la secuencia i) es T.
- 35 32. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los artículos precedentes, en donde X_{16} en la secuencia i) es T.
33. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los artículos precedentes, en donde X_{17} en la secuencia i) se selecciona entre F, H y L.
34. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 33, en donde X_{17} en la secuencia i) se selecciona entre F y H.
- 40 35. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 33, en donde X_{17} en la secuencia i) se selecciona entre H y L.
36. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 34, en donde X_{17} en la secuencia i) es F.
37. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 34 o 35, en donde X_{17} en la secuencia i) es H.
38. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 35, en donde X_{17} en la secuencia i) es L.

39. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados precedentes, en donde X_{18} en la secuencia i) se selecciona entre D, H, I, K y Q.
40. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 39, en donde X_{18} en la secuencia i) se selecciona entre D, H y Q.
- 5 41. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 40, en donde X_{18} en la secuencia i) se selecciona entre H y Q.
42. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 41, en donde X_{18} en la secuencia i) es H.
43. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 41, en donde X_{18} en la secuencia i) es Q.
- 10 44. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados precedentes, en donde X_{20} en la secuencia i) se selecciona entre H y R.
45. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con cualquiera de los apartados 1-43, en donde X_{20} en la secuencia i) se selecciona entre K y R.
46. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 44 o 45, en donde X_{20} en la secuencia i) es R.
47. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 45, en donde X_{20} en la secuencia i) es K.
- 15 48. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados precedentes, en donde X_{21} en la secuencia i) se selecciona entre I y L.
49. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 48, en donde X_{21} en la secuencia i) es I.
50. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 48, en donde X_{21} en la secuencia i) es L.
- 20 51. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con cualquiera de los apartados precedentes, en donde X_{25} en la secuencia i) se selecciona entre I, L y V.
52. Polipéptido de unión a BD de acuerdo con el apartado 51, en donde X_{25} en la secuencia i) se selecciona entre V e I.
53. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 52, en donde X_{25} en la secuencia i) es I.
54. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 52, en donde X_{25} en la secuencia i) es V.
- 25 55. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados precedentes, en donde X_{26} en la secuencia i) es K.
56. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados precedentes, en donde X_{28} en la secuencia i) es D.
- 30 57. Polipéptido de unión a ABD según cualquiera de los puntos precedentes, en donde la secuencia i) satisface al menos cuatro de las ocho condiciones I - VIII:
- I. X_2 es F ó L;
- II. X_6 es F ó L;
- III. X_{16} es T;
- IV. X_{20} es H ó R;
- 35 58. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 57, en donde la secuencia i) satisface al menos cinco de las ocho condiciones I-VIII.
- V. X_{21} es I ó L;
- VI. X_{25} es I ó V;
- VII. X_{26} es K; y
- VIII. X_{28} es D
- 40 59. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 58, en donde la secuencia i) satisface al menos seis de las ocho condiciones I - VIII.

60. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 59, en donde la secuencia i) satisface al menos siete de las ocho condiciones I - VIII.
61. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 60, en donde la secuencia i) satisface las ocho condiciones I - VIII.
- 5 62. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con cualquiera de los apartados precedentes, en donde la secuencia i) se selecciona entre los SEQ ID NO: 1-52.
63. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 62, en donde la secuencia i) se selecciona entre los SEQ ID NO: 1-7.
- 10 64. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 63, en donde la secuencia i) se selecciona entre los SEQ ID NO: 1-4.
65. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 64, en donde la secuencia i) es el SEQ ID NO: 1.
66. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con cualquier apartado anterior, en donde dicho motivo de unión a ABD forma parte de un dominio de proteína del haz de tres hélices.
- 15 67. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 66, en donde dicho motivo de unión a ABD forma esencialmente parte de dos hélices con un bucle de interconexión, dentro de dicho dominio de proteína del haz de tres hélices.
68. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con cualquiera de los apartados 66 - 67, en donde dicho dominio de proteína del haz de tres hélices se selecciona entre los dominios del receptor bacteriano.
- 20 69. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 68, en donde dicho dominio de proteína del haz de tres hélices se selecciona entre los dominios de proteína A de *Staphylococcus aureus* o derivados de los mismos.
70. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con cualquier apartado anterior, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:
- iii) K-[BM]-DPSQS X_aX_bLLX_c EAKKL NDX_dQ;
- en donde
- 25 [BM] es un motivo de unión de ABD como se define en uno cualquiera de los apartados 1-65;
- X_a se selecciona entre A y S;
- X_b se selecciona entre N y E;
- X_c se selecciona entre A, S y C;
- X_d se selecciona entre A y S;
- 30 y
- iv) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 81% con una secuencia definida por iii).
71. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 70, en donde X_a en la secuencia iii) es A.
72. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 70, en donde X_a en la secuencia iii) es S.
- 35 73. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 70 - 72, donde X_b en la secuencia iii) es N.
74. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 70 - 72, donde X_b en la secuencia iii) es E.
- 40 75. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 70 - 74, en donde X_c en la secuencia iii) es A.
76. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 70 - 74, en donde X_c en la secuencia iii) es S.
77. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 70 - 74, en donde X_c en la secuencia iii) es C.

78. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 70 a 77, en donde X_d en la secuencia iii) es A.
79. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 70 a 77, en donde X_d en la secuencia iii) es S.
- 5 80. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 70, en donde, en la secuencia iii), X_a es A; X_b es N; X_c es A y X_d es A.
81. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 70, en donde, en la secuencia iii), X_a es A; X_b es N; X_c es C y X_d es A.
- 10 82. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 70, en donde, en la secuencia iii), X_a es S; X_b es E; X_c es S y X_d es S.
83. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 70, en donde, en la secuencia iii), X_a es S; X_b es E; X_c es C y X_d es S.
84. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 70, en donde, en la secuencia iii), X_a es S; x_b es E; X_c es C y X_d es A.
- 15 85. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 70, en donde, en la secuencia iii), X_a es S; X_b es E; X_c es A y X_d es A.
86. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 85, en donde la secuencia iii) se selecciona entre cualquiera de los SEQ ID NO: 53-104.
- 20 87. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 86, en donde la secuencia iii) se selecciona entre cualquiera de los SEQ ID NO: 53-59.
88. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 87, en donde la secuencia iii) se selecciona entre cualquiera de los SEQ ID NO: 53 - 56.
89. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 88, en donde la secuencia iii) es el SEQ ID NO: 53.
- 25 90. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con cualquiera de los apartados 1-70, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:
- v) YAK-[BM]-DPSQS SELLX_c EAKKL NDSQA P;
- en donde [BM] es un motivo de unión ABD como se define en uno cualquiera de los apartados 1-65 y X_c se selecciona entre S y C; y
- vi) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 83% con una secuencia definida por v).
- 30 91. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1-70, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:
- vii) YAK-[BM]-DPSQS SELLX_c EAKKL NDAQA P;
- en donde [BM] es un motivo de unión ABD como se define en uno cualquiera de los apartados 1-65 y X_c se selecciona entre A y C; y
- 35 viii) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 83% con una secuencia definida por vii).
92. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1-70, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:
- ix) FNK-[BM]-DPSQS ANLLX_c EAKKL NDAQA P;
- 40 en donde [BM] es un motivo de unión ABD como se define en uno cualquiera de los apartados 1-65 y X_c se selecciona entre A y C; y
- x) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 83% con una secuencia definida por ix).
- 45 93. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 69, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

ADNNFNK-[BM]-DPSQSANLLSEAKKLNESQAPK;
 ADNKFNK-[BM]-DPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK;
 ADNKFNK-[BM]-DPSVSKEILAEAKKLNDAQAPK;
 ADAQQNNFNK-[BM]-DPSQSTNVLGEAKKLNESQAPK;
 5 AQHDE-[BM]-DPSQSANVLGEAQLNDSQAPK;
 VDNKFNK-[BM]-DPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK;
 AEAKYAK-[BM]-DPSESSELLSEAKKLNKSQAPK;
 VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK;
 VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDSQAPK;
 10 AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK;
 VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK;
 VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNKAQAPK; y
 AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNKAQAPK;

en donde [BM] es un motivo de unión a ABD como se define en uno cualquiera de los apartados 1-65.

15 94. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con cualquier apartado anterior, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

xi) VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK;

en donde [BM] es un motivo de unión de ABD como se define en uno cualquiera de los apartados 1-65; y

xii) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 84% con la secuencia definida en xi).

20 95. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 94, en el que la secuencia xi) se selecciona entre los SEQ ID NO: 105-156.

96. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 95, en el que la secuencia xi) se selecciona entre los SEQ ID NO: 105-111.

25 97. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 96, en el que la secuencia xi) se selecciona entre los SEQ ID NO: 105-108.

98. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 97, en el que la secuencia xi) es el SEQ ID NO: 105.

99. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados precedentes en forma multimérica, que comprende al menos dos unidades monoméricas de polipéptido de unión de ABD, cuyas secuencias de aminoácidos pueden ser iguales o diferentes.

30 100. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 99, en donde dichas unidades monoméricas de polipéptido de unión de ABD están acopladas covalentemente entre sí.

101. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con el apartado 99, en donde las unidades monoméricas de polipéptido de unión de ABD se expresan como una proteína de fusión.

35 102. Polipéptido de unión a ABD de acuerdo con cualquier elemento precedente que comprende adicionalmente un residuo de cisteína en el extremo C-terminal del polipéptido, por ejemplo en el extremo C-terminal.

103. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los apartados anteriores.

104. Combinación de un polipéptido de unión a ABD de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1-102 y un agente detectable.

40 105. Combinación de acuerdo con el apartado 104, en donde el agente detectable es un agente fluorescente o un agente radiactivo.

Listado de secuencias

<110> AFFIBODY AB

5 <120> NUEVO POLIPÉPTIDO

<130> 21066419

<150> EP12189932.2

10 <151> 25-10-2012

<150> US 61/718,238

<151> 25-10-2012

15 <160> 165

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 1

Glu Leu Lys Val Ala Phe Lys Glu Ile Asn Thr Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

His Gln Gln Arg Ile Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp
 20 25

30 <210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 2

40 Glu Leu Val Asn Ala Phe Ser Glu Ile Lys Ala Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

Leu His Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

<210> 3

<211> 29

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

50 <400> 3

Glu Leu His His Ala Phe Arg Glu Ile Lys Phe Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

Phe His Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

<210> 4
 <211> 29
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 10 <400> 4

 Glu Phe Lys Leu Ala Leu Gln Glu Ile His Tyr Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Leu Asp Gln Arg Leu Ala Phe Ile Leu Lys Leu Asp Asp
 20 25

 15 <210> 5
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 5

 Glu Leu Arg Trp Ala Leu Asn Glu Ile Arg Arg Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Phe Lys Gln His Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

 25 <210> 6
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 6

 35 Glu Phe Arg Ala Ala Leu Leu Glu Ile Lys Leu Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Phe Ile Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

 40 <210> 7
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 45 <400> 7

 Glu Phe Thr Ile Ala Leu Arg Glu Ile His Ala Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Leu His Gln Arg Leu Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp
 20 25

ES 2 639 099 T3

<210> 8
 <211> 29
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 10 <400> 8

 Glu Leu Arg Lys Ala Phe His Glu Ile Gln Ile Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Leu Ser Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

 15 <210> 9
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 9

 Glu Phe Lys Asp Ala Leu Asp Glu Ile Lys Asp Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Ser Met Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

 25 <210> 10
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 10

 35 Glu Leu Thr Thr Ala Phe Ala Glu Ile Gln Lys Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Phe Glu Gln Lys Ile Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp
 20 25

 40 <210> 11
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 45 <400> 11

 Glu Phe Arg Glu Ala Ile Ile Glu Ile Arg Arg Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Leu His Gln Arg Leu Ala Phe Ile Met Lys Leu Asp Asp
 20 25

ES 2 639 099 T3

<210> 12
 <211> 29
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 10 <400> 12

 Glu Ile Lys Thr Ala Phe Ala Glu Ile Arg Val Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Phe Ala Gln Arg Leu Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp
 20 25

 15 <210> 13
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 13

 Glu Arg Arg Tyr Ala Phe Arg Glu Ile Arg Leu Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Phe Ser Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

 25 <210> 14
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 14

 35 Glu Leu Lys Ala Ala Phe Arg Glu Ile Asn Asp Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 His Thr Gln Arg Ile Ala Phe Ile Leu Lys Leu Asp Asp
 20 25

 40 <210> 15
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 45 <400> 15

 Glu Leu Lys Met Ala Phe Gln Glu Ile Arg Tyr Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Arg Leu Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

ES 2 639 099 T3

<210> 16
 <211> 29
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 10 <400> 16

 Glu Trp Lys Lys Ala Leu Arg Glu Ile His Tyr Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Leu Thr Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

 15 <210> 17
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 17

 Glu Phe Glu Lys Ala Leu Val Glu Ile Lys Thr Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Ala Ile Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

 25 <210> 18
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 18

 35 Glu Phe Ile Phe Ala Leu Ser Glu Ile Lys Val Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 His Val Gln Lys Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

 40 <210> 19
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 45 <400> 19

 Glu Phe Lys Tyr Ala Ile Gln Glu Ile Lys Asp Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

ES 2 639 099 T3

<210> 20
 <211> 29
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 10 <400> 20

 Glu Leu Asn Gln Ala Leu Trp Glu Ile Arg Gln Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Phe Asn Gln Arg Val Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

 15 <210> 21
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 21

 Glu Leu Gln Gly Ala Leu Thr Glu Ile Lys Asn Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Gly His Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

 25 <210> 22
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 22

 35 Glu Leu Ala Asp Ala Leu Tyr Glu Ile Lys Asn Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 His Glu Gln His Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

 40 <210> 23
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 45 <400> 23

 Glu Leu Gly Val Ala Leu Lys Glu Ile Gly Gln Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 His Thr Gln Arg Ile Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp
 20 25

