

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 442**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 14/76 (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2013 PCT/US2013/042429**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13177398**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2013 E 13793564 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2855509**

54 Título: **Dominios de unión a albúmina de consenso no naturales**

30 Prioridad:

25.05.2012 US 201261651642 P
12.03.2013 US 201361776918 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
30.05.2018

73 Titular/es:

JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US

72 Inventor/es:

JACOBS, STEVEN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 670 442 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).

Dominios de unión a albúmina de consenso no naturales**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a dominios de unión a albúmina y a métodos para elaborarlos y usarlos. Más particularmente, la presente invención está dirigida a una secuencia de consenso del dominio de unión a albúmina no natural y a variantes de la misma como se describe en la presente.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La eliminación rápida de moléculas bioterapéuticas mediante depuración renal contribuye a una eficacia clínica limitada o una dosificación más frecuente para el paciente. La depuración renal debida a la filtración glomerular está más asociada con bioterapéuticos más pequeños, ya que las velocidades de filtración renal se reducen en gran medida para las moléculas con un peso molecular de más de 50.000 daltons (Kontermann, Curr Opin Biotechnol 22:868-76, 2011). Varios fármacos bioterapéuticos aprobados contienen porciones activas que por sí mismas caen por debajo del límite de filtración y por lo tanto se depuran rápidamente. Para superar esta limitación, se han introducido una variedad de tecnologías para aumentar eficazmente el tamaño de la molécula terapéutica a fin de reducir la filtración renal y la vida media resultante.

La PEGilación (PEG) de agentes terapéuticos es una forma eficaz de aumentar el radio hidrodinámico de la proteína y reducir la filtración glomerular. Una o varias cadenas de PEG pueden acoplarse a la proteína más comúnmente a través de la conjugación a grupos tiol o amina libres en la superficie de la proteína. Las versiones PEGiladas de Adenosina deaminasa, L-Asparaginasa, Interferón alfa-2b, G-CSF, Hormona de Crecimiento Humano, Eritropoyetina, Uricasa y un fragmento de anticuerpo anti-TNFalfa han sido todos aprobados para terapia humana (Kontermann, Curr Opin Biotechnol 22:868-76, 2011). Las limitaciones de la PEGilación incluyen la producción de productos heterogéneos y la dificultad para controlar el número de moléculas PEG unidas a ciertas proteínas. La PEGilación introduce una conjugación adicional así como pasos de purificación para la producción de proteínas terapéuticas, lo que da como resultado rendimientos reducidos y costos aumentados de los productos. La PEGilación también puede conducir a la vacuolización tubular renal en animales y pacientes ya que las cadenas de PEG no son degradables en los riñones (Gaberc-Porekar et al., Curr Opin Drug Discov Devel 11:242-250, 2008).

El acoplamiento de un agente terapéutico a un región Fc de un anticuerpo para generar proteínas de fusión Fc se puede usar para aumentar la vida media en suero de las moléculas terapéuticas. Las inmunoglobulinas pueden mostrar vidas medias largas del orden de varias semanas en humanos debido a su gran tamaño y al reciclaje a través de FcRn (Kuo et al., J Clin Immunol 30:777-789, 2010). El receptor 2 de TNF, LFA-3, CTLA-4, IL-1R, y moléculas de péptido miméticas de TPO son todas terapias aprobadas producidas como fusiones de Fc (Kontermann, Curr Opin Biotechnol 22:868-76, 2011). Las proteínas de fusión Fc no son ideales para todas las clases terapéuticas por varias razones. La naturaleza homodimérica de la región Fc da como resultado la producción de una proteína terapéutica dimérica, llevando posiblemente a la activación celular debido a la agrupación del receptor. Las fusiones Fc también pueden hacerse en sistemas de expresión mamíferos que pueden ser más costosas que los sistemas procariotas.

Además de Fc, la albúmina muestra una vida media larga in vivo debido al reciclado de FcRn. A una concentración de aproximadamente 40 g/l, la Albúmina Sérica Humana (HSA) es la proteína más abundante encontrada en la sangre. El reciclado de FcRn lleva a una vida media larga de aproximadamente 19 días en humanos. Adicionalmente, los estudios de biodistribución sugieren que la albúmina puede distribuirse dentro del cuerpo a áreas importantes para atacar la enfermedad, como articulaciones inflamadas o tumores (Wunder et al., J Immunol 170:4793-4801, 2003). Por tanto, la vida media en suero de un número de proteínas se ha incrementado al producir las como fusiones C-terminales o N-terminales para HSA. Las fusiones exitosas incluyen interferón alfa (Flisiak and Flisiak, Expert Opin Biol Ther 10:1509-1515, 2010), hormona de crecimiento humano (Osborn et al., Eur J Pharmacol 456:149-158, 2002), factor de necrosis tumoral (Muller et al., Biochem Biophys Res Commun 396:793-799, 2010), factor de coagulación IX (Metzner et al., Thromb Haemost 102: 634-644, 2009), factor de coagulación VIIa (Schulte, Thromb Res 122 Suppl 4: S14-19, 2008), insulina (Duttaroy et al., Diabetes 54:251-258, 2005), uroquinasa (Breton et al., Eur J Biochem 231:563-569, 1995), hirudina (Sheffield et al., Blood Coagul Fibrinolysis 12:433-443, 2001), y fragmentos de anticuerpos bispecíficos (M Muller et al, J Biol Chem 282:12650-12660, 2007). Las proteínas de fusión HSA pueden tener vidas medias en suero largas, sin embargo la producción a gran escala de estas proteínas de fusión está limitada predominantemente a sistemas de expresión de levadura. Adicionalmente, el gran tamaño de la HSA puede llevar a una pérdida en la actividad de los agentes terapéuticos debido al impedimento estérico.

Las proteínas terapéuticas también pueden producirse como proteínas de fusión para péptidos o proteínas que se unen a la albúmina sérica en el torrente sanguíneo para aumentar su vida media. Dichos péptidos de unión a albúmina incluyen péptidos restringidos por cisteína o fragmentos de anticuerpos para albúmina. La expresión de un

fragmento de anticuerpo Fab como una fusión a péptidos restringidos por cisteína aumentó significativamente la vida media en suero del Fab (Dennis et al., J Biol Chem 277:35035-35043, 2002; US2004/0253247A1). El acoplamiento del péptido restringido por cisteína a un fragmento de anticuerpo llevó a una mejor acumulación tumoral máxima y a una distribución tumoral más homogénea en comparación con las moléculas Fab y mAb dirigidas al mismo antígeno (Dennis et al., Cancer Res 67:254-261, 2007; US2005/0287153A1). Además, una serie de fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a la albúmina se han acoplado a fracciones terapéuticas para aumentar la vida media del agente terapéutico. Un fragmento de anticuerpo V_{HH} de camélido (Nanobodies®) que se une a HSA se fusionó con otro Nanobody® que se une a TNF-alfa (Coppieters et al., Arthritis Rheum 54: 1856-1866, 2006) o anti-EGFR Nanobodies® (Tijink et al., Mol Cancer Ther 7:2288-2297, 2008). Se han generado anticuerpos del dominio anti-albúmina (dAbs) que se unen a la albúmina y se han fusionado con, por ejemplo, el receptor de interleucina-1 (Holt et al., Protein Eng Des Sel 21:283-288, 2008) y el interferón alfa 2b (Walker et al., Protein Eng Des Sel 23:271-278, 2010) para mejorar su vida media.

Se sabe que una serie de dominios de proteínas de origen natural de bacterias interactúan con la albúmina, presumiblemente para ayudar a que tales bacterias se distribuyan por todo el organismo huésped. Estos son dominios de proteínas de haz de 3 hélices de aproximadamente 6 kDa de tamaño que usan una cara del haz de 3 hélices para interactuar con la albúmina del suero (Cramer et al., FEBS Lett 581:3178-3182, 2007; Lejon et al., Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 64:64-69, 2008; Johansson et al., FEBS Lett 374:257-261, 1995; Johansson et al., J Mol Biol 266:859-865, 1997; Johansson et al., J Biol Chem 277:8114-8120, 2002). Uno de tales dominios de unión a albúmina derivado de la proteína G estreptocócica (Jonsson et al., Protein Eng Des Sel 21:515-527, 2008), ha sido usado ampliamente para extender la vida media en suero de las proteínas. Se ha demostrado que la fusión a este dominio aumenta la vida media del receptor de complemento soluble tipo 1 (Makrides et al., J Pharmacol Exp Ther 277:534-542, 1996), un anticuerpo biespecífico ((Stork et al., Protein Eng Des Sel 20:569-576, 2007), CD4 (Nygren et al., Vaccines 91:363-368, 1991; US 6267,964B1), Pf155/RESA (Stahl et al., J Immunol Methods 124:43-52, 1989), G-CSF (Frejd, F. PEGS Europe, 5 de octubre de 5, 2010), y moléculas de anticuerpos que se unen a una serie de objetivos (Andersen et al., J Biol Chem 286:5234-5241, 2011) (Frejd, F. PEGS Europe, 5 de octubre del 2010). Sin embargo, se ha informado en pacientes la producción de anticuerpos contra el dominio y por tanto el uso de la molécula para aplicaciones terapéuticas puede ser un desafío (Goetsch et al., Clin Diagn Lab Immunol 10:125-132, 2003; Libon et al., Vaccine 17:406-414, 1999).