<210> 24
 <211> 29
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 10 <400> 24

 Glu Leu Ser Ile Ala Leu Asn Glu Ile Lys Gly Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Ser Leu Gln Lys Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

 15 <210> 25
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 25

 Glu Ile Arg Ser Ala Tyr Lys Glu Ile Asn Val Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Phe Ser Gln Lys Ile Ala Phe Ile Tyr Lys Leu Glu Asp
 20 25

 25 <210> 26
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 26

 35 Glu Leu Ser Ser Ala Leu Leu Glu Ile Ser His Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 His Gln Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

 40 <210> 27
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 45 <400> 27

 Glu Leu Val His Ala Phe Gly Glu Ile Arg Tyr Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 His Ser Gln Arg Ile Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp
 20 25

ES 2 639 099 T3

<210> 28
<211> 29
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

10 <400> 28

Glu Leu His Asn Ala Phe Ser Glu Ile Lys Gln Leu Pro Asn Leu Thr
1 5 10 15

Thr Gln Gln Arg Ile Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp
20 25

<210> 29
15 <211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 29

Glu Gly Val Asn Ala Phe Asn Glu Ile Lys Gly Leu Pro Asn Leu Thr
1 5 10 15

Phe His Gln Lys Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
20 25

25 <210> 30
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 30

35 <210> 31
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 31

Glu Leu Arg Trp Ala Val Ser Glu Ile Arg His Leu Pro Asn Leu Thr
1 5 10 15

Phe His Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
20 25

<210> 32
 <211> 29
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 10 <400> 32

 Glu Leu Gln Arg Ala Phe Ala Glu Ile Gln Ser Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Leu Asn Gln His Ile Ala Phe Ile Tyr Lys Leu Glu Asp
 20 25

 15 <210> 33
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 33

 Glu Leu Lys Ala Ala Phe Arg Glu Ile Arg Thr Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Phe Gly Gln Arg Thr Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

 25 <210> 34
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 34

 35 Glu Leu Thr Thr Ala Met Lys Glu Ile Gln Ala Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 His Gln Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

 40 <210> 35
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 45 <400> 35

 Glu Asp Met Arg Ala Phe His Glu Ile Asn Lys Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Leu Ala Gln Arg Val Ala Phe Ile Tyr Lys Leu Glu Asp
 20 25

ES 2 639 099 T3

<210> 36
<211> 29
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

10 <400> 36

Glu Leu Asn Ala Ala Phe Thr Glu Ile Ser Ser Leu Pro Asn Leu Thr
1 5 10 15

Leu Asp Gln Arg Leu Ala Phe Ile Phe Lys Leu Asp Asp
20 25

15 <210> 37
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 37

Glu Leu Arg Trp Ala Leu Asn Glu Ile His Ile Leu Pro Asn Leu Thr
1 5 10 15

Leu Glu Gln Lys Val Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
20 25

25 <210> 38
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 38

35 <210> 39
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 39

Glu Leu Ser Leu Ala Phe Val Glu Ile His Lys Leu Pro Asn Leu Thr
1 5 10 15

His His Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
20 25

<210> 40
 <211> 29
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 10 <400> 40

 Glu Leu Gln Trp Ala Phe Asn Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Tyr Val Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

 15 <210> 41
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 41

 Glu Glu Gln Thr Ala Met Gln Glu Ile Asn Ser Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Leu Glu Gln Arg Ile Ala Phe Ile Phe Lys Leu Glu Asp
 20 25

 25 <210> 42
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 42

 35 Glu Leu Gly Trp Ala Phe Arg Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 His Tyr Gln Arg Ile Ala Phe Ile Met Lys Leu Asp Asp
 20 25

 40 <210> 43
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 45 <400> 43

 Glu Asn Leu Trp Ala Phe Asn Glu Ile Lys Gly Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 His Asp Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

<210> 44
 <211> 29
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 10 <400> 44

 Glu Leu Ser Phe Ala Phe Ser Glu Ile Asn Val Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Phe His Gln Lys Ile Ala Phe Ile Tyr Lys Leu Glu Asp
 20 25

 15 <210> 45
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 45

 Glu Phe Arg Gly Ala Ile Ala Glu Ile Arg Asp Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Leu Glu Gln Lys Tyr Ala Phe Ile Phe Lys Leu Glu Asp
 20 25

 25 <210> 46
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 46

 35 Glu Glu Glu Asn Ala Tyr Lys Glu Ile Gly Ser Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Leu Ala Gln Lys Val Ala Phe Ile Leu Lys Leu Glu Asp
 20 25

 40 <210> 47
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 45 <400> 47

 Glu Leu Arg Gln Ala Leu Gln Glu Ile His Ile Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 His Ser Gln Arg Val Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

ES 2 639 099 T3

<210> 48
 <211> 29
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 10 <400> 48

 Glu Asn His Ala Ala Phe Gln Glu Ile Leu Ser Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Leu Asn Gln Arg Leu Ala Phe Ile Thr Lys Leu Asp Asp
 20 25

 15 <210> 49
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 49

 Glu Thr Asn Tyr Ala Phe Lys Glu Ile Asp Leu Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Leu Met Gln Lys Leu Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp
 20 25

 25 <210> 50
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 50

 35 Glu Ile Ser Leu Ala Phe Lys Glu Ile Lys Ala Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Gly Gln Gln Arg Phe Ala Phe Ile Leu Lys Leu Asp Asp
 20 25

 40 <210> 51
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 45 <400> 51

 Glu Leu Ser Lys Ala Leu Thr Glu Ile Arg Met Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Phe Arg Gln Arg Ile Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp
 20 25

ES 2 639 099 T3

<210> 52
 <211> 29
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 10 <400> 52

 Glu Leu Asp Met Ala Tyr Thr Glu Ile Gly Leu Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

 Phe Ser Gln Leu Leu Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp
 20 25

 15 <210> 53
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 53

 Lys Glu Leu Lys Val Ala Phe Lys Glu Ile Asn Thr Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15

 Thr His Gln Gln Arg Ile Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30

 Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

 25 Gln
 <210> 54
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 54

 35 Lys Glu Leu Val Asn Ala Phe Ser Glu Ile Lys Ala Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15

 Thr Leu His Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30

 Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

 Gln
 <210> 55
 <211> 49
 40 <212> PRT

ES 2 639 099 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

5

<400> 55

Lys Glu Leu His His Ala Phe Arg Glu Ile Lys Phe Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Phe His Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

10

<210> 56

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 56

Lys Glu Phe Lys Leu Ala Leu Gln Glu Ile His Tyr Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Leu Asp Gln Arg Leu Ala Phe Ile Leu Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

20

Gln

<210> 57

<211> 49

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

30

<400> 57

Lys Glu Leu Arg Trp Ala Leu Asn Glu Ile Arg Arg Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Phe Lys Gln His Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

35

Gln

<210> 58

ES 2 639 099 T3

<211> 49
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 58

Lys Glu Phe Arg Ala Ala Leu Leu Glu Ile Lys Leu Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Phe Ile Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

10 Gln

<210> 59
<211> 49
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

20 <400> 59

Lys Glu Phe Thr Ile Ala Leu Arg Glu Ile His Ala Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Leu His Gln Arg Leu Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

25 <210> 60
<211> 49
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 60

ES 2 639 099 T3

Lys Glu Leu Arg Lys Ala Phe His Glu Ile Gln Ile Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

5 <210> 61
<211> 49
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética
<400> 61

Lys Glu Phe Lys Asp Ala Leu Asp Glu Ile Lys Asp Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Ser Met Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

15 <210> 62
<211> 49
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética
<400> 62

Lys Glu Leu Thr Thr Ala Phe Ala Glu Ile Gln Lys Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Phe Glu Gln Lys Ile Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

25 Gln

30 <210> 63
<211> 49
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

ES 2 639 099 T3

<400> 63

Lys Glu Phe Arg Glu Ala Ile Ile Glu Ile Arg Arg Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Leu His Gln Arg Leu Ala Phe Ile Met Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

5

<210> 64

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 64

15

Lys Glu Ile Lys Thr Ala Phe Ala Glu Ile Arg Val Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Phe Ala Gln Arg Leu Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

<210> 65

20

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 65

Lys Glu Arg Arg Tyr Ala Phe Arg Glu Ile Arg Leu Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Phe Ser Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

30

<210> 66

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

ES 2 639 099 T3

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 66

5

Lys Glu Leu Lys Ala Ala Phe Arg Glu Ile Asn Asp Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr His Thr Gln Arg Ile Ala Phe Ile Leu Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

<210> 67

<211> 49

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

15

<400> 67

Lys Glu Leu Lys Met Ala Phe Gln Glu Ile Arg Tyr Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Arg Leu Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

20

<210> 68

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 68

Lys Glu Trp Lys Lys Ala Leu Arg Glu Ile His Tyr Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Leu Thr Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

30

Gln

<210> 69

<211> 49

ES 2 639 099 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 69

Lys Glu Phe Glu Lys Ala Leu Val Glu Ile Lys Thr Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

10 Thr Ala Ile Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

15 <210> 70
<211> 49
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 70

Lys Glu Phe Ile Phe Ala Leu Ser Glu Ile Lys Val Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr His Val Gln Lys Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

25 <210> 71
<211> 49
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 71

Lys Glu Phe Lys Tyr Ala Ile Gln Glu Ile Lys Asp Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

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

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

35 Gln

ES 2 639 099 T3

<210> 72
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética
 <400> 72
 10
 Lys Glu Leu Asn Gln Ala Leu Trp Glu Ile Arg Gln Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15
 Thr Phe Asn Gln Arg Val Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30
 Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45
 Gln
 <210> 73
 <211> 49
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética
 20 <400> 73
 Lys Glu Leu Gln Gly Ala Leu Thr Glu Ile Lys Asn Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15
 Thr Gly His Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30
 Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45
 Gln
 25 <210> 74
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética
 <400> 74
 35 Lys Glu Leu Ala Asp Ala Leu Tyr Glu Ile Lys Asn Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15

ES 2 639 099 T3

Thr His Glu Gln His Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

Gln

<210> 75

<211> 49

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 75

Lys Glu Leu Gly Val Ala Leu Lys Glu Ile Gly Gln Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15

Thr His Thr Gln Arg Ile Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

Gln

15 <210> 76

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 76

Lys Glu Leu Ser Ile Ala Leu Asn Glu Ile Lys Gly Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15

Thr Ser Leu Gln Lys Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

25 Gln

<210> 77

<211> 49

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

35 <400> 77

ES 2 639 099 T3

Lys Glu Ile Arg Ser Ala Tyr Lys Glu Ile Asn Val Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Phe Ser Gln Lys Ile Ala Phe Ile Tyr Lys Leu Glu Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

<210> 78

<211> 49

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 78

Lys Glu Leu Ser Ser Ala Leu Leu Glu Ile Ser His Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr His Gln Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

15 <210> 79

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 79

Lys Glu Leu Val His Ala Phe Gly Glu Ile Arg Tyr Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr His Ser Gln Arg Ile Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

25 Gln

<210> 80

<211> 49

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

ES 2 639 099 T3

<400> 80

Lys Glu Leu His Asn Ala Phe Ser Glu Ile Lys Gln Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Thr Gln Gln Arg Ile Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

5

<210> 81

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 81

15

Lys Glu Gly Val Asn Ala Phe Asn Glu Ile Lys Gly Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Phe His Gln Lys Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

20

<210> 82

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 82

Lys Glu Leu Lys Tyr Ala Leu Met Glu Ile Arg Tyr Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr His Arg Gln Lys Ile Ala Phe Ile Leu Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

30

<210> 83

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 639 099 T3

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

5 <400> 83

Lys Glu Leu Arg Trp Ala Val Ser Glu Ile Arg His Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Phe His Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

10 <210> 84

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 84

Lys Glu Leu Gln Arg Ala Phe Ala Glu Ile Gln Ser Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Leu Asn Gln His Ile Ala Phe Ile Tyr Lys Leu Glu Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

20 <210> 85

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 85

30 <210> 86

Lys Glu Leu Lys Ala Ala Phe Arg Glu Ile Arg Thr Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Phe Gly Gln Arg Thr Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

<210> 86

ES 2 639 099 T3

<211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 86

Lys Glu Leu Thr Thr Ala Met Lys Glu Ile Gln Ala Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15

10 Thr His Gln Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

Gln

15 <210> 87
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 87

Lys Glu Asp Met Arg Ala Phe His Glu Ile Asn Lys Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15

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

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

Gln

25 <210> 88
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 88

35

ES 2 639 099 T3

Lys Glu Leu Asn Ala Ala Phe Thr Glu Ile Ser Ser Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15

Thr Leu Asp Gln Arg Leu Ala Phe Ile Phe Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

Gln

5 <210> 89
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética
 <400> 89

Lys Glu Leu Arg Trp Ala Leu Asn Glu Ile His Ile Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15

Thr Leu Glu Gln Lys Val Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

Gln

15 <210> 90
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética
 <400> 90

Lys Glu Leu Lys Asn Ala Phe Ile Glu Ile Lys Asn Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15

Thr Thr Asn Gln Thr Leu Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

25 Gln

30 <210> 91
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

ES 2 639 099 T3

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

5 <400> 94

Lys Glu Leu Gly Trp Ala Phe Arg Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr His Tyr Gln Arg Ile Ala Phe Ile Met Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

10 <210> 95

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 95

Lys Glu Asn Leu Trp Ala Phe Asn Glu Ile Lys Gly Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr His Asp Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

20

<210> 96

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 96

30

Lys Glu Leu Ser Phe Ala Phe Ser Glu Ile Asn Val Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Phe His Gln Lys Ile Ala Phe Ile Tyr Lys Leu Glu Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

<210> 97

ES 2 639 099 T3

<211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 97

Lys Glu Phe Arg Gly Ala Ile Ala Glu Ile Arg Asp Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15

Thr Leu Glu Gln Lys Tyr Ala Phe Ile Phe Lys Leu Glu Asp Asp Pro
 20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