Una serie de dominios de proteínas o péptidos que se unen a la albúmina son capaces de extender la vida media en suero y producir un patrón de biodistribución más beneficioso de proteínas terapéuticas. Para usar estos dominios de unión a albúmina en aplicaciones terapéuticas, se deben cumplir una serie de requisitos biofísicos, como altos niveles de expresión en un huésped, solubilidad y estabilidad, e inmunogenicidad mínima. La fracción de unión a la albúmina debe unirse a la albúmina de suero con una afinidad que equilibre eficazmente la vida media en el suero y la biodistribución con la actividad de la fracción terapéutica cuando se une y no se une a la albúmina. La WO 2010/141329 se refiere a moléculas que comprenden un dominio de unión a albúmina y una fracción de unión a FcRn, que tienen vidas medias extendidas.

SUMARIO DE LA INVENCION

Un aspecto de la invención es una proteína que comprende un dominio de unión a albúmina aislado, no natural que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21. Otro aspecto de la invención es un dominio de unión a albúmina aislado no natural que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO: 21.

Otro aspecto más de la invención es un dominio de unión a albúmina aislado no natural que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 que tiene sustituciones en los residuos 1, 2, 3, 4, 5 y/o 6, y, preferiblemente, en donde las sustituciones en los residuos 1, 2, 3, 4, 5 y/o 6 pueden tener lugar en las posiciones de aminoácidos Y21, Y22, L25, K30, T31, E33, G34, A37, L38, E41, 142 y/o A45 de la SEQ ID NO: 21 o en las posiciones de aminoácidos Y21, Y22, K30, T31, A37, y/o E41 de la SEQ ID NO: 21.

Un aspecto adicional de la invención es un dominio de unión a albúmina aislado no natural que comprende una secuencia de aminoácidos: LKEAKEKAIEELKKAGITSDX₁X₂FDLINKAX₃X₄VEGVNX₅LKDX₆ILKA (SEQ ID NO: 22); en donde X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ y X₆ pueden ser cualquier aminoácido o un subconjunto de ciertos aminoácidos.

En algunas realizaciones el dominio de unión a albúmina aislado no natural comprende una extensión de 5 aminoácidos en su extremo N-terminal.

Otro aspecto de la invención es un método para elaborar un dominio de unión a albúmina no natural de la invención que comprende proporcionar un polinucleótido que codifica el dominio de unión a albúmina no natural; expresar el polinucleótido en un huésped o in vitro; y recuperar el dominio de unión a albúmina no natural. Otro aspecto de la invención es un polinucleótido aislado que codifica los dominios de unión a albúmina de la invención. Otro aspecto de la invención es un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 35.

Otro aspecto de la invención es un vector aislado que comprende el polinucleótido aislado de la invención y una célula huésped que comprende el vector aislado de la invención.

Otro aspecto de la invención es una proteína de fusión que comprende una proteína de unión a albúmina de la invención y un agente bioactivo.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la invención y por lo menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra el análisis SDS-PAGE de ABDCon purificado. Las muestras son como sigue línea 1) marcador SeeBlue plus 2, 2) lisado celular total, 3) lisado celular soluble, 4) flujo de columna, 5-12) fracciones eluidas. Los pesos moleculares de algunas de las bandas de marcadores se muestran a la izquierda.

La **Figura 2** muestra la espectrometría de masas por ionización por electrospray de la muestra de ABDCon purificada.

La **Figura 3** muestra el análisis por cromatografía de exclusión por tamaño de ABDCon purificado como se ejecuta en PBS.

La **Figura 4** muestra la temperatura de fusión A) y la reversibilidad del despliegue de ABDCon B) medido por DSC en PBS. Los datos restados iniciales normalizados para el primer escaneo se muestran en A. Después del primer escaneo, la muestra se enfrió a 20° C y el escaneo se repitió para determinar la reversibilidad del plegamiento. Las trazas de datos brutos para el primer y segundo escaneo están cubiertos en la parte B.

La **Figura 5** muestra las farmacocinéticas de una proteína de fusión Tencon25-ABDCon en ratones cuando se dosifica a 2 mg/kg por vía intravenosa.

La **Figura 6** muestra las farmacocinéticas de una molécula Tencon25 (residuos 1-90 de la SEQ ID NO: 39) fusionada a ABDCon (SEQ ID NO: 21), ABDCon3 (SEQ ID NO: 26), ABDcon5 (SEQ ID NO: 28), ABDCon7 (SEQ ID NO: 30) y ABDCon9 (SEQ ID NO: 32) en ratones cuando se dosifican a 2 mg/kg por vía intravenosa.

La **Figura 7** muestra la estabilidad de A) ciertas proteínas de fusión ABDCon del dominio FN3 (SEQ ID NO: 1) y B) dominio FN3-ABDCon12 (SEQ ID NO: 46) que tienen una hélice N-terminal extendida en ABDCon cuando se incuban a 37° C durante 0 ó 28 días en PBS.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El término "dominio de unión a albúmina" o "dominio" como se usa en la presente se refiere a un polipéptido que se une a la albúmina in vivo o in vitro. La albúmina puede derivarse de cualquier especie animal, por ejemplo, humano, mono o roedor.

El término " K_D ", como se usa en la presente, se refiere a la constante de disociación entre la albúmina y el dominio de unión a albúmina.

El término " K_{on} ", como se usa en la presente, se refiere a la constante de velocidad para la asociación de un dominio de unión a albúmina con la albúmina para formar un complejo dominio de unión a albúmina/albúmina.

El término " K_{off} ", como se usa en la presente, se refiere a la constante de velocidad para la disociación de un dominio de unión a albúmina del complejo dominio de unión a albúmina/albúmina.

El término "no natural" como se usa en la presente se refiere a un dominio que es sintético, es decir, que tiene una secuencia de aminoácidos no presente en polipéptidos nativos.

El término "sustituir" o "sustituciones" como se usa en la presente se refiere a alterar, eliminar o insertar, o a alteraciones, deleciones o inserciones de uno o más aminoácidos o nucleótidos en un polipéptido o secuencia de polinucleótidos para generar una variante de esa secuencia.

El término "variante", como se usa en la presente, se refiere a un polipéptido o un polinucleótido que difiere de un polipéptido de referencia o un polinucleótido de referencia por una o más modificaciones, por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones

El término "agente bioactivo" como se usa en la presente se refiere a proteínas, anticuerpos, péptidos, nucleótidos, productos farmacéuticos moleculares pequeños y similares, que, cuando se administran a un paciente animal proporcionan un beneficio a ese paciente. En este término se incluyen fracciones producidas sintéticamente, derivadas naturalmente o producidas recombinantemente. Los agentes bioactivos pueden ser análogos, derivados, agonistas, antagonistas, enantiómeros o sales farmacéuticamente aceptables de agentes bioactivos.

El término "estabilidad", como se usa en la presente se refiere a la capacidad de una molécula para

mantener un estado plegado bajo condiciones fisiológicas de tal manera que retiene por lo menos una de sus actividades funcionales normales, por ejemplo, la vida media.

El término "vector" significa un polinucleótido capaz de ser duplicado dentro de un sistema biológico o que puede moverse entre dichos sistemas. Los polinucleótidos del vector típicamente contienen elementos, como orígenes de replicación, señal de poliadenilación o marcadores de selección, que funcionan para facilitar la duplicación o mantenimiento de estos polinucleótidos en un sistema biológico. Ejemplos de tales sistemas biológicos pueden incluir una célula, bacteria, virus, sistemas biológicos animales, vegetales y reconstituidos que utilizan componentes biológicos capaces de duplicar un vector. El polinucleótido que comprende un vector puede ser moléculas de ADN o ARN o un híbrido de estas.