10 Gln

<210> 98
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

20 <400> 98

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

Thr Leu Ala Gln Lys Val Ala Phe Ile Leu Lys Leu Glu Asp Asp Pro
 20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

25 Gln

<210> 99
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

35 <400> 99

Lys Glu Leu Arg Gln Ala Leu Gln Glu Ile His Ile Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15

Thr His Ser Gln Arg Val Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

Gln

ES 2 639 099 T3

<210> 100
<211> 49
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

10 <400> 100

Lys Glu Asn His Ala Ala Phe Gln Glu Ile Leu Ser Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Leu Asn Gln Arg Leu Ala Phe Ile Thr Lys Leu Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

15 <210> 101
<211> 49
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 101

Lys Glu Thr Asn Tyr Ala Phe Lys Glu Ile Asp Leu Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Leu Met Gln Lys Leu Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

25 <210> 102
<211> 49
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

35 <400> 102

ES 2 639 099 T3

Lys Glu Ile Ser Leu Ala Phe Lys Glu Ile Lys Ala Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Gly Gln Gln Arg Phe Ala Phe Ile Leu Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

<210> 103

<211> 49

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

10

<400> 103

Lys Glu Leu Ser Lys Ala Leu Thr Glu Ile Arg Met Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Phe Arg Gln Arg Ile Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

15 Gln

<210> 104

<211> 49

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

25 <400> 104

Lys Glu Leu Asp Met Ala Tyr Thr Glu Ile Gly Leu Leu Pro Asn Leu
1 5 10 15

Thr Phe Ser Gln Leu Leu Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp Asp Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
35 40 45

Gln

<210> 105

30 <211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

ES 2 639 099 T3

<400> 105

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Lys Val Ala Phe Lys Glu Ile
1 5 10 15

Asn Thr Leu Pro Asn Leu Thr His Gln Gln Arg Ile Ala Phe Ile Ile
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

- 5 <210> 106
- <211> 58
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 106

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Val Asn Ala Phe Ser Glu Ile
1 5 10 15

Lys Ala Leu Pro Asn Leu Thr Leu His Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

- 15 <210> 107
- <211> 58
- <212> PRT
- 20 <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

25 <400> 107

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu His His Ala Phe Arg Glu Ile
1 5 10 15

Lys Phe Leu Pro Asn Leu Thr Phe His Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

- 30 <210> 108
- <211> 58

ES 2 639 099 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 108

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Phe Lys Leu Ala Leu Gln Glu Ile
 1 5 10 15

His Tyr Leu Pro Asn Leu Thr Leu Asp Gln Arg Leu Ala Phe Ile Leu
 20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

10

<210> 109
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 109

20

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

Arg Arg Leu Pro Asn Leu Thr Phe Lys Gln His Ile Ala Phe Ile Val
 20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

25

<210> 110
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 110

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Phe Arg Ala Ala Leu Leu Glu Ile
 1 5 10 15

Lys Leu Leu Pro Asn Leu Thr Phe Ile Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val
 20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

ES 2 639 099 T3

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 111
 <211> 58
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

10 <400> 111

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Phe Thr Ile Ala Leu Arg Glu Ile
 1 5 10 15

His Ala Leu Pro Asn Leu Thr Leu His Gln Arg Leu Ala Phe Ile Ile
 20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

15 <210> 112
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 112

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Arg Lys Ala Phe His Glu Ile
 1 5 10 15

Gln Ile Leu Pro Asn Leu Thr Leu Ser Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val
 20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

25 <210> 113
 <211> 58
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

35 <400> 113

ES 2 639 099 T3

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Phe Lys Asp Ala Leu Asp Glu Ile
1 5 10 15

Lys Asp Leu Pro Asn Leu Thr Ser Met Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

5 <210> 114
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética
<400> 114

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Thr Thr Ala Phe Ala Glu Ile
1 5 10 15

Gln Lys Leu Pro Asn Leu Thr Phe Glu Gln Lys Ile Ala Phe Ile Ile
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

15 <210> 115
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética
<400> 115

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Phe Arg Glu Ala Ile Ile Glu Ile
1 5 10 15

25 Arg Arg Leu Pro Asn Leu Thr Leu His Gln Arg Leu Ala Phe Ile Met
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

30 <210> 116
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 639 099 T3

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 116

5

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Ile Lys Thr Ala Phe Ala Glu Ile
1 5 10 15

Arg Val Leu Pro Asn Leu Thr Phe Ala Gln Arg Leu Ala Phe Ile Ile
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 117

<211> 58

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

15

<400> 117

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Arg Arg Tyr Ala Phe Arg Glu Ile
1 5 10 15

Arg Leu Leu Pro Asn Leu Thr Phe Ser Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

20

<210> 118

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 118

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Lys Ala Ala Phe Arg Glu Ile
1 5 10 15

Asn Asp Leu Pro Asn Leu Thr His Thr Gln Arg Ile Ala Phe Ile Leu
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

30

ES 2 639 099 T3

<210> 119
 <211> 58
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 10 <400> 119

 Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Lys Met Ala Phe Gln Glu Ile
 1 5 10 15

 Arg Tyr Leu Pro Asn Leu Thr Arg Leu Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val
 20 25 30

 Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

 15 <210> 120
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 120

 Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Trp Lys Lys Ala Leu Arg Glu Ile
 1 5 10 15

 25 His Tyr Leu Pro Asn Leu Thr Leu Thr Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val
 20 25 30

 Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

 30 <210> 121
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 35 <400> 121

ES 2 639 099 T3

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Phe Glu Lys Ala Leu Val Glu Ile
1 5 10 15

Lys Thr Leu Pro Asn Leu Thr Ala Ile Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 122
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 122

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Phe Ile Phe Ala Leu Ser Glu Ile
1 5 10 15

Lys Val Leu Pro Asn Leu Thr His Val Gln Lys Ile Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 123
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 123

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Phe Lys Tyr Ala Ile Gln Glu Ile
1 5 10 15

Lys Asp Leu Pro Asn Leu Thr Ser Gly Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 124
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 639 099 T3

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

5 <400> 124

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Asn Gln Ala Leu Trp Glu Ile
1 5 10 15

Arg Gln Leu Pro Asn Leu Thr Phe Asn Gln Arg Val Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

10 <210> 125

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 125

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Gln Gly Ala Leu Thr Glu Ile
1 5 10 15

Lys Asn Leu Pro Asn Leu Thr Gly His Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

20

<210> 126

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 126

30

ES 2 639 099 T3

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Ala Asp Ala Leu Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Lys Asn Leu Pro Asn Leu Thr His Glu Gln His Ile Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 127
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética
<400> 127

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

Gly Gln Leu Pro Asn Leu Thr His Thr Gln Arg Ile Ala Phe Ile Ile
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 128
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética
<400> 128

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

Lys Gly Leu Pro Asn Leu Thr Ser Leu Gln Lys Ile Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 129
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 639 099 T3

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 129

5

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Ile Arg Ser Ala Tyr Lys Glu Ile
1 5 10 15

Asn Val Leu Pro Asn Leu Thr Phe Ser Gln Lys Ile Ala Phe Ile Tyr
20 25 30

Lys Leu Glu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 130

<211> 58

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

15

<400> 130

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Ser Ser Ala Leu Leu Glu Ile
1 5 10 15

Ser His Leu Pro Asn Leu Thr His Gln Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

20

<210> 131

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 131

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Val His Ala Phe Gly Glu Ile
1 5 10 15

Arg Tyr Leu Pro Asn Leu Thr His Ser Gln Arg Ile Ala Phe Ile Ile
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

30

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

ES 2 639 099 T3

<210> 132
 <211> 58
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 10 <400> 132

 Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu His Asn Ala Phe Ser Glu Ile
 1 5 10 15

 Lys Gln Leu Pro Asn Leu Thr Thr Gln Gln Arg Ile Ala Phe Ile Ile
 20 25 30

 Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55
 15
 <210> 133
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

 <400> 133
 25
 Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Gly Val Asn Ala Phe Asn Glu Ile
 1 5 10 15

 Lys Gly Leu Pro Asn Leu Thr Phe His Gln Lys Ile Ala Phe Ile Val
 20 25 30

 Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55
 30
 <210> 134
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética
 35
 <400> 134

ES 2 639 099 T3

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Lys Tyr Ala Leu Met Glu Ile
1 5 10 15

Arg Tyr Leu Pro Asn Leu Thr His Arg Gln Lys Ile Ala Phe Ile Leu
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 135
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 135

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Arg Trp Ala Val Ser Glu Ile
1 5 10 15

Arg His Leu Pro Asn Leu Thr Phe His Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 136
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 136

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Gln Arg Ala Phe Ala Glu Ile
1 5 10 15

Gln Ser Leu Pro Asn Leu Thr Leu Asn Gln His Ile Ala Phe Ile Tyr
20 25 30

Lys Leu Glu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 137
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 639 099 T3

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

5 <400> 137

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Lys Ala Ala Phe Arg Glu Ile
1 5 10 15

Arg Thr Leu Pro Asn Leu Thr Phe Gly Gln Arg Thr Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

10

<210> 138

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 138

20

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Thr Thr Ala Met Lys Glu Ile
1 5 10 15

Gln Ala Leu Pro Asn Leu Thr His Gln Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

25

<210> 139

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

30

<400> 139

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Asp Met Arg Ala Phe His Glu Ile
1 5 10 15

Asn Lys Leu Pro Asn Leu Thr Leu Ala Gln Arg Val Ala Phe Ile Tyr
20 25 30

Lys Leu Glu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

ES 2 639 099 T3

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Lys Asn Ala Phe Ile Glu Ile
1 5 10 15

Lys Asn Leu Pro Asn Leu Thr Thr Asn Gln Thr Leu Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 143
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 143

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Ser Leu Ala Phe Val Glu Ile
1 5 10 15

His Lys Leu Pro Asn Leu Thr His His Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 144
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 144

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Gln Trp Ala Phe Asn Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Thr Tyr Val Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 145
<211> 58
<212> PRT

ES 2 639 099 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

5

<400> 145

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Glu Gln Thr Ala Met Gln Glu Ile
1 5 10 15

Asn Ser Leu Pro Asn Leu Thr Leu Glu Gln Arg Ile Ala Phe Ile Phe
20 25 30

Lys Leu Glu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

10 <210> 146

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 146

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Gly Trp Ala Phe Arg Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Thr His Tyr Gln Arg Ile Ala Phe Ile Met
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

20 <210> 147

<211> 58

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

30 <400> 147

ES 2 639 099 T3

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Asn Leu Trp Ala Phe Asn Glu Ile
1 5 10 15

Lys Gly Leu Pro Asn Leu Thr His Asp Gln Arg Ile Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 148
<211> 58
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 148

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Ser Phe Ala Phe Ser Glu Ile
1 5 10 15

Asn Val Leu Pro Asn Leu Thr Phe His Gln Lys Ile Ala Phe Ile Tyr
20 25 30

Lys Leu Glu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

15 <210> 149
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 149

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Phe Arg Gly Ala Ile Ala Glu Ile
1 5 10 15

25 Arg Asp Leu Pro Asn Leu Thr Leu Glu Gln Lys Tyr Ala Phe Ile Phe
20 25 30

Lys Leu Glu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

30 <210> 150
<211> 58
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

5

<400> 150

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Glu Glu Asn Ala Tyr Lys Glu Ile
1 5 10 15

Gly Ser Leu Pro Asn Leu Thr Leu Ala Gln Lys Val Ala Phe Ile Leu
20 25 30

Lys Leu Glu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 151

10 <211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 151

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Arg Gln Ala Leu Gln Glu Ile
1 5 10 15

His Ile Leu Pro Asn Leu Thr His Ser Gln Arg Val Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

20

<210> 152

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 152

30

ES 2 639 099 T3

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Asn His Ala Ala Phe Gln Glu Ile
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Asn Leu Thr Leu Asn Gln Arg Leu Ala Phe Ile Thr
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 153
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 153

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Thr Asn Tyr Ala Phe Lys Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Leu Pro Asn Leu Thr Leu Met Gln Lys Leu Ala Phe Ile Val
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 154
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 154

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Ile Ser Leu Ala Phe Lys Glu Ile
1 5 10 15

Lys Ala Leu Pro Asn Leu Thr Gly Gln Gln Arg Phe Ala Phe Ile Leu
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 155
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

5 <400> 155

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Ser Lys Ala Leu Thr Glu Ile
1 5 10 15

Arg Met Leu Pro Asn Leu Thr Phe Arg Gln Arg Ile Ala Phe Ile Ile
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 156

10 <211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Polipéptido de unión a ABD modificado con ingeniería genética

<400> 156

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Asp Met Ala Tyr Thr Glu Ile
1 5 10 15

Gly Leu Leu Pro Asn Leu Thr Phe Ser Gln Leu Leu Ala Phe Ile Ile
20 25 30

Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

20

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 157

25 <211> 46

<212> PRT

<213> Streptococcus sp. G148

<400> 157

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

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

30

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

<210> 158

<211> 47

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 639 099 T3

<223> Dominio de unión a albúmina modificado con ingeniería genética

<400> 158

Cys 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

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

<210> 159

<211> 46

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio de unión a albúmina modificado con ingeniería genética

15 <400> 159

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

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

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

<210> 160

<211> 46

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio de unión a albúmina modificado con ingeniería genética

<400> 160

30 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
35 40 45

<210> 161

<211> 48

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio de unión a albúmina modificado con ingeniería genética

40 <400> 161

ES 2 639 099 T3

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

5 <210> 162
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Dominio de unión a albúmina modificado con ingeniería genética
 <400> 162

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

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

20 <210> 163
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

25 <400> 163
 tgcttccggc tcgtatgtg tgtg 24

30 <210> 164
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 164

40 cgaaccaga gccaccaccg g 21

<210> 165
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador sintético

50 <400> 165
 cgaaccaga gccaccaccg g 21

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de unión al Dominio de Unión a Albúmina, que comprende un motivo de unión al Dominio de Unión a Albúmina BM, cuyo motivo consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

i) EX₂X₃X₄AX₆X₇EIX₁₀X₁₁LPNLX₁₆X₁₇X₁₈QX₂₀X₂₁AFIX₂₅X₂₆LX₂₈D

5 en donde, independientemente entre sí,

X₂ se selecciona entre F, I y L;

X₃ se selecciona entre H, K, N, Q, R, S, T y V;

X₄ se selecciona entre A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y;

X₆ se selecciona entre F, I, L e Y;

10 X₇ se selecciona entre A, H, I, K, L, N, Q, R, S, T y V;

X₁₀ se selecciona entre G, H, K, N, Q, R y S;

X₁₁ se selecciona entre A, D, F, G, I, K, L, N, Q, R, S, T, V e Y;

X₁₆ se selecciona entre N y T;

X₁₇ se selecciona entre F, H, L, S y T;

15 X₁₈ se selecciona entre D, E, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T y V;

X₂₀ se selecciona entre H, K y R;

X₂₁ se selecciona entre I, L y V;

X₂₅ se selecciona entre F, I, L, V e Y;

X₂₆ se selecciona entre K y S;

20 X₂₈ se selecciona entre D y E;

y

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 89% con la secuencia definida en i),

uniéndose el polipéptido a un Dominio de Unión a Albúmina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre los SEQ ID NO: 161 y 162.

25 2. Polipéptido de unión al Dominio de Unión a Albúmina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia i) satisface al menos cuatro de las ocho condiciones I-VIII:

I. X₂ es F ó L;

II. X₆ es F ó L;

III. X₁₆ es T;

30 IV. X₂₀ es H ó R;

V. X₂₁ es I ó L;

VI. X₂₅ es I ó V;

VII. X₂₆ es K; y

VIII. X₂₈ es d

35 3. Polipéptido de unión al Dominio de Unión a Albúmina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la secuencia i) se selecciona entre los SEQ ID NO: 1-52.

4. Polipéptido de unión al Dominio de Unión a Albúmina de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la secuencia i) se selecciona entre los SEQ ID NO: 1-7.

5. Polipéptido de unión al Dominio de Unión a Albúmina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones

precedentes, en donde dicho motivo de unión al Dominio de Unión a Albúmina forma parte de un dominio de proteína de haz de tres hélices.

5 6. Polipéptido de unión al Dominio de Unión a Albúmina de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho dominio de la proteína de haz de tres hélices se selecciona entre los dominios de proteína A de *Staphylococcus aureus* o derivados de los mismos.

7. Polipéptido de unión al Dominio de Unión a Albúmina de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

iii) K-[BM]-DPSQSX_aX_bLLX_c EAKKL NDX_dQ;

en donde

10 [BM] es un motivo de unión al Dominio de Unión a Albúmina como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4;

X_a se selecciona entre A y S;

X_b se selecciona entre N y E;

X_c se selecciona entre A, S y C;

15 X_d se selecciona entre A y S;

y

iv) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 81% con una secuencia definida por iii).

8. Polipéptido de unión al Dominio de Unión a Albúmina de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la secuencia iii) se selecciona entre uno cualquiera de los SEQ ID NO: 53-104.

20 9. Polipéptido de unión al Dominio de Unión a Albúmina de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la secuencia iii) se selecciona entre uno cualquiera de los SEQ ID NO: 53-59.

10. Polipéptido de unión al Dominio de Unión a Albúmina de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

ADNNFNK-[BM]-DPSQSANLLSEAKKLNESQAPK;

25

ADNKFNK-[BM]-DPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK;

ADNKFNK-[BM]-DPSVSKEILAEAKKLNDAQAPK;

30

ADAQQNNFNK-[BM]-DPSQSTNVLGEAKKLNESQAPK;

AQHDE-[BM]-DPSQSANVLGEAQLNDSQAPK;

VDNKFNK-[BM]-DPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK;

35

AEAKYAK-[BM]-DPSESSELLSEAKKLNKSQAPK;

VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK;

40

VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDSQAPK;

AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK;

VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK;

5

VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNKAQAPK; y

AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNKAQAPK;

10 en donde [BM] es un motivo de unión al Dominio de Unión a Albúmina como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

11. Polipéptido de unión al Dominio de Unión a Albúmina de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

xi) VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK;

15 en donde [BM] es un motivo de unión al Dominio de Unión a Albúmina como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4; y

xii) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 84% con la secuencia definida en ix).

12. Polipéptido de unión al Dominio de Unión a Albúmina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia xi) se selecciona entre los SEQ ID NO: 105-156.

20 13. Polipéptido de unión al Dominio de Unión a Albúmina de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la secuencia xi) se selecciona entre los SEQ ID NO: 105-111.

14. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

25 15. Combinación del polipéptido de unión al Dominio de Unión a Albúmina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y un agente detectable.

Designación	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
BM06677	ELKVAEKEINTLNLTHQRIAFI IKLDD	1
BM06638	ELVNAFSEIKALPNLTLHQRLAFIVKLLDD	2
BM06608	ELHHAFFREIKFLPNLTFHQRLAFIVKLLDD	3
BM06650	EFKLALQEIHYLPNLTLDQRLAFILKLLDD	4
BM06678	ELRWALNEIRRLPNLTFKQHLAFIVKLLDD	5
BM06620	EFRAALLEIKLLPNLTFIQRLLAFIVKLLDD	6
BM06695	EFTIALREIHALPNLTLHQRLAFI IKLDD	7
BM06681	ELRKAHEIQILNLTLSQRLAFIVKLLDD	8
BM06655	EFKDALDEIKDLNLTSMQRIAFIVKLLDD	9
BM06602	ELTTAFAEIQKLPNLTFEQKIAFI IKLDD	10
BM06670	EFREAJIEIRRLPNLTLHQRLAFIMKLLDD	11
BM06668	EIKTAFAEIRVLPNLTFQRLAFI IKLDD	12
BM06690	ERRYAFREIRLLPNLTFSQRIAFIVKLLDD	13
BM06667	ELKAAFREINDLNLTHTRIAFILKLLDD	14
BM06641	ELKMAFQEIRYLPNLTRLQRIAFIVKLLDD	15
BM06686	EWKKALREIHYLPNLTLTQRLLAFIVKLLDD	16
BM06664	EFEKALVEIKTLPNLTAIQRIAFIVKLLDD	17
BM06583	EFIFALSEIKVLPNLTHVQKIAFI IKLDD	18
BM06687	EFKYAIQEIKDLPNLTSQRIAFIVKLLDD	19
BM06700	ELNQALWEIRQLPNLTFNQRYAFIVKLLDD	20
BM06661	ELQGALTEIKNLPNLTFHQRIAFIVKLLDD	21
BM06669	ELADALYEIKNLPNLTHEQHLAFIVKLLDD	22
BM06676	ELGVALKEIGQLPNLTHTRIAFI IKLDD	23
BM06680	ELSIALNEIKGLPNLTLQKIAFI IKLDD	24
BM06531	EIRSAVKEINVLPNLTFSQKIAFI YKLEB	25
BM06665	ELSSALLEISHLPNLTHQRIAFIVKLLDD	26
BM06683	ELVHAFQEIRYLPNLTHSQRIAFI IKLDD	27
BM06698	ELHNAFSEIKQLPNLTTQRIAFI IKLDD	28
BM06692	EGVNAFNEIKGLPNLTFHQKIAFI IKLDD	29

FIGURA 1A

Designación	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
BM06660	ELKYALMEIRYLPNLTTHRQKIAFILKLLDD	30
BM06645	ELRWAVSEIRHLPNLTFHQRIAFIVKLLDD	31
BM06508	ELQRAFAEIQSLPNLTLNQHIAFIYKLED	32
BM06649	ELKAAFEIRTLPNLTFGORTAFIVKLLDD	33
BM06666	ELTTAKKEIQALPNLTHQORAFIVKLLDD	34
BM06549	EDMRAEHEINKLPNLTLAQRVAFIYKLED	35
BM06552	ELNAAFTEISSLPNLTLDQRLAFIFKLLDD	36
BM06672	ELRWALNEIHILPNLTLQKRVAFIVKLLDD	37
BM06484	ELKNAFIEIKNLPNLTNQTIAFIVKLLDD	38
BM06652	ELSLAFVEIHKLPNLTTHHQLAFIVKLLDD	39
BM06480	ELQWAFNEIHNLPNLTYYVQRIAFIVKLLDD	40
BM06512	EEQTAMQEINSLPNLTLQRIAFIFKLED	41
BM06648	ELGWAFFEIRNLPNLTTHYQRIAFIMKLLDD	42
BM06691	ENLWAFNEIKGLPNLTHDQRIAFIVKLLDD	43
BM06501	ELSFAPSEINVLPNLTFHQKIAFIYKLED	44
BM06544	EFRGAIAEIRDLPNLTLEQKYAFIFKLED	45
BM06487	EEENAYKEIGSLPNLTLAQKVAFILKLED	46
BM06688	ELRQAIQEIHLPNLTHSQRVAFIVKLLDD	47
BM06503	ENHAAFQEIILSNLTLNQRLEAFITKLLDD	48
BM06491	ETNYAFKEIDLPLNLTLMQKLAFIVKLLDD	49
BM06675	EISLAFKEIKALPNLTGQRFPAFILKLLDD	50
BM06584	ELSKALTEIRMLPNLTFRQRIAFIYKLED	51
BM06540	ELDMAYTEIGLLPNLTFSQLLAFIYKLED	52
P06677	KELKVAFKKEINTLPNLTTHQQRLEAFIKLDDDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	53
P06638	KELVNRPFSEIKALPNLTLHORLAFIVKLLDDDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	54
P06608	KELHHAFREIKFLPNLTFHORLAFIVKLLDDDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	55
P06650	KEFKLALQEIHYLPNLTLDQRLEAFIKLDDDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	56
P06678	KELRWALNEIRRLPNLTFKQHIAFIVKLLDDDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	57
P06620	KEFRRAALLEIKLLPNLTFIQRLAFIVKLLDDDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	58

FIGURA 1B

Designación	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
P06695	KEFTIALREIHALPNLTLHQRLAFI IKLDDDPQSSELLAEAKKLNDAQ	59
P06681	KELKAFHEIQILPNLTLSQLAFIVKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	60
P06655	KEFDALDEIKDLPNLTSMBRIAFIVKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	61
P06602	KELTFAFAEIQKLPNLTFEOKIAFIIKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	62
P06670	KEFREAIIEIRRLPNLTLHORLAFIMKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	63
P06668	KEIKTFAFAEIRVLPNLTFQARLAFI IKLDDDPQSSELLAEAKKLNDAQ	64
P06690	KERRYAFREIRLLPNLTFSQLAFIVKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	65
P06667	KELKAAFREINDLNLTHTORLAFI IKLDDDPQSSELLAEAKKLNDAQ	66
P06641	KELKMAFQEI RYLPNLTRLQRIAFIVKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	67
P06686	KEMKKALREIHYLPNLTLTORLAFIVKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	68
P06664	KEFEKALVEIKTLPNLTAIQRIAFIVKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	69
P06583	KEFIFALSEIKVLPNLTHVQRIAFIVKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	70
P06687	KEFYAIQEIKDLPNLTSGORIAFIVKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	71
P06700	KELNQAWEIRQLPNLTFNQRVAFIVKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	72
P06661	KELQGAITEIKNLPNLTGHQRIAFIVKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	73
P06669	KELADALYEIKNLPNLTHEQRIAFIVKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	74
P06676	KELGVALKEIGQLPNLTHTORLAFI IKLDDDPQSSELLAEAKKLNDAQ	75
P06680	KELSTALNEIKGLPNLTSLQRIAFIVKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	76
P06531	KEIRSAIYKEINVLPNLTFSQLAFIYKLEDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	77
P06665	KELSSALLEISHLPNLTHQORIAFIVKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	78
P06683	KELVHAFGEIRYLPNLTHSQLAFI IKLDDDPQSSELLAEAKKLNDAQ	79
P06698	KELHNFSEIKQLPNLTTQORLAFI IKLDDDPQSSELLAEAKKLNDAQ	80
P06692	KEGVNRFNEIKGLPNLTFHOKLAFIVKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	81
P06660	KELKYALMEIRYLPNLTHROKIAFIIKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	82
P06645	KELRMVSEIRHLPNLTFHORLAFIVKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	83
P06508	KELQRAFAEIQSLPNLTLNQHIAFIIYKLEDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	84
P06649	KELKAAFREIRTLPNLTFGQRTAFIVKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	85
P06666	KELTTAMKEIQALPNLTHQORIAFIVKLDLDDPSQSELLAEAKKLNDAQ	86
P06549	KEDMRAFHEINKLPNLTLAQRVAFIYKLEDDDPQSSELLAEAKKLNDAQ	87