El término "vector de expresión" significa un vector que puede utilizarse en un sistema biológico o en un sistema biológico reconstituido para dirigir la traducción de un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótidos presente en el vector de expresión.

El término "ligado operativamente" como se usa en la presente se refiere a un posicionamiento de componentes tal que funcionen en su manera pretendida.

Los aminoácidos son referidos en la presente usando sus códigos estándar de tres o una letra:

Composiciones del Dominio de Unión a Albúmina

La presente invención proporciona un dominio de unión a albúmina sintético (ABDCon) (SEQ ID NO: 21) y variantes del mismo. El ABDCon puede ligarse operativamente a un agente bioactivo para mejorar la vida media en suero y biodistribución del agente terapéutico. El ABDCon y las variantes del mismo se pueden expresar a niveles elevados en *E. coli*, son solubles y tienen alta estabilidad térmica. La presente invención proporciona polinucleótidos que codifican ABDCon y variantes del mismo, ácidos nucleicos complementarios, vectores, células huésped, y métodos para elaborarlos y usarlos.

La presente invención proporciona además dominio de unión a albúmina sintético (ABDCon) que tiene una extensión de 5 aminoácidos en el extremo N-terminal. La extensión mejora la estabilidad de ABDCon.

El dominio de unión de ABDCon se diseñó calculando una secuencia de aminoácidos de consenso de ciertas secuencias de dominio de unión a albúmina (ABD) de haz de 3 hélices depositadas en la base de datos de proteínas no redundante usando ABD de *Streptococcus* sp. Proteína G G148 (SEQ ID NO: 1) como una plantilla, y seleccionando el aminoácido más prevalente en cada posición de la secuencia (Tabla 6). El ABDCon tiene una alta afinidad por la albúmina humana con un K_D de 75 pM y K_{off} de 3.02×10^{-5} 1/s cuando se prueba con las condiciones especificadas en la presente y, por lo tanto, los agentes bioactivos ligados operativamente a ABDCon pueden unirse en gran medida a la albúmina una vez administrados a un paciente animal. En un paciente humano, las moléculas que se unen demasiado débilmente a la albúmina sérica tendrán una vida media en suero corta debido al filtrado renal (Hopp et al., *Protein Eng Des Sel* 23:827-834, 2010), mientras que las moléculas que unen a la albúmina sérica con demasiada fuerza no se liberarán de la albúmina en el sitio de acción preferido y, por tanto en algunos casos pueden tener una capacidad reducida para modular la actividad del objetivo deseado y proporcionar un beneficio terapéutico. Es, por lo tanto, un aspecto de la invención tener y ser capaz de generar variantes de ABDCon y dominios de unión que tengan un espectro de afinidades para la albúmina y proporcionen por lo tanto la capacidad de modular la vida media del agente bioactivo ligado operativamente a variantes de ABDCon y dominios de unión.

Una realización de la invención es un dominio de unión a albúmina aislado no natural que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO: 21 (ABDCon): LKEAKEKAIEELKKAGITSDYYFDLINKAKTVEGVNALKDEILKA.

Otra realización de la invención es un dominio de unión a albúmina aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 que tiene sustituciones en 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 residuos.

Las variantes de ABDCon pueden diseñarse examinando la estructura cristalina de una proteína de unión a albúmina de haz de 3 hélices ejemplar en complejo con albúmina y asumiendo que el ABDCon puede unirse a la albúmina de una manera similar a la proteína ejemplar. Una estructura cristalina ejemplar que se puede utilizar es la de un módulo GA (módulo de unión a albúmina relacionado con la proteína G) de la proteína PAB de una bacteria anaeróbica *Fingoldia magna* (anteriormente *Peptostreptococcus magnus*) en complejo con albúmina humana (Protein Data Base (PDB) código 1TF0 (Leion et al., *J Biol Chem* 279:42924-42928, 2004).

Las variantes de ABDCon que tienen afinidad disminuida para la albúmina se pueden diseñar mediante varias estrategias, como alterando los contactos hidrófobos previstos, interrumpiendo el apilamiento pi previsto entre residuos aromáticos, introduciendo choques estéricos por sustitución con aminoácidos más grandes, alterando los

puentes de sales mediante eliminación de residuos cargados, y alterando los enlaces de hidrógeno que se ha previsto que se producirán entre ABDCon y la albúmina. Los cambios introducidos están diseñados para disminuir la afinidad de unión sin cambiar la superficie de unión de una manera que eliminaría la unión. Por ejemplo, el residuo Y21 puede sustituirse por aminoácidos cargados (Lys, Arg, Asp, Glu) o aminoácidos más pequeños (Ala, Gly) para reducir las interacciones hidrófobas entre este residuo y los residuos de albúmina V325 y F326. Además, Y21 de ABDCon forma un enlace de hidrógeno con el esqueleto de los residuos de albúmina N318 y D324 de tal manera que los cambios menores, como la mutación a Phe, pueden debilitar ligeramente las interacciones. Se prevé que el residuo Y22 de ABDCon forme interacciones hidrófobas así como apilamiento π con los residuos de albúmina F309 y F326. Por lo tanto la sustitución de Y22 por aminoácidos neutros más pequeños Ala, Ser, Val o aminoácidos cargados Lys, Arg, Asp, o Glu puede disminuir los contactos hidrófobos y la afinidad reducida de la variante ABDCon con la albúmina. Se prevé que el residuo K30 en ABDCon formará un puente de sal con el residuo de albúmina E227 y por tanto K30 puede sustituirse por Asp o Glu para introducir cargas repulsivas y reducir potencialmente la afinidad de ABDCon con la albúmina. La mutación a cualquier aminoácido no cargado también puede reducir la afinidad eliminando el puente de sal. Se prevé que el residuo T31 de ABDCon forme un enlace de hidrógeno intermolecular con el residuo de albúmina N267 y las sustituciones por Ala o Gly pueden usarse para alterar el enlace de hidrógeno intermolecular sin introducir un choque estérico grande que podría desestabilizar significativamente la interacción. El residuo A37 de ABDCon se puede sustituir por Val, Tyr, u otro aminoácido más grande para introducir choques estéricos. El residuo E41 se puede sustituir por Gln o Asn para eliminar la carga. Puede esperarse que la introducción de residuos cargados positivamente como Lys o Arg reduzca más la afinidad de unión. Se prevé que los residuos de ABDCon L25, E33, G34, L38, 142, y A45 formen contacto directo con la albúmina, y las sustituciones en estos residuos pueden modular probablemente la afinidad de ABDCon con la albúmina. Las posiciones de residuos se refieren a ABDCon de la SEQ ID NO: 21 y albúmina humana de la SEQ ID NO: 36.

Alternativamente, se puede usar un cóctel aleatorio de aminoácidos, utilizando por ejemplo codones NNK para sustituciones en posiciones identificadas, y las variantes resultantes se miden por su unión a albúmina usando métodos estándar y métodos descritos en la presente.

Variantes de ABDCon ejemplares son variantes que tienen sustituciones en por lo menos un residuo seleccionado de Y21, Y22, L25, K30, T31, E33, G34, A37, L38, E41, I42 y A45 de la SEQ ID NO: 21.

Variantes de ABDCon ejemplares son variantes que tienen sustituciones en por lo menos un residuo seleccionado de Y21, Y22, K30, T31, A37 y E41 de la SEQ ID NO: 21.

Una variante de ABDCon ejemplar comprende una secuencia de aminoácidos KEAKEKAIEELKKAGITSDX₁X₂FDLINKAX₃X₄VEGVNX₅LKDX₆ILKA (SEQ ID NO: 22; en donde X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, y X₆, pueden ser cualquier aminoácido.

En otras realizaciones, una variante de ABDCon ejemplar comprende la secuencia de aminoácidos LKEAKEKAIEELKKAGITSDX₁X₂FDLINKAX₃X₄VEGVNX₅LKDX₆ILKA (SEQ ID NO: 23), en la que

- i) X₁ es lisina (K), arginina (R), aspartato (D), glutamato (E), alanina (A), glicina (G), fenilalanina (F) o tirosina (Y);
- ii) X₂ es alanina (A), serina (S), valina (V), lisina (K), arginina (R), aspartato (D), glutamato (E) o tirosina (Y);
- iii) X₃ es aspartato (D), glutamato (E) o lisina (K);
- iv) X₄ es alanina (A), glicina (G) o treonina (T);
- v) X₅ es valina (V), tirosina (Y) o alanina (A); y
- vi) X₆ es glutamina (Q), asparagina (N), lisina (K), arginina (R) o glutamato (E).

En otras realizaciones, una variante de ABDCon ejemplar comprende la secuencia de aminoácidos LKEAKEKAIEELKKAGITSDX₁X₂FDLINKAX₃X₄VEGVNX₅LKDX₆ILKA (SEQ ID NO: 24), en la que

- i) X₁ es lisina (K), alanina (A) o tirosina (Y);
- ii) X₂ es alanina (A), serina (S), valina (V) o tirosina (Y);
- iii) X₃ es aspartato (D) o lisina (K);
- iv) X₄ es alanina (A) o treonina (T);
- v) X₅ es valina (V), tirosina (Y) o alanina (A); y
- vi) X₆ es glutamina (Q) o glutamato (E).

Variantes de ABDCon ejemplares adicionales comprenden las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NO: 25-34. Las variantes de ABDCon se prueban para la unión a albúmina usando métodos bien conocidos, por ejemplo, en un ensayo in vitro usando resonancia de plasmones ((BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Suecia). La afinidad medida de una interacción de variante de ABDCon /albúmina particular puede variar si se mide bajo diferentes condiciones (por ejemplo, osmolaridad, pH). Por tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión (por ejemplo, K_D, K_{on}, K_{off}) se hacen preferiblemente con soluciones estandarizadas de la variante de ABDCon y albúmina, y un tampón estandarizado, como el tampón descrito en la presente. La afinidad de las

variantes de ABDCon para albúmina puede variar desde por lo menos aproximadamente 1×10^{-5} M, por lo menos aproximadamente 1×10^{-6} M, por lo menos aproximadamente 1×10^{-7} M, por lo menos aproximadamente 1×10^{-8} M, por lo menos aproximadamente 1×10^{-9} M, por lo menos aproximadamente 1×10^{-10} M, por lo menos aproximadamente 1×10^{-11} M, por lo menos aproximadamente 1×10^{-12} M, o por lo menos aproximadamente 1×10^{-13} M. Por ejemplo, varias sustituciones en Y22 de ABDCon (SEQ ID NO: 21) redujeron la afinidad de las variantes para la albúmina alrededor de 300-1.000 veces dependiendo de una sustitución (Tabla 4). Los expertos en la técnica pueden diseñar y generar variantes adicionales que tienen sustituciones en posiciones definidas o en combinaciones de posiciones y se prueban para una afinidad de unión a albúmina deseada usando métodos rutinarios.

El ABDCon y sus variantes pueden modificarse adicionalmente mediante la adición de una extensión de 6 aminoácidos al extremo N-terminal de ABDCon o la variante de ABDCon. La extensión de 6 aminoácidos puede consistir de una secuencia de aminoácidos TIDEWL (SEQ ID NO: 43), o cualquier secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 42 o 45-55. La incorporación de la extensión de 6 aminoácidos N-terminales en el ABDCon y variantes del mismo puede aumentar la estabilidad de la molécula. La extensión de 6 aminoácidos N-terminales puede ordenarse estructuralmente como parte de la primera hélice alfa de ABDCon y sus variantes. La estabilidad mejorada de las moléculas extendidas N-terminalmente puede por lo tanto dar como resultado la estabilización de la estructura general de la hélice. Las variantes ABDCon N-terminales pueden elaborarse usando métodos estándar y su estabilidad, por ejemplo estabilidad térmica, evaluarse como se describe en la presente. Cualquier dominio de unión a albúmina (ABD) puede modificarse con la adición de los 6 aminoácidos N-terminales para estabilizar la estructura de ABD y mejorar la estabilidad, como la estabilidad térmica de la molécula resultante.

El ABDCon y las variantes del mismo pueden modificarse adicionalmente en residuos que no afectan a la unión a la albúmina con el propósito de, por ejemplo, mejorar la estabilidad, reducir la inmunogenicidad, mejorar la solubilidad o cualquier otra característica adecuada. En una forma de lograr este objetivo, el ABDCon y las variantes del mismo pueden prepararse opcionalmente mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos diseñados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y diseñadas. Los modelos tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias candidatas seleccionadas y que pueden medir la inmunogenicidad posible (por ejemplo, el programa Immunofilter de Xencor, Inc. de Monrovia, CA). La inspección de estas pantallas permite el análisis del posible papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia candidata, por ejemplo, los residuos que influyen en la estabilidad del dominio ABDCon. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse residuos a partir de las secuencias inicial y de referencia para alcanzar las características deseadas, como una estabilidad mejorada. Alternativamente, o adicionalmente a los procedimientos anteriores, pueden usarse otros métodos de diseño adecuados como se conocen en la técnica.

Las propiedades físicas deseables de los dominios de unión a albúmina de la invención incluyen alta estabilidad térmica y reversibilidad del pliegue y despliegue térmico. Se han aplicado varios métodos para aumentar la estabilidad térmica aparente de proteínas y enzimas, incluyendo el diseño racional basado en la comparación con secuencias termoestables muy similares, diseño de puentes disulfuro estabilizadores, mutaciones para aumentar la propensión a la hélice alfa, diseño de puentes de sal, alteración de la carga superficial de la proteína, evolución dirigida, y composición de secuencias de consenso ((Lehmann and Wyss, Curr Opin Biotechnol 12:371-375, 2001). La alta estabilidad térmica puede aumentar el rendimiento de la proteína expresada, mejorar la solubilidad o la actividad, disminuir la inmunogenicidad y minimizar la necesidad de una cadena de frío en la fabricación.

Los residuos que pueden sustituirse para mejorar cualquier característica de los dominios de unión a albúmina de la invención pueden determinarse haciendo la sustitución y ensayando las características deseadas del dominio de unión a albúmina. Por ejemplo, puede emplearse exploración con alanina para identificar posiciones en el ABDCon y variantes del mismo que puedan afectar a la estabilidad del dominio de unión a albúmina.

En términos de pérdida de estabilidad, es decir, "desnaturalizar" o "desnaturalización" de una proteína, se entiende el proceso en el que algunas o todas las conformaciones tridimensionales que imparten las propiedades funcionales de la proteína se han perdido con la consiguiente pérdida de actividad y/o solubilidad. Las fuerzas alteradas durante la desnaturalización incluyen enlaces intramoleculares, por ejemplo, fuerzas electrostáticas, hidrófobas, de Van der Waals, enlaces de hidrógeno y disulfuros. La desnaturalización de proteínas puede estar provocada por fuerzas aplicadas a la proteína o una solución que comprende la proteína, como fuerza mecánica (por ejemplo, fuerza de compresión o cizallamiento), estrés térmico, osmótico, cambio en el pH, campos eléctricos o magnéticos, radiación ionizante, radiación ultravioleta y deshidratación, y por desnaturalizantes químicos.

La medición de la estabilidad de la proteína y la labilidad de la proteína se puede ver como los mismos o diferentes aspectos de la integridad de la proteína. Las proteínas son sensibles o "lábil" a la desnaturalización provocada por calor, por radiación ultravioleta o ionizante, cambios en la osmolaridad ambiental y pH si está en solución líquida, fuerza de cizallamiento mecánica impuesta por filtración por tamaño de poro pequeño, radiación ultravioleta, radiación ionizante, como por radiación gamma, deshidratación química o por calor, o cualquier otra acción o fuerza que pueda provocar la alteración de la estructura de la proteína. La estabilidad de la molécula se

puede determinar usando métodos estándar. Por ejemplo, la estabilidad de una molécula puede determinarse midiendo la temperatura de fusión térmica (T_m), la temperatura en ° Celsius (°C) a la que la mitad de las moléculas se despliegan, usando métodos estándar. Típicamente, cuanto mayor sea T_m , más estable será la molécula. Además del calor, el entorno químico también cambia la capacidad de la proteína para mantener una estructura tridimensional particular.

La desnaturalización química puede medirse de igual manera mediante una variedad de métodos. Los desnaturalizantes químicos incluyen hidrócloruro de guanidinio, tiocianato de guanidinio, urea, acetona, solventes orgánicos (DMF, benceno, acetonitrilo), sales (sulfato de amonio bromuro de litio, cloruro de litio, bromuro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de sodio); agentes reductores (por ejemplo, ditiotreitól, beta-mercaptoetanol, dinitrotiobenceno e hidruros, como borohidruro de sodio), detergentes no iónicos e iónicos, ácidos (por ejemplo, ácido clorhídrico (HCl), ácido acético (CH_3COOH), ácidos acéticos halogenados), moléculas hidrófobas (por ejemplo fosfolípidos) y desnaturalizantes selectivos. La cuantificación de la extensión de la desnaturalización puede basarse en la pérdida de una propiedad funcional, como la capacidad de unirse a una molécula objetivo, o por propiedades fisicoquímicas, como tendencia a la agregación, exposición de residuos anteriormente inaccesibles por solventes o alteración o formación de enlaces disulfuro.