FIGURA 1C

Designación	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
P06552	KELNAAFTEISSLPNLTLDQRLAFIFKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQ	88
P06672	KELRWALNEIHIILPNLTLQKQVAFIVKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQ	89
P06484	KELKNFAFIEIKNLPNLTTNQTALAFIVKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQ	90
P06652	KELSLAFVEIHKLPNLTHHQRALAFIVKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQ	91
P06480	KELQWAFNEIHNLPNLTIVQRIAFIVKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQ	92
P06512	KEEQTAMQEINSLPNLTLEQRIAFIFKLEDDPSQSESELLAEAKKLNDAQ	93
P06648	KELGWAFREIRNLPNLTHYQRIAFIMKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQ	94
P06691	KENLWAFNEIKGLPNLTHDQRIAFIVKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQ	95
P06501	KELSFAPSEINVLPNLTFHQKIAFIYKLEDDPSQSESELLAEAKKLNDAQ	96
P06544	KEFRGAIAEIRDLPNLTLQKYAFIFKLEDDPSQSESELLAEAKKLNDAQ	97
P06487	KEENAYKEIGSLPNLTLAQKVAFILKLEDDPSQSESELLAEAKKLNDAQ	98
P06688	KELRQALQEIHIILPNLTHSQRVAFIVKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQ	99
P06503	KENHAAFQEIILSLPNLTLNQRALAFITKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQ	100
P06491	KETNYAFKEIDLLPNLTLMQKALAFIVKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQ	101
P06675	KEISLAFKEIKALPNLTGQQRFAFILKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQ	102
P06584	KELSKALTEIRMLPNLTFRQRIAFIILKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQ	103
P06540	KELDMAYTEIGLLPNLTFSQLLAFIILKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQ	104
Z06677	VDKAYAKELKVAFKKEINTLPNLTHQQRIAFIILKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQAPK	105
Z06638	VDKAYAKELVNAFSEIKALPNLTHQRALAFIVKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQAPK	106
Z06608	VDKAYAKELHHAFREIKFLPNLTFHQRIAFIVKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQAPK	107
Z06650	VDKAYAKEFKLAIQEIHYLPNLTLQRIAFIILKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQAPK	108
Z06678	VDKAYAKELRWALNEIRRLPNLTFKQRIAFIVKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQAPK	109
Z06620	VDKAYAKEFRAALLEIKLLPNLTFIQRALAFIVKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQAPK	110
Z06695	VDKAYAKEFTIALREIHALPNLTHQRALAFIILKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQAPK	111
Z06681	VDKAYAKELRKAATHEIQIILPNLTLQRALAFIVKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQAPK	112
Z06655	VDKAYAKEFKDALDEIKDLPNLTFMORAFIVKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQAPK	113
Z06602	VDKAYAKELTTAFAEIQKLPNLTFEQKIAFIILKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQAPK	114
Z06670	VDKAYAKEFREAIIEIRRLPNLTHQRALAFIMKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQAPK	115
Z06668	VDKAYAKEIKTAFAEIRVLPNLTFARLAFIILKLDLDDPSQSESELLAEAKKLNDAQAPK	116

FIGURA 1D

Designación	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
Z06690	VDKAKERRYAFREIRLLPNLTFQRSIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	117
Z06667	VDKAKELKAAAFREINDLPNLTHQTQRIAFILKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	118
Z06641	VDKAKELKMAFQEIIRYLPNLRQLQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	119
Z06686	VDKAKEMKKAALREIHYLPNLTLTQRLAFAIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	120
Z06664	VDKAKAFEKALVEIKTLPNLTAIQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	121
Z06583	VDKAKAEFIFALSEIKVLPNLTHVQKIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	122
Z06687	VDKAKAEFKYIQEIKDLPNLTSQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	123
Z06700	VDKAKELNQAALWEIROLPNLTFNQRFVAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	124
Z06661	VDKAKELQGALTEIKNLPNLTFGHQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	125
Z06669	VDKAKELADALYEIKNLPNLTHEQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	126
Z06676	VDKAKELGVALKKEIGQLPNLTHQRIAFIILKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	127
Z06680	VDKAKELSIALNEIKGLPNLTSLQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	128
Z06531	VDKAKAEIRSAKKEINVLPNLTFSQRIAFIYKLEDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	129
Z06665	VDKAKELSSALLEISHLPNLTHQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	130
Z06683	VDKAKELVHAFSEIRYLPNLTHSQRIAFIILKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	131
Z06698	VDKAKELHNAFSEIKQLPNLTTQRIAFIILKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	132
Z06692	VDKAKELGVNAFNEIKGLPNLTFHQKIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	133
Z06660	VDKAKELKYALMEIRYLPNLTHRQKIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	134
Z06645	VDKAKELRWAVSEIRHLPNLTFHQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	135
Z06508	VDKAKELQRAFAEIQSLPNLTLNQHTAFIYKLEDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	136
Z06649	VDKAKELKAAFREIRTLPNLTFGQRTAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	137
Z06666	VDKAKELTTAMKEIQALPNLTHQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	138
Z06549	VDKAKELDMRAFHEINKLPNLTLAQRVAFIYKLEDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	139
Z06552	VDKAKELNAAFTTEISSLPNLTDQRLAFAIFKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	140
Z06672	VDKAKELRWALNEIHLPNLTFLEQVAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	141
Z06484	VDKAKELKNAFTEIKNLPNLTFNQTLAFAIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	142
Z06652	VDKAKELSLAFVEIHLKLPNLTHQRLAFAIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	143
Z06480	VDKAKELQWAFNEIHNLPNLTYVQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	144
Z06512	VDKAKEEQTAMQEIINSLPNLTFLEQRIAFIFKLEDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAQPK	145

FIGURA 1E

Designación	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
Z06648	VDKAKELGWAFREIRNLPNLTTHYQRIAFINKLDDDPSSSELLAEAKKLNDAQAPK	146
Z06691	VDKAKENLWAFNEIKGLPNLTHDQRIAFIVKLDLDDPSSELLAEAKKLNDAQAPK	147
Z06501	VDKAKELSFATSEINVLPNLTFHQKTAFTYKLEDDPSSELLAEAKKLNDAQAPK	148
Z06544	VDKAKEFRGALAEIRDLPNLTLEQYAFIFKLEDDPSSELLAEAKKLNDAQAPK	149
Z06487	VDKAKEEENAYKEIGSLPNLTLAQVAFILKLEDDPSSELLAEAKKLNDAQAPK	150
Z06688	VDKAKELRQALQEIHIILPNLTHSQRVAFIVKLDLDDPSSELLAEAKKLNDAQAPK	151
Z06503	VDKAKENHAAEQEILSLPNLTLNQRVAFITKLDLDDPSSELLAEAKKLNDAQAPK	152
Z06491	VDKAKEITNYATKEIDLIPNLTLMQKLAFTIVKLDLDDPSSELLAEAKKLNDAQAPK	153
Z06675	VDKAKEISLAFKEIKALPNLTGQRFVAFILKLDLDDPSSELLAEAKKLNDAQAPK	154
Z06584	VDKAKELSKALTEIRMLPNLTFRQRIAFI IKLDDDPSSSELLAEAKKLNDAQAPK	155
Z06540	VDKAKELDMAYTEIGLLPNLTFSQLAFI IKLDDDPSSSELLAEAKKLNDAQAPK	156
ABD001	LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRNLIINNAKTVEGVKALIDEILAAALP	157
C-ABD001	CLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRNLIINNAKTVEGVKALIDEILAAALP	158
ABD035	LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRNLIINNAKTVEGVKALIKLHILAAALP	159
PF013	LAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRNLIKAKTVEGVKALIKDAIILAAALP	160
PEP07986	GSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRNLIKAKTVEGVKALIKDAIILAAALP	161
PEP07911	GLSAKEAANAELDCYGVSDFYKRNLIKAKTVEGVKALIKDAIILAAALP	162

FIGURA 1F

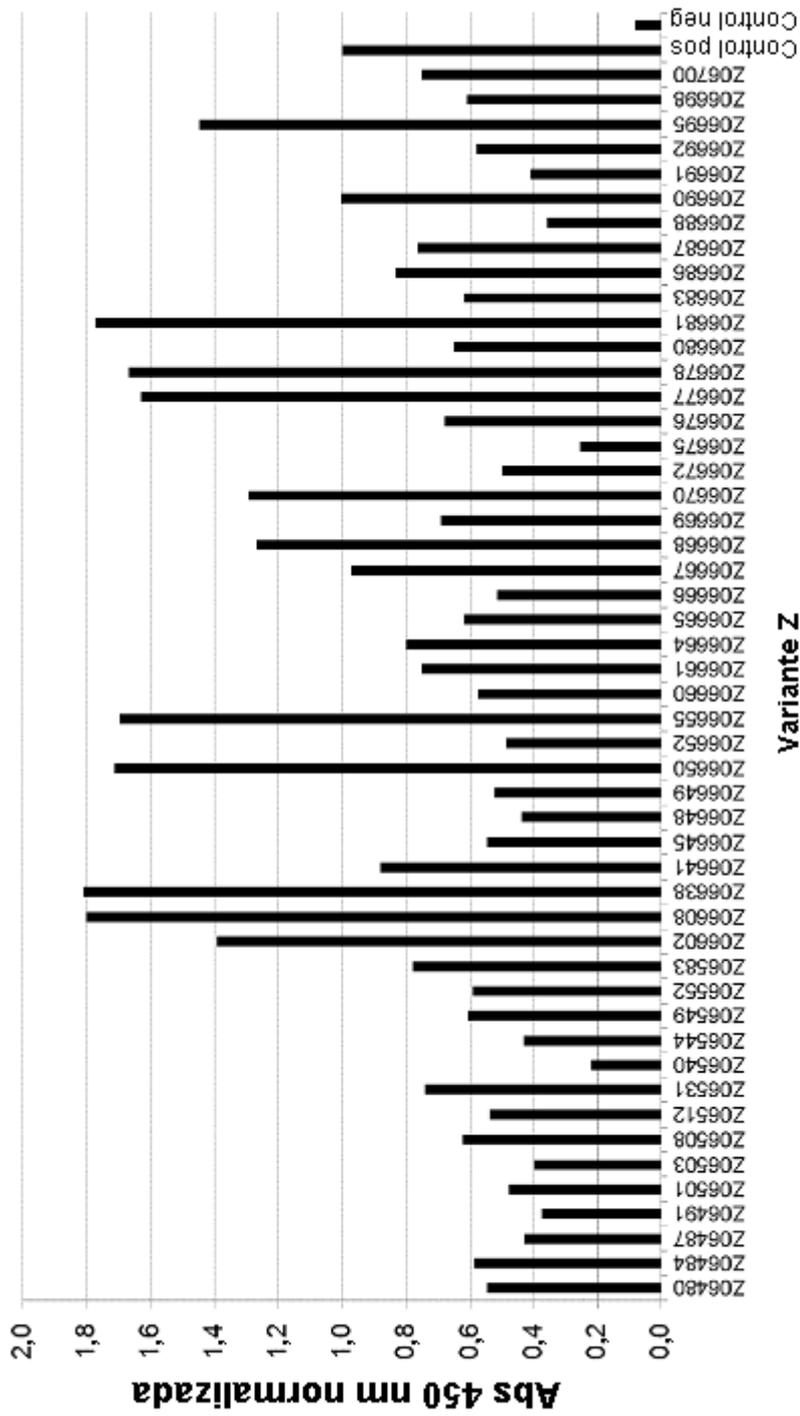
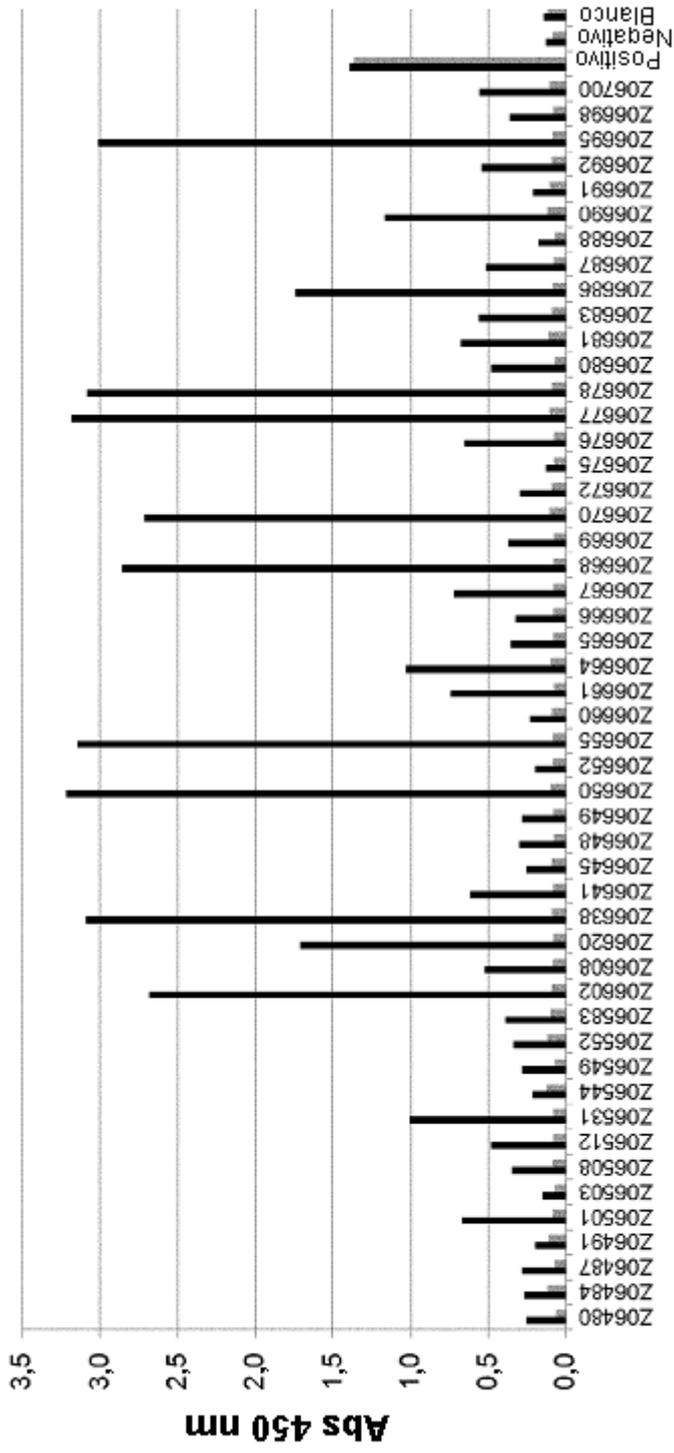