El dominio de unión ABDCon y variantes del mismo pueden estar ligados operativamente a un agente bioactivo. Los agentes bioactivos ejemplares son péptidos y proteínas que se pueden ligar operativamente a ABDCon y variantes del mismo usando conectores bien conocidos, por ejemplo un conector que contiene poliglicina, glicina y serina (conector Gly-Ser) o alanina y prolina. El uso de conectores de péptidos de origen natural así como artificiales es bien conocido en la bibliografía (Hallewell et al., *J Biol Chem* 264:5260-5268, 1989; Alfthan et al., *Protein Eng.* 8:725-731, 1995; Robinson & Sauer, *Biochemistry* 35:109-116, 1996; Patente U.S. N° 5.856.456). El agente bioactivo se puede ligar a ABDCon o a una variante del mismo desde su extremo C- o N-terminal. Los agentes bioactivos multiespecíficos también pueden ligarse a ABDCon. En estos casos, el ABDCon puede estar ligado al extremo N-terminal o C-terminal de la molécula. El ABDCon también puede posicionarse internamente en dicho agente multiespecífico de tal manera que esté ligado unido al extremo C-terminal de un agente y al extremo N-terminal de otro. Los agentes bioactivos también pueden acoplarse a los dominios de unión a albúmina de la invención usando reticulación química bien conocida en la técnica, por ejemplo, utilizando ligamiento con hidrazona o semicarbazona. Los ejemplos de agentes bioactivos son proteínas que se unen específicamente a un antígeno objetivo como proteínas identificadas a partir de bibliotecas de proteínas de repetición de fibronectina tipo III (FN3), como bibliotecas basadas en Tencon25 descritas en la WO2011/137319A2 y la WO2010/093627A2.

Pueden incorporarse fracciones adicionales en ABDCon o variantes del mismo de la invención, como conjugados de toxinas, moléculas de polietilenglicol (PEG), como PEG5000 o PEG20,000, ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos de diferentes longitudes de cadena, por ejemplo laurato, miristato, estearato, araquidato, behenato, oleato, araquidonato, ácido octanedioico, ácido tetradecanodioico, ácido octadecanodioico, ácido docosanodioico, y similares, polilisina, octano, carbohidratos (dextrano, celulosa, oligo- o polisacáridos) para las propiedades deseadas. Estas fracciones pueden ser fusiones directas con las secuencias de codificación de ABDCon y pueden generarse mediante técnicas de clonación y expresión estándar. Alternativamente, se pueden usar métodos de acoplamiento químico bien conocidos para unir las fracciones al ABDCon producido recombinantemente de la invención.

El ABDCon y las variantes del mismo, así como las proteínas de fusión de los agentes bioactivos y ABDCon pueden evaluarse para su vida media usando propiedades farmacocinéticas bien conocidas en modelos in vivo. El ABDCon y las variantes del mismo se unen a la albúmina con una K_D de aproximadamente entre 1 pM - 1 µM, entre 75 pM - 860 nM, entre 100 pM - 500 nM, o entre 1 nM - 100 nM.

Generación y Producción de ABDCon y variantes del mismo

La generación de los dominios de unión a la albúmina de la invención se logra típicamente a nivel de ácido nucleico usando métodos estándar. Las variantes de ABDCon que tienen codones sustituidos en uno o más residuos específicos pueden sintetizarse, por ejemplo, usando métodos de clonación por PCR estándar, o síntesis de genes química de acuerdo con los métodos descritos en las Patente U.S. N° 6.521.427 y la Patente U.S. N° 6.670.127, o usando mutagénesis de Kunkel (Kunkel et al., *Methods Enzymol* 154:367-382, 1987). Si se van a usar codones aleatorizados para cualquier posición de residuo, la aleatorización puede lograrse usando métodos bien conocidos, por ejemplo oligonucleótidos degenerados que coinciden con la diversidad diseñada, o por ejemplo usando codones NNK, que codifican los 20 aminoácidos de origen natural. En otros esquemas de diversificación, pueden usarse codones DVK para codificar los aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly, y Cys. Alternativamente, pueden usarse codones NNS para dar lugar a los 20 residuos de aminoácidos y reducir simultáneamente la frecuencia de los codones de parada. Las designaciones de codones están de acuerdo con el código IUB bien conocido.

La síntesis de oligonucleótidos con "degeneración" de nucleótidos seleccionada en ciertas posiciones es bien conocida en esa técnica, por ejemplo, el enfoque TRIM (et al., *J Mol Biol* 296:57-86, 1999; Garrard & Henner,

Gene 128:103-109, 1993). Tales conjuntos de nucleótidos que tienen ciertos conjuntos de codones pueden sintetizarse usando reactivos y aparatos de nucleótidos o nucleósidos comercialmente disponibles.

Las técnicas clásicas de clonación y expresión estándar se usan para clonar ABDCon o variantes del mismo en un vector o sintetizar ADNc de cadena doble de ABDCon para expresar, o traducir la proteína in vitro. Los agentes bioactivos pueden ligarse operativamente a ABDCon o variantes del mismo usando métodos bien conocidos.

Moléculas y Vectores de Ácidos Nucleicos

La invención proporciona ácidos nucleicos que codifican ABDCon o variantes del mismo de la invención como polinucleótidos aislados o como porciones de vectores de expresión o como porciones de secuencias de ADN lineales, incluyendo secuencias de ADN lineales usadas para transcripción/traducción in vitro, vectores compatibles con la expresión, secreción y/o presentación de fagos procariotas, eucariotas o filamentosos de las composiciones. En la presente se divulgan ciertos polinucleótidos ejemplares, sin embargo, otros polinucleótidos que, dada la degeneración del código genético o las preferencias de codones en un sistema de expresión dado, codifican ABDCon o variantes del mismo de la invención también están dentro del alcance de la invención.

Los polinucleótidos de la invención pueden producirse mediante síntesis química, como síntesis de polinucleótidos en fase sólida en un sintetizador de polinucleótidos automatizado y ensamblarse en moléculas de cadena sencilla o doble completas. Alternativamente, los polinucleótidos de la invención pueden producirse mediante otras técnicas, como PCR seguida de clonación rutinaria. Las técnicas para producir u obtener polinucleótidos a partir de una secuencia conocida dada son bien conocidas en la técnica.

Los polinucleótidos de la invención pueden comprender por lo menos una secuencia no codificante, como una secuencia promotora o potenciadora, intrón, señal de poliadenilación y similares. Las secuencias de polinucleótidos también pueden comprender secuencias adicionales que codifican aminoácidos adicionales que codifican por ejemplo un marcador o una secuencia etiqueta como una hexa-histidina o una etiqueta HA para facilitar la purificación o detección de la proteína, una secuencia señal, un socio de proteína de fusión, como ADNc que codifica un agente bioactivo, y similares.

Un polinucleótido ejemplar comprende las secuencias que codifican ABDCon, secuencias para un sitio de unión a ribosoma, secuencia promotora, secuencia terminadora, gen de resistencia a antibióticos, y un origen de replicación bacteriano (ori). Los polinucleótidos ejemplares que codifican los dominios de unión a albúmina de la invención se muestran en la SEQ ID NO: 35.

Otra realización de la invención es un vector que comprende por lo menos un polinucleótido de la invención. Tales vectores pueden ser vectores plasmídicos, vectores virales, vectores para la expresión de baculovirus, vectores basados en transposones o cualquier otro vector adecuado para la introducción de los polinucleótidos de la invención en un organismo o fondo genético dado por cualquier medio. Tales vectores pueden ser vectores de expresión que comprenden elementos de secuencias de ácidos nucleicos que pueden controlar, regular, provocar o permitir la expresión de un polipéptido codificado por dicho vector. Tales elementos pueden comprender sitios de unión potenciadores transcripcionales, sitios de iniciación de ARN polimerasa, sitios de unión a ribosomas, y otros sitios que facilitan la expresión de polipéptidos codificados en un sistema de expresión dado. Tales sistemas de expresión pueden ser sistemas basados en células o sistemas libres de células bien conocidos en la técnica.