FIGURA 2



Variante Z
FIGURA 3

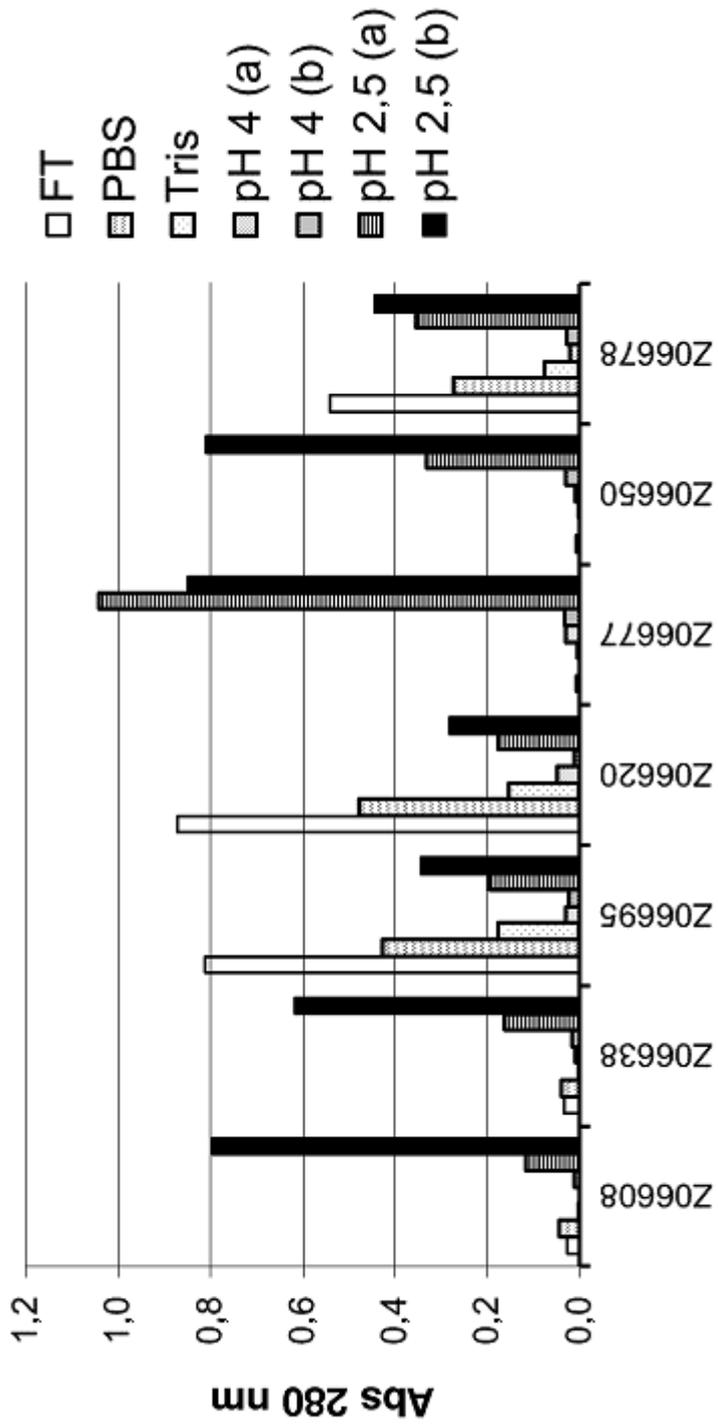


FIGURA 4

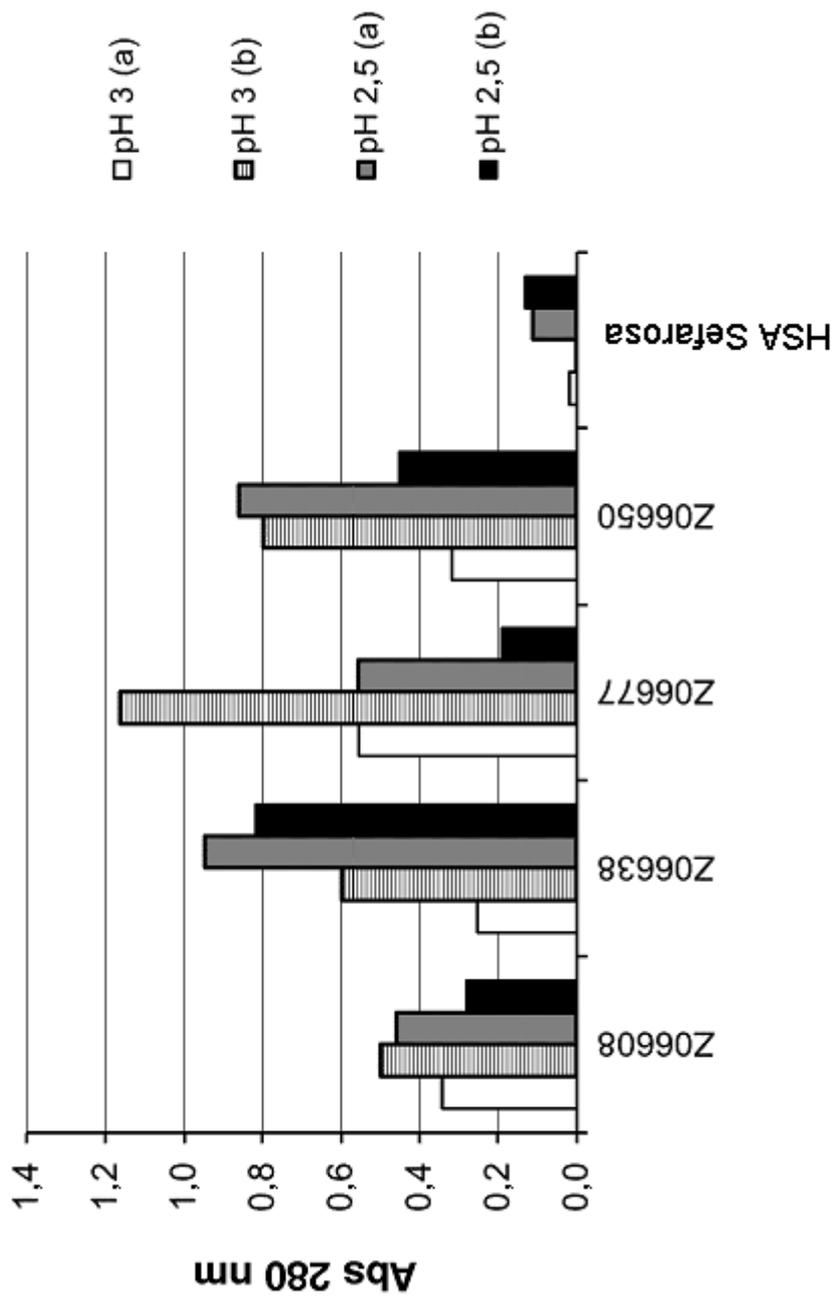


FIGURA 5A

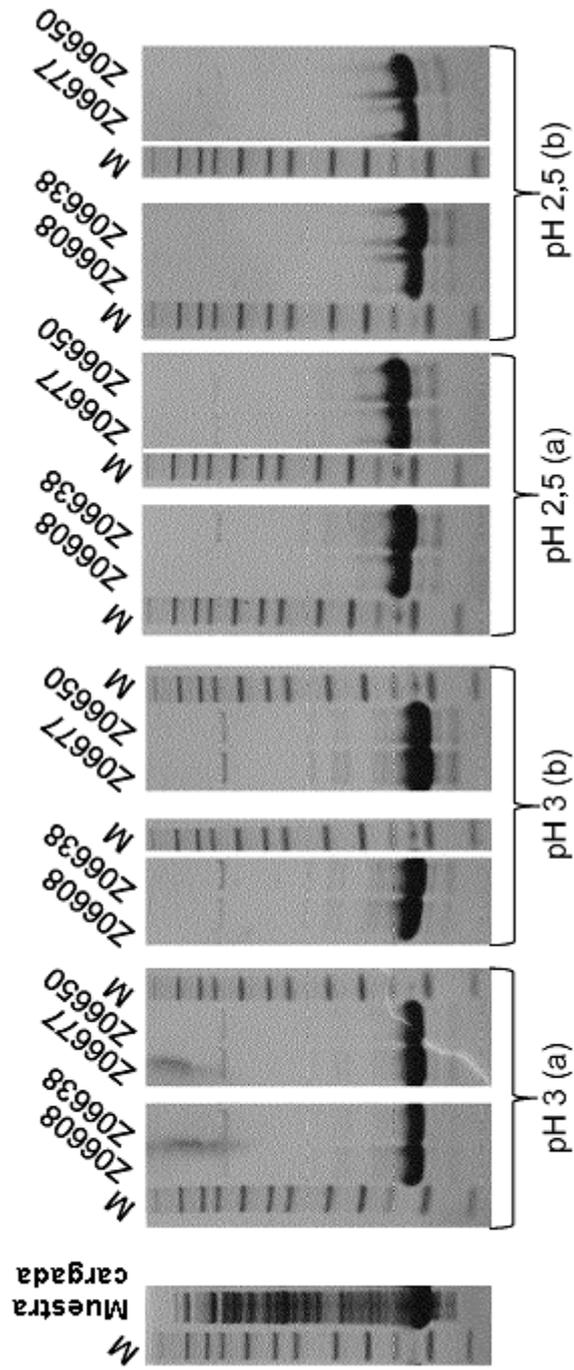


FIGURA 5B

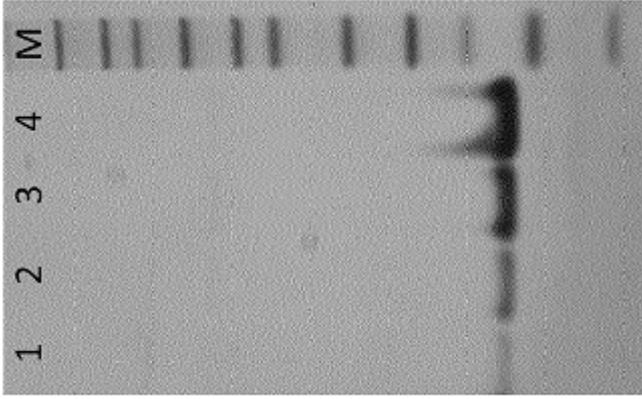


FIGURA 5C

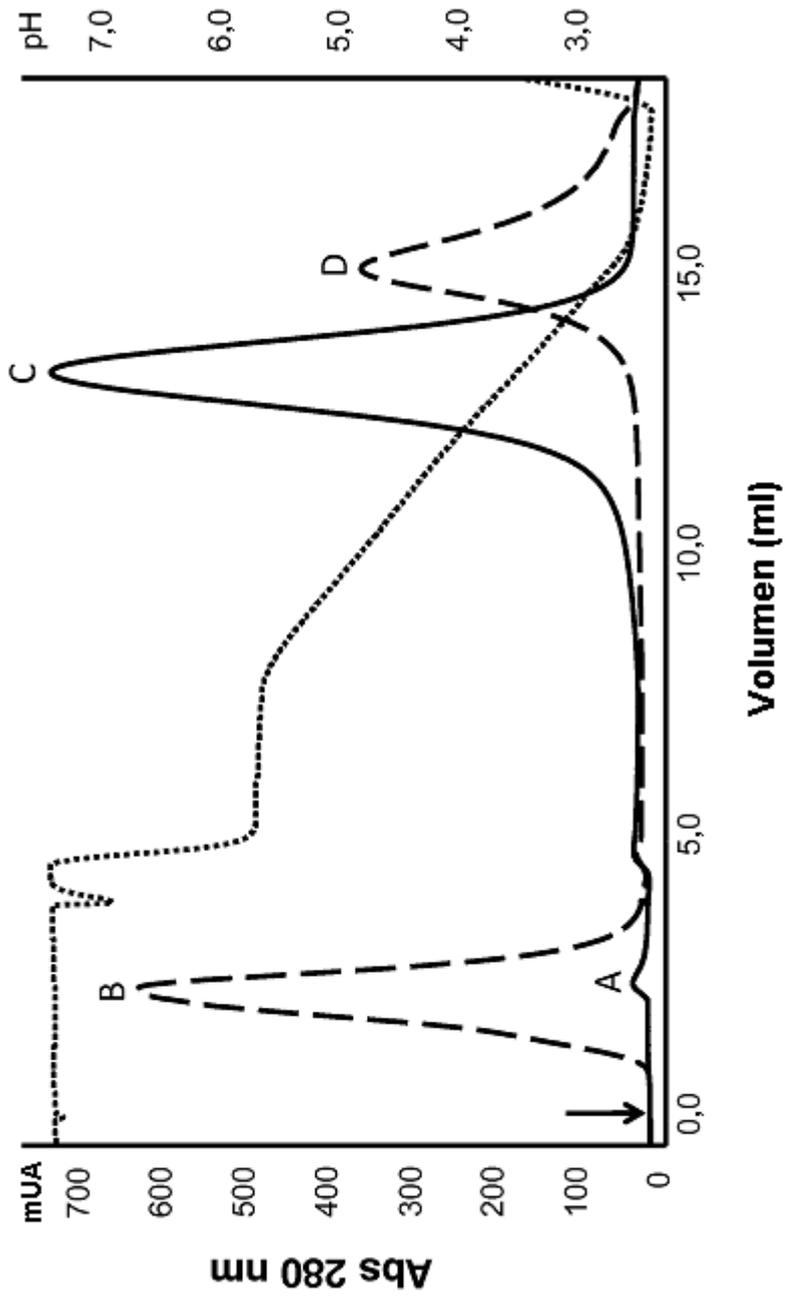


FIGURA 6

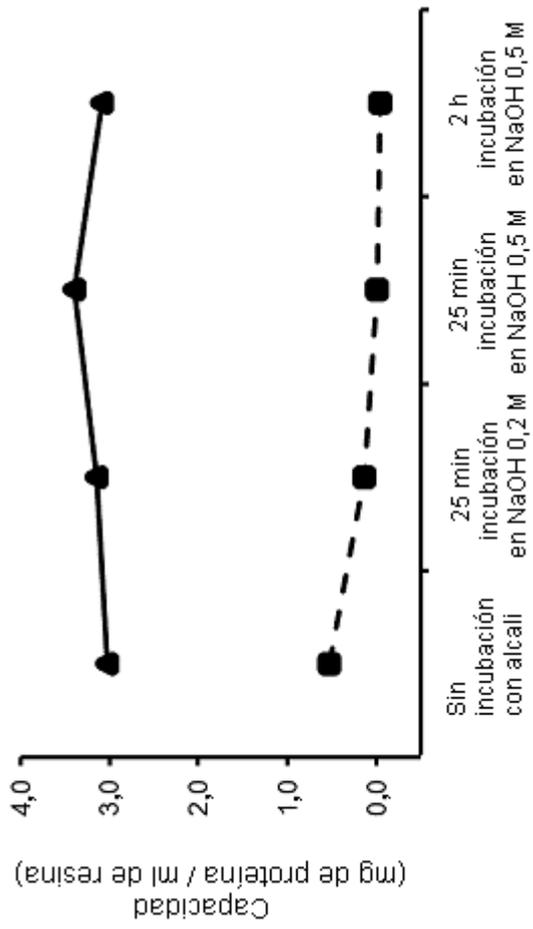