Selección de la Célula Huésped o Diseño de la Célula Huésped

El ABDCon y las variantes del mismo de la presente invención pueden producirse opcionalmente mediante una línea celular, una línea celular mixta, una célula inmortalizada o una población clonal de células inmortalizadas, como es bien conocido en la técnica. Ver, por ejemplo, Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow y Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

La célula huésped elegida para la expresión puede ser de origen mamífero o puede seleccionarse de COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, HeLa, mieloma, linfoma, levadura, células de insectos o de plantas, o cualquier célula derivada, inmortalizada o transformada de las mismas. Alternativamente, la célula huésped puede seleccionarse de una especie u organismo incapaz de glicosilar polipéptidos, por ejemplo, una célula u organismo procariota, como BL21, BL21(DE3), BL21-GOLD(DE3), XL1-Blue, JM109, HMS174, HMS174(DE3), y cualquiera de las cepas de E. coli spp, Klebsiella spp., o Pseudomonas spp. de origen natural o diseñadas

Usos de dominios de unión a albúmina de la invención

Las composiciones del dominio de unión a albúmina no natural ABDCon y las variantes del mismo de la invención pueden usarse para modular la vida media y/o la biodistribución de un agente bioactivo dentro del tejido de un animal ligando operativamente el ABDCon y el agente bioactivo, y en donde la administración de la composición a un animal da como resultado una vida media y/o biodistribución del agente bioactivo que es diferente de la distribución del tejido obtenida tras la administración del agente activo solo.

Composiciones farmacéuticas que comprenden ABDCon o variantes del mismo

El ABDCon o las variantes del mismo que se unen ligados operativamente a agentes bioactivos pueden aislarse usando procedimientos de separación bien conocidos en la técnica para la captura, inmovilización, división o sedimentación, y purificarse en la medida necesaria para su aplicabilidad comercial.

Para uso terapéutico, las proteínas de fusión de molécula bioactiva-ABDCon pueden prepararse como composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad eficaz de la proteína de fusión agente bioactivo-ABDCon como un ingrediente activo en un portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto activo. Tales vehículos pueden ser líquidos, como agua y aceites, incluidos de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Por ejemplo, se puede usar un 0,4% de solución salina y un 0,3% de glicina. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de material particulado. Se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas (por ejemplo, filtración). Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea requerido para aproximar condiciones fisiológicas como agentes de ajuste del pH y de tamponamiento, agentes estabilizadores, espesantes, lubricantes y colorantes, etc. La concentración de la proteína de fusión agente bioactivo-ABDCon en dicha formulación farmacéutica puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente el 0,5%, habitualmente a o por lo menos aproximadamente el 1% a tanto como el 15 o el 20% en peso y se seleccionará principalmente en base a la dosis requerida, volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado. Los vehículos y formulaciones adecuados se describen, por ejemplo, en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edición, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams y Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Parte 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, Ver especialmente pp. 958-989.

El modo de administración para el uso terapéutico de la proteína de fusión agente bioactivo-ABDCon puede ser cualquier vía adecuada que administre el agente al huésped, como administración parenteral, por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea, pulmonar; transmucosa (oral, intranasal, intravaginal, rectal); usando una formulación en un comprimido, cápsula, solución, suspensión, polvo, gel, partícula; y contenida en una jeringuilla, un dispositivo implantado, bomba osmótica, cartucho, microbomba; u otros medios apreciados por el experto en la técnica, como es bien sabido en la técnica. La administración específica del sitio puede lograrse, por ejemplo, por administración intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelular, intracerebelosa, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intracardíaca, intraósea, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniana, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravascular, intravesical, intralesional, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmica.

Aunque se ha descrito la invención en términos generales, las realizaciones de la invención se divulgarán adicionalmente en los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitativos del alcance de las reivindicaciones.

EJEMPLO 1. Generación de dominio de unión a albúmina no natural Diseño del consenso del dominio de unión a albúmina no natural (ABDCon)

Se diseñó un dominio de unión a albúmina no natural (ABD) calculando una secuencia de aminoácidos de consenso de las secuencias de ABD de haz de 3 hélices depositadas en la base de datos de proteínas no redundante. Para determinar la secuencia de consenso, se usó como secuencia plantilla la ABD de la proteína G G148 de *Streptococcus* sp. (SEQID NO: 1) para una búsqueda BLAST contra la base de datos de proteínas NCBI no redundante (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se usaron todas las configuraciones predeterminadas para la búsqueda BLAST; Umbral esperado = 10, tamaño de palabra = 3, matriz = BLOSUM62, costes de espacios = existencia 11, extensión 1 y ajustes de composición = ajuste de matriz de puntuación composicional condicional. A partir de esta búsqueda, se seleccionaron los 20 dominios de proteína más estrechamente relacionados, enumerados en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1-20), para incluirlos en una alineación de secuencia múltiple para determinar un consenso. Solo se seleccionaron secuencias no redundantes. En la Tabla 1 se enumeran múltiples veces varios números de acceso de proteínas, lo que indica que algunas proteínas contienen varios dominios de ABD estrechamente relacionados. La SEQ ID NO: 4 es un ABD no natural derivado por presentación de fagos y transposición de genes. (He et al., Protein Sci 16:1490-1494, 2007).

Tabla 1

Número de Acceso del Dominio de Proteína	SEQ ID NO:
P19909	1
AAA26847	2
AAA26847	3
2FS1_A	4
YP_002123072	5
ZP_07321229	6
ZP_07321229	7
AAA67503	8
AAA67503	9
AAA67503	10
AAA67503	11
ZP_07734934	12
ZP_06946534	13
ZP_07321240	14
ZP_07906833	15
Q51911	16
YP_001692809	17
ZP_07702676	18
ZP_07702676	19
ZP_07268895	20

Se generó una alineación de múltiples secuencias a partir de las secuencias enumeradas usando software AlignX (usando todas las configuraciones predeterminadas). La alineación de secuencias mostrada en la Tabla 6 se usó para seleccionar el aminoácido más prevalente en cada posición de secuencia para derivar la secuencia de consenso del dominio de unión a albúmina, ABDCon (SEQ ID NO: 21, Tabla 6). Se eligió Tyr en lugar de Ile para la posición 21 ya que no había un consenso claro para esta posición y los residuos aromáticos Tyr y Phe estaban bien representados. Identidades de secuencias por parejas entre el intervalo de ABDCon del 45% (SEQID NO: 3) a 82% (SEQID NO: 8, 13, 14, y 16).

Síntesis génica

La secuencia de aminoácidos de consenso del dominio de unión a albúmina (ABDCon) se tradujo de vuelta a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica ABDCon utilizando codones preferidos para la expresión de E. coli como se indica a continuación (SEQID NO: 35) y un gen sintético producido (BlueHeron Biotechnologies). Se añadieron las secuencias de ADN 5' y 3' a la secuencia del gen sintético de la SEQ ID NO: 34 para añadir sitios NdeI y XhoI para la subclonación, así como secuencias de ADN que codifican una etiqueta 8-His N-terminal para la purificación de proteínas. Este gen se clonó en un vector pET26 (Novagen) para la expresión dirigida por una secuencia promotora T7 y se transformó en la cepa BL21 (DE3) de E. coli (Novagen).

Expresión y Purificación

Para la expresión de ABDcon, se inocularon 50 ml de medio LB suplementado con 30 µg/ml de kanamicina con 1 colonia y se cultivó durante toda la noche a 37° C, 220 rpm de agitación. Al día siguiente, se añadieron 10 ml del cultivo durante la noche a 100 ml de Terrific Broth suplementado con 30 µg/ml de kanamicina y el cultivo se hizo crecer a 37° C, a 220 rpm durante 2,5 horas. Se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y la temperatura se redujo a 30° C para inducir la expresión de proteínas. Las células se recogieron 14 horas después por centrifugación a 4000 X g durante 20 minutos y los sedimentos celulares se almacenaron a -20° C. Los sedimentos celulares congelados se resuspendieron en 5 ml de BugBuster HT (Novagen) por gramo de sedimento húmedo y se

mezclaron suavemente a temperatura ambiente durante 30 minutos. La molécula de ABDCon etiquetada con polihistidina se purificó por cromatografía en Ni-NTA (GE Healthcare), eluyendo en un tampón de fosfato sódico 50 mM pH 7,4, cloruro sódico 500 mM con un gradiente de imidazol 10-250 mM. Las fracciones que contenían ABDCon se agruparon y se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex75 16/60 (GE Healthcare) con una fase móvil de PBS. La pureza se evaluó mediante análisis SDS-PAGE (Figura 1). La espectrometría de masas determinó que la masa era de 6383 Da, de acuerdo con la masa teórica de 6382 Da (Figura 2). La cromatografía de exclusión por tamaño analítica usando una columna Superdex 75 5/150 (GE Healthcare) muestra que la preparación de ABDCon está libre de agregados y eluye en un tiempo consistente con una proteína monomérica (Figura 3).