FIGURA 7

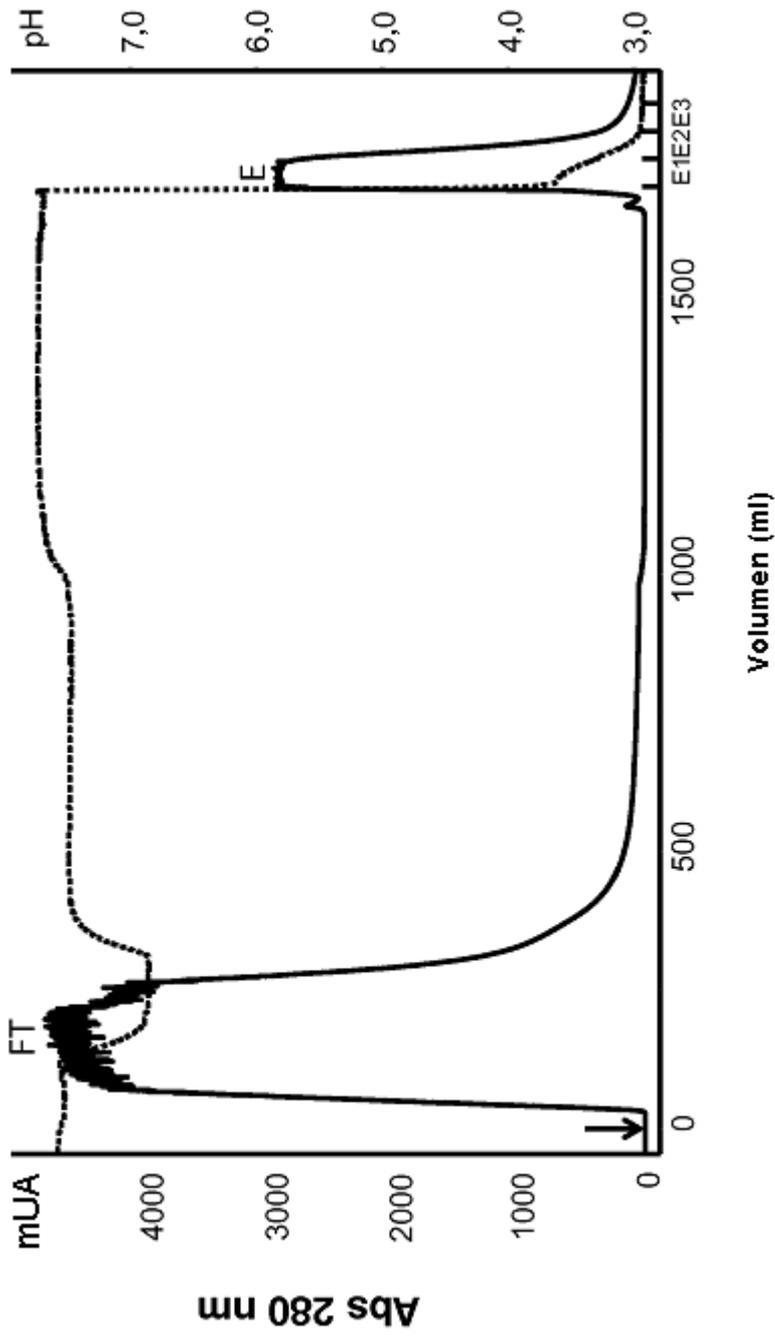


FIGURA 8A

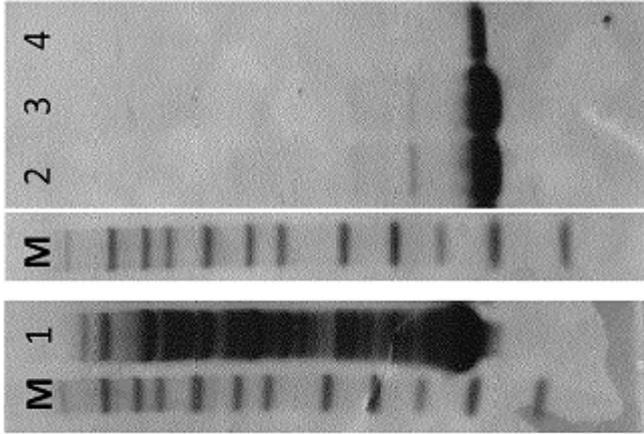


FIGURA 8B

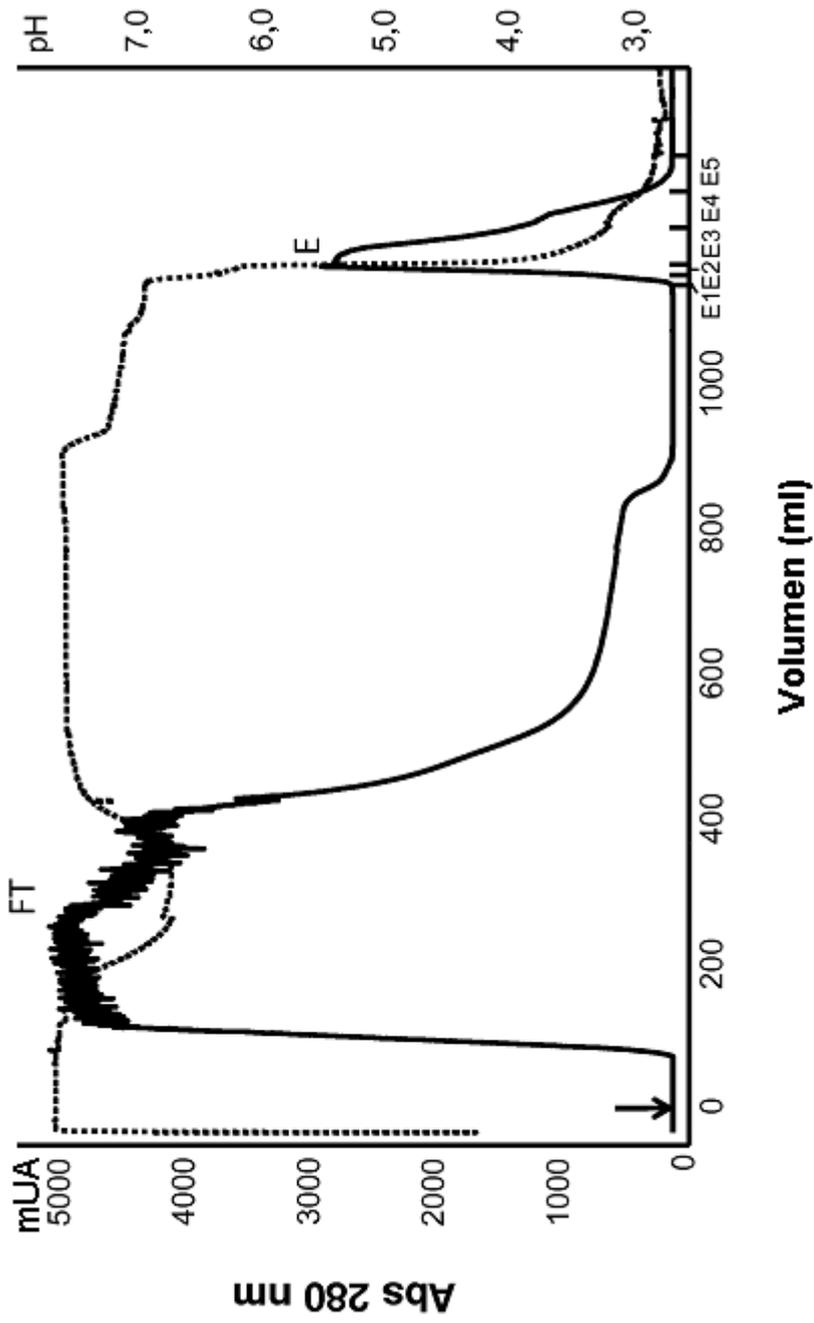


FIGURA 9A

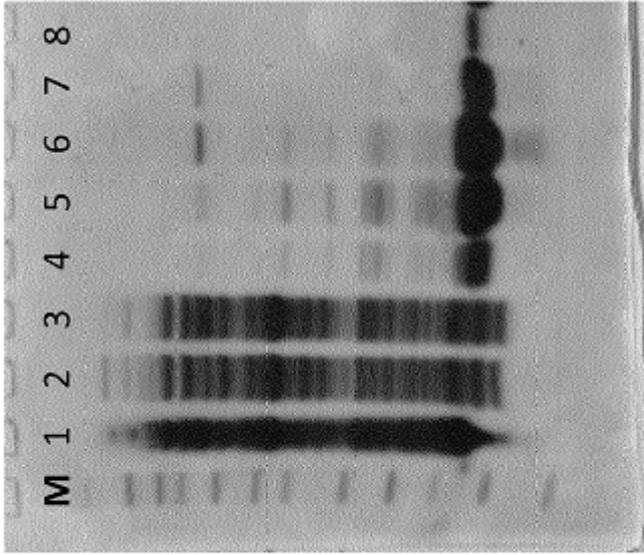


FIGURA 9B

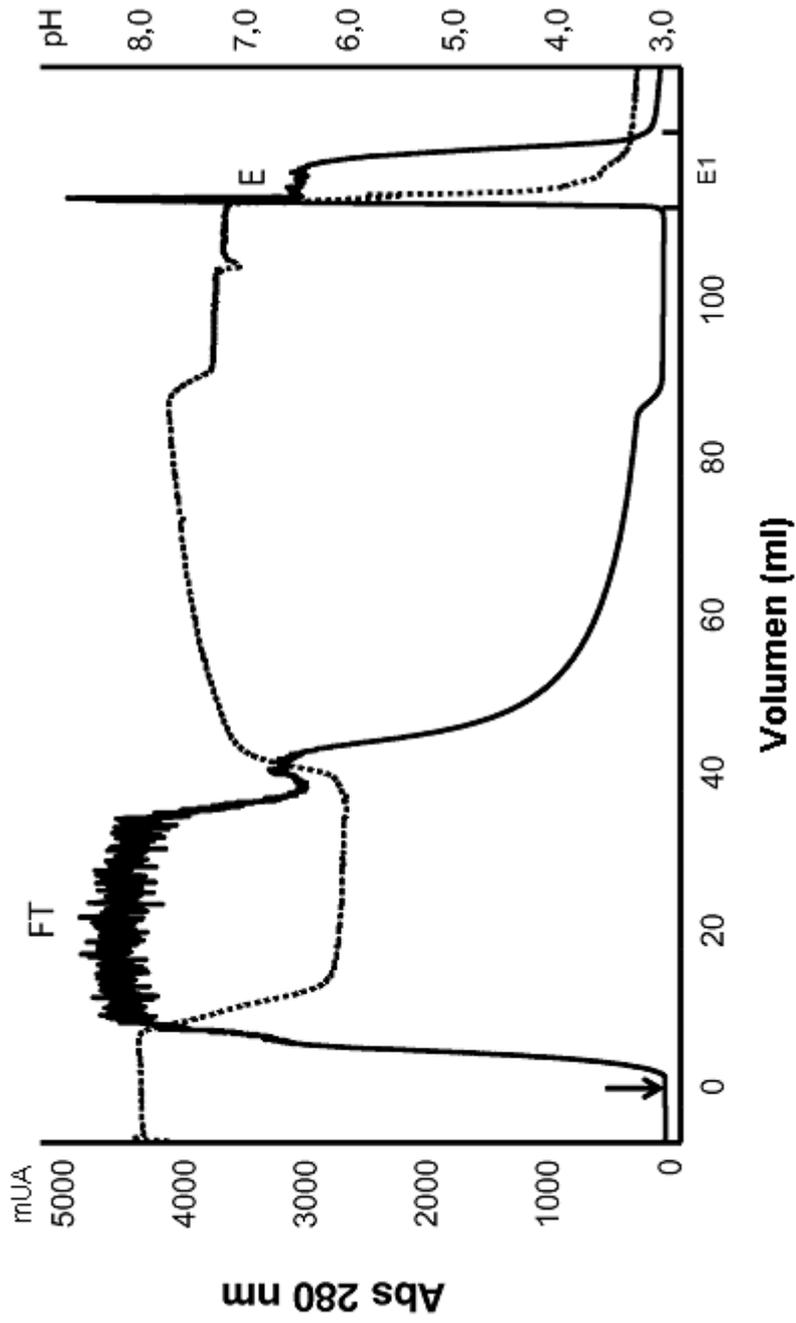


FIGURA 10A

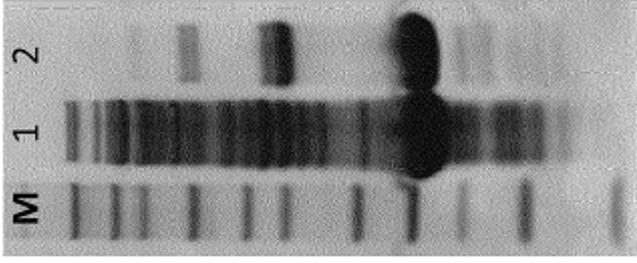


FIGURA 10B

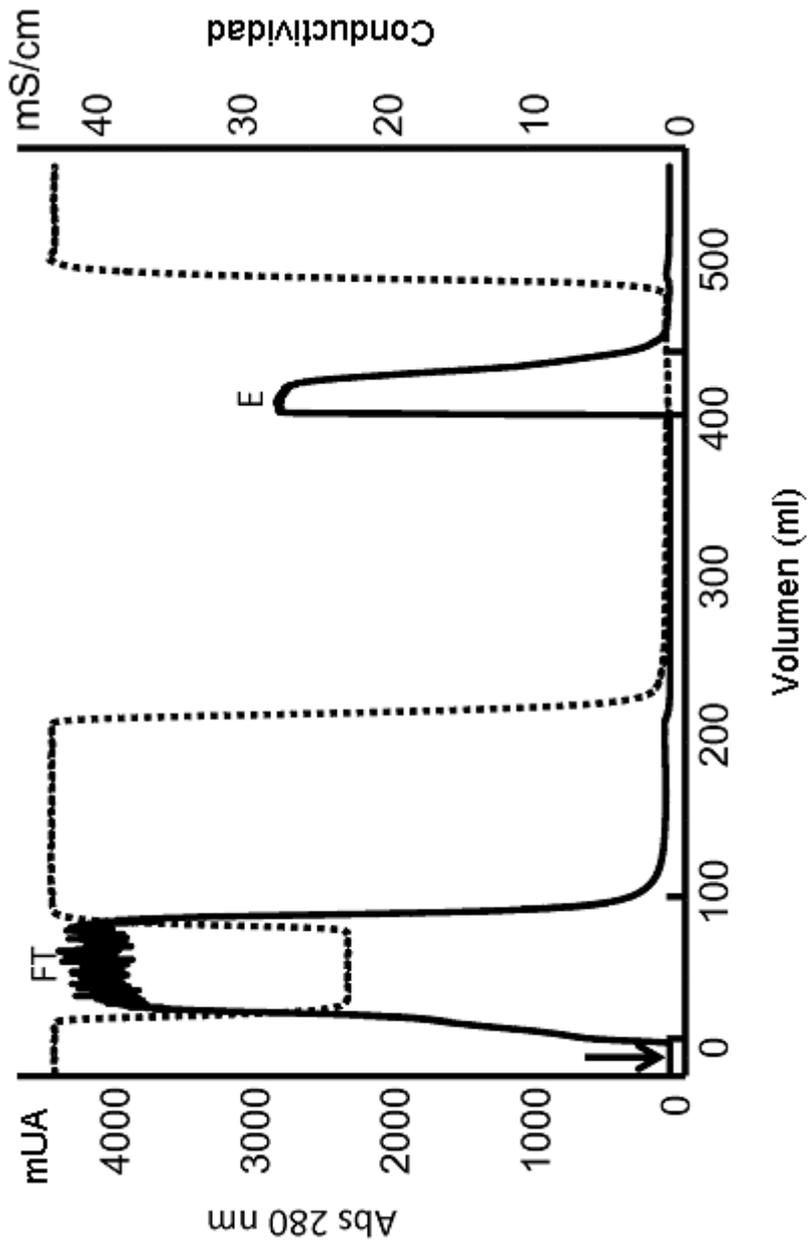


FIGURA 11A

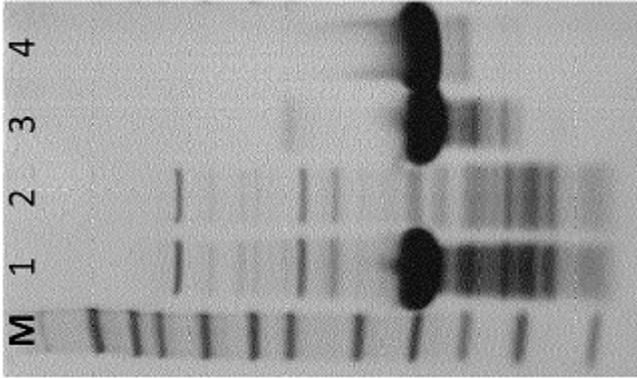


FIGURA 11B

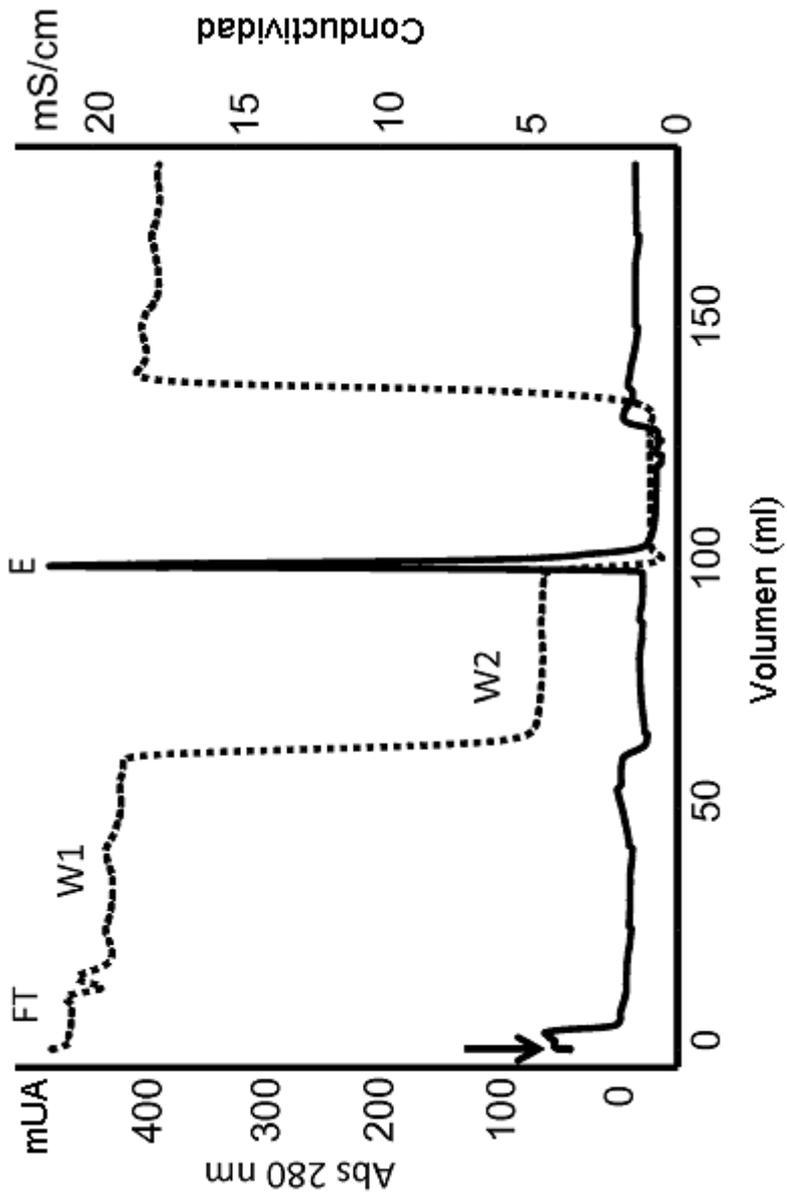


FIGURA 12A

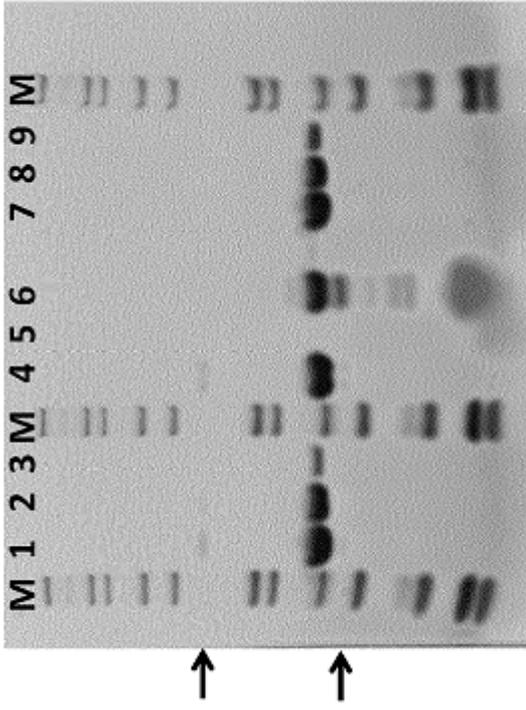


FIGURA 12B

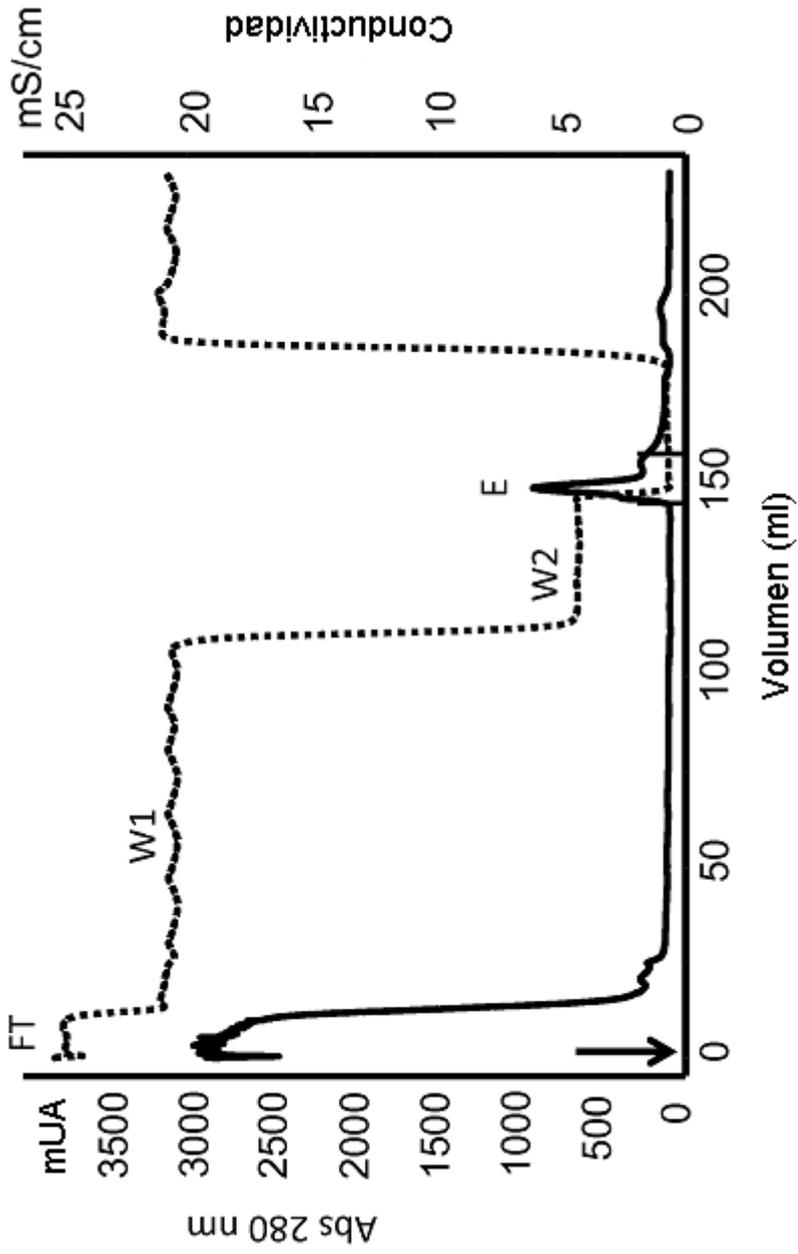


FIGURA 13A

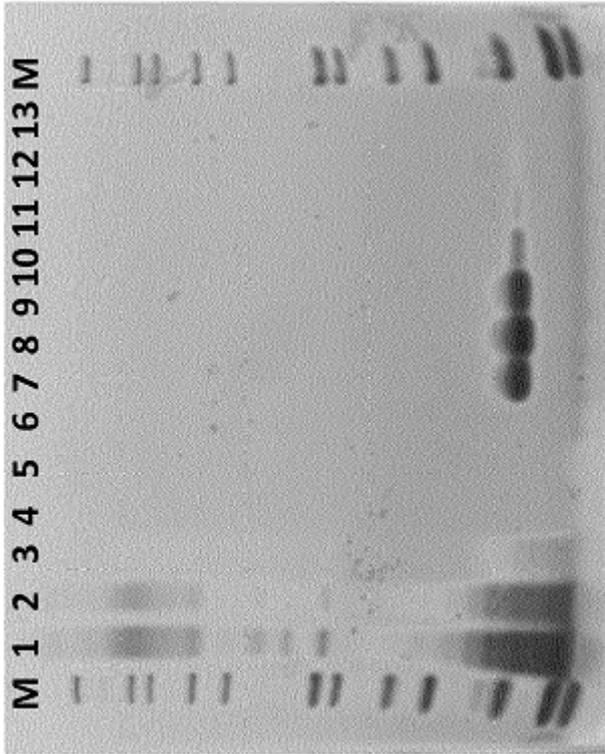


FIGURA 13B