EJEMPLO 2. Caracterización de ABDCon

Estabilidad Térmica de ABDCon

El ABDCon se concentró a 2,175 mg/ml en PBS pH 7,4 y se evaluó la estabilidad térmica mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC). Los datos de estabilidad se generaron calentando 400 µl de la solución de ABDCon de 25° C a 100° C a una velocidad de barrido de 1° C por minuto en un instrumento VP-DSC (MicroCal). Se completó un segundo barrido idéntico en la muestra para evaluar la reversibilidad del plegado/desplegado térmico. Los datos se ajustaron a un modelo de despliegue de 2 estados para calcular la temperatura de fusión. La Figura 4 muestra que ABDCon tiene una alta estabilidad térmica de 81,5° C en PBS y que el plegado es completamente reversible.

Unión de ABDCon a Albúmina

Se midieron las cinéticas de unión de ABDCon a albúmina de suero humano y albúmina de suero de ratón se midió en un Sistema de Matriz de Interacción de Proteínas ProteOn™ XPR-36 (Bio-Rad) usando chips de detección GLC. Las albúminas de suero humana (SEQ ID NO: 36), Rhesus (SEQ ID NO: 37) y murina (SEQ ID NO: 38) se adquirieron de Sigma (Catálogo N° A4327 para humanos, N° A3559 para murino, y N° A4297 para rhesus) y se resuspendieron en PBS a diferentes concentraciones. Cada albúmina de suero se inmovilizó directamente en un canal de ligando en la orientación vertical de un chip GLC mediante acoplamiento de aminas estándar a 2,1 µg/ml a pH 5,0 para obtener superficies con densidades de ligandos de 500-1000 unidades de resonancia. La unión del ABDCon recombinante se probó mediante el flujo de cinco concentraciones diferentes (por ejemplo, 1 µM diluido en una serie de concentración de 3 veces) como analitos simultáneamente en la orientación horizontal sobre las superficies de albúmina de suero inmovilizadas. Las fases de disociación para todas las concentraciones se monitorizaron durante dos horas a un caudal de 100 µl/min usando PBST (PBS, 0,005% de Tween20) como tampón de ejecución. Se inyectó una sexta muestra (solo tampón) para monitorizar la estabilidad del valor inicial. Las superficies se regeneraron usando 1 pulso corto (18 µl) de 0,8% de ácido fosfórico.

Tabla 2.

Albúmina	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
Humana	4.04E+05	3.02E-05	7.48E-11
Ratón	2.41E+05	7.76E-04	3.22E-09
Rhesus	1.13E+06	6.78E-05	6.01 E-11

Los datos de respuesta sin procesar se procesaron primero restando las respuestas de sólo tampón y la unión no específica entre los analitos y el chip. Los datos procesados de las cinco concentraciones se ajustaron globalmente a un modelo de unión langmuir simple 1:1 para cada superficie del ligando. La Tabla 2 describe la cinética de unión determinada para cada especie de albúmina.

Vida media en suero de la fusión de ABDCon en ratones

Se evaluó la capacidad de ABDCon para extender la vida media en suero de una proteína de fusión produciendo un gen sintético que codifica una fusión de ABDCon con el extremo c-terminal de Tencon25. Tencon25 es un andamiaje de proteína basado en una secuencia consenso de una proteína de repetición de fibronectina tipo III (FN3) que tiene una secuencia que se muestra en los residuos 1-90 de la SEQ ID NO: 39, y se describe en la US2011/0274623A1. Los dominios de proteína Tencon25 y ABDCon se fusionaron mediante un conector peptídico

(G₄S)₂ (SEQ ID NO: 40). La proteína de fusión resultante tiene una secuencia polipeptídica mostrada en la SEQ ID NO: 39. Se incorporó una etiqueta de poli-histidina en el extremo C-terminal con propósitos de purificación. Se dividieron sesenta y nueve ratones hembra BALB/c en 3 grupos (N= grupo 1 control no tratado, y N=33 grupos 2-3). Los ratones se trataron con una única dosis intravenosa de la proteína de fusión Tencon25-ABDCon a 2 mg/kg. La dosificación se basó en el peso de los animales el día de la administración. Los ratones fueron sacrificados en los siguientes puntos temporales después de la inyección: 10 minutos, 30 minutos, 1, 4, 6 horas, y 1, 2, 3, 7, 10, 14 días. Se tomaron muestras de sangre de cada animal mediante punción cardíaca. Se permitió que las muestras de sangre coagulasen a temperatura ambiente durante 30 minutos, pero no más de 1 hora. Las muestras de sangre se centrifugaron luego a aproximadamente 3.500 rpm durante 15 minutos. Las muestras de suero se analizaron usando un ELISA tipo sándwich homogéneo en la plataforma Mesoscale Discovery. Las placas de Estreptavidina-Oro (Descubrimiento de Mesoescala) se bloquearon durante 1 hora con Superblock (TBS) Tween-20 (Thermo). Se usó anticuerpo anti-Tencon25 policlonal tanto para la captura (biotinilado) como para la detección (marcado con MSD Sulfo-Tag (Mesoscale Discovery)) a 0,625 µg/ml. Se añadieron el antígeno y los anticuerpos a las placas, que se incubaron durante 2 horas con agitación vigorosa a RT. Las placas se lavaron con TBS-T (Sigma) y se añadió Tampón de Lectura MSD con Surfactante (Mesoescala Discovery). Las placas se leyeron usando un MSD Sector Imager 6000. Los datos se analizaron usando GraphPad Prism. Los estudios previos han demostrado que una molécula de Tencon sin fusionar similar se depura del torrente sanguíneo rápidamente con una vida media en suero de aproximadamente 20 minutos en ratones. La fusión de Tencon25 con ABDCon extiende la vida media en suero a más de 60 horas (Figura 5).

EJEMPLO 3: Diseño de ABDCon para variar la afinidad para albúmina sérica

La afinidad de unión a la albúmina sérica puede dictar no solo la vida media en suero de una proteína terapéutica sino también la capacidad de esa molécula para unirse y neutralizar su objetivo. Por ejemplo, una molécula que se une demasiado débilmente a la albúmina sérica tendrá una vida media en suero corta debido a la filtración renal mientras no esté unida a la albúmina (Hopp et al., Protein Eng Des Sel 23:827-834, 2010). Por el contrario, una molécula que se une demasiado a la albúmina no se liberará de la albúmina en el sitio de acción preferido y, por tanto, puede ser incapaz de neutralizar el objetivo deseado en algunos casos. Por lo tanto, es preferible lograr la extensión de la vida media a través de la unión a la albúmina de manera que la interacción con la albúmina sea sólo lo suficientemente estrecha como para proporcionar la vida media en suero deseada. Como la secuencia de ABDCon descrita en la presente se une a la albúmina de suero humana con una afinidad de 75 pM y una velocidad de disociación de $3,02 \times 10^{15}$ 1/s (bajo condiciones experimentales descritas en la presente), las moléculas fusionadas con ABDCon se unirán en gran medida a la albúmina una vez administrada a un animal o paciente. Para algunos objetivos y fusiones, puede ser deseable unirse menos estrechamente a la albúmina sérica. Se diseñaron diez versiones mutantes de ABDCon para disminuir la afinidad de unión de ABDCon para la albúmina. La Tabla 3 resume estos mutantes:

Tabla 3.

Construido	Mutación*	SEQ ID NO:	Razón fundamental
ABDCon2	Y21A	25	Alterar el apilamiento aromático con residuos de albúmina F309 y F326
ABDCon3	Y21K	26	Alterar el apilamiento aromático con residuos de albúmina F309 y F326. Insertar choque estérico
ABDCon4	Y22A	27	Disminuir contactos hidrófobos
ABDCon5	Y22S	28	Disminuir contactos hidrófobos
ABDCon6	Y22V	29	D Disminuir contactos hidrófobos ligeramente
ABDCon7	E41Q	30	Eliminar carga para alterar el puente de sal
ABDCon8	K30D	31	Alterar carga para alterar el puente de sal
ABDCon9	T31A	32	Eliminar el enlace de hidrógeno intermolecular
ABDCon10	A37V	33	Introducir choque estérico
ABDCon11	A37Y	34	Introducir choque estérico
*Numeración de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 21			

Se seleccionaron mutantes de ABDCon examinando la estructura cristalina del módulo GA (módulo de unión a albúmina relacionado con proteína G) unida a albúmina en suero humana (PDB código 1TF0) (Lejon et al., Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 64:64-69, 2008) y suponiendo que ABDCon se une a la albúmina de manera muy similar a GA. Los mutantes se diseñaron para disminuir la afinidad de ABDCon para la albúmina

alterando los contactos hidrófobos, introduciendo choques estéricos, alterando los puentes de sal y alterando el enlace de hidrógeno (Tabla 3). Los cambios introducidos se diseñaron para disminuir la afinidad de unión sin cambiar la superficie de unión tan drásticamente que se anulase la unión. Cada mutante se expresó y se purificó a partir de *E. coli* como se describe para ABDCon. Se descubrió que el mutante ABDCon11 era insoluble y por tanto se excluyó de un análisis posterior. Las afinidades de cada variante para albúmina sérica humana, de ratón y rhesus se determinaron mediante resonancia de plasma superficial y se muestran en la Tabla 4. Además de las posiciones enumeradas en la Tabla 3, los residuos L25, E33, G34, L38, 142, y A45 pueden mutarse para aumentar o disminuir la afinidad de ABDCon para la albúmina ya que se prevé que formen contactos directos con la albúmina.

Tabla 4.

Variante	K_D Humano (nM)	K_D de ratón (nM)	K_D Rhesus (nM)
ABDCon2	6.1	ND	17.5
ABDCon3	1	103	5.1
ABDCon4	13.6	571	43.7
ABDCon5	54.8	1650	104
ABDCon6	2.7	190	8.4
ABDCon7	0.4	20.6	0.5
ABDCon8	43	1001.7	65
ABDCon9	860	550.8	206
ABDCon10	0.8	37.8	1.3

EJEMPLO 4: Vida media en suero de proteínas de fusión variantes de ABDCon

Se fusionaron Tencon24 (aminoácidos 1-90 de la SEQ ID NO: 39) con las variantes de ABDCon 3, 5, 7, y 9 (Tabla 3) para evaluar la correlación entre la afinidad de ABDCon para la albúmina con la extensión de la vida media. Estas moléculas se dosificaron en ratones a 2 mg/kg como se ha descrito con anterioridad en estudios previos y se analizaron usando métodos idénticos a los descritos para las fusiones Tencon25-ABDCon. Un resumen de los parámetros PK obtenidos para estas moléculas se muestra en la Tabla 5 y la Figura 6. Aquí se demuestra que la velocidad de depuración disminuye a medida que se aumenta la afinidad para la albúmina hasta alcanzar una afinidad de 103 nM, punto en el cual, no se obtuvieron grandes diferencias en los parámetros de PK. Los datos en la Tabla 5 demuestran la capacidad de ajustar propiedades tales como vida media, velocidad de depuración, y exposición total (AUC) variando la afinidad de la molécula de ABDCon para la albúmina.

Tabla 5.

Constructo	K_D (nM)	T(1/2) (horas)	Volumen de Distribución (ml/kg)	Depuración (ml/hr/kg)	AUC (hora*ng/ml)
Tencon25-ABDCon	1.86	60.42	83.2873	0.9555	2054332
Tencon25-ABDCon3	103	45.8355	60.645	0.915	2166461
Tencon25-ABDCon5	1650	32.8715	223.86	4.72	423635
Tencon25-ABDCon7	20.6	46.7499	49.915	0.74	2681641
Tencon25-ABDCon9	550.8	34.1956	81.87	1.66	1205061

Tabla 6.

SEQ ID	Secuencia
13	LKEAKEKAVEELKENGITSEKYIDQINKAKTVEGVNALKDEIIKA
14	LKEAKEKAVEELKNNGITSEKYIDQINKAKTVEGVNALKDEIIKA
17	LKEAKEKAVEELKNNGITSEKYIEQINKAKTVEGVNALKDEIIKA
20	LKEAKEKAIEELKNNGITSEKYIEQINKAKTVEGVNALKDEIIS
7	LKDAKEKAIEAIRKEGVKSKLYEDLINKAKTIDGVNALRDQIIKA
1	LAEAKVLANRELDKYGVS-DYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAA
2	LSEAKEMAIRELDAQGVS-DFYKNKINNAKTVEGVVALKDLILNS
3	LDQAKQAALKEFDYGVN-NYYKNLINKAKTVEGIMELQAQV--
12	LAEAKKVAHEEFTKAGITGKIFHDAIDAAKTVEGLKAYVAETLAA
15	LAEAKKVAHEEFTKAGITGKIFHDAIDAAKTVEGLQAYVAETLAA
18	LAEAKNVAHEEFTKAGITGKIFHDAIDAAKTVEGLQAYVAETLAA
19	LAEAKKAAHEEFTKAGITGKIFHDAIDAAKTVEGLQAYVAETLKA
4	LAQAKEAAIKELKQYGIG-DYYIKLINNAKTVEGVESLKNEILKA
5	LLKAKEAAINELKQYGIS-DYYVTLINKAKTVEGVNALKAEILSA
16	LKNAKEDAIKELKAGITSDIFYNAINAKTVEEVNALKNEILKA
10	LKNAKEDAIKELKEAGISSDIYFDAINKAKTVEGVESLKNEILKA
11	LKNAKEDAIKELKEAGITSDIFYFDAINKAKTIEGVESLKNEILKA
6	LKNAKEDAIKELKEAGIKSQFFNLINNAKTVEGVESLKNEILKA
9	LKNAKEAAIKELKEAGITAEYLFNLINKAKTVEGVESLKNEILKA
8	LKNAKEAAIKELKEAGITSDLYFSLINKAKTVEGVESLKNEILKA
21	LKEAKEKAIEELKAGITSDYYFDLINKAKTVEGVNALKDEILKA

Ejemplo 5: Estabilización de dominios de unión a albúmina

Se completaron estudios para determinar la estabilidad de ABDCon (SEQ ID NO: 21) cuando se produjeron como proteínas de fusión con varios dominios de fibronectina tipo III (FN3) (ver, por ejemplo, Publicación de Patente U.S. Nº US2010/0216708). Las proteínas de fusión de dominio FN3-ABDCon se generaron usando técnicas de clonación estándar. La secuencia de aminoácidos de una de las proteínas de fusión, Tencon-ABDCon se muestra en la SEQ ID NO: 41. Otras proteínas de fusión de dominio FN3-ABDCon preparadas fueron Tencon25-ABDCon, 83-ABDCon y 71-ABDCon. Estas proteínas se produjeron con etiquetas de poli-histidina c-terminales y se purificaron mediante una combinación de afinidad de níquel y cromatografía de exclusión por tamaño usando métodos estándar. Cada molécula purificada se incubó en PBS pH 7.4 a 37° C durante 28 días antes del análisis mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas. La Figura 7 demuestra que se descubrió que cada proteína de fusión de dominio FN3-ABDCon se degradó durante esta incubación como se evidencia por la aparición de bandas de bajo peso molecular en el gel SDS-PAGE. El análisis por espectrometría de masas confirmó que el patrón de degradación principal era la escisión de estas moléculas en los residuos L1, K2 y E3 de la secuencia ABDCon (SEQ ID NO: 21). Adicionalmente, se observó que la proteína G ABD nativa de Streptococcus (SEQ ID NO: 1) fusionada a un dominio FN3 mostraba un patrón de degradación similar con la escisión en el residuo L1 cuando se incubaba a 4° C durante 6-8 meses (datos no mostrados). Finalmente, se observó que varios lotes purificados de ABD nativo (SEQ ID NO: 1) y ABDCon (SEQ ID NO: 21) eran inactivos e indetectables en solución mediante SDS-PAGE una vez almacenados durante varios meses a 4° C, indicativo de una degradación grave.

Las observaciones anteriores sugirieron que la hélice alfa N-terminal de las estructuras ABDCon y ABD nativa como se usan para la extensión de vida media en suero son inestables. Esta falta de estabilidad para tales proteínas de fusión es indeseable ya que limita potencialmente la vida útil de dichas moléculas para investigación así como para aplicaciones terapéuticas. Como tal, se desarrolló una estrategia para mejorar la estabilidad de estas moléculas. El análisis de las estructuras tridimensionales de los dominios de unión a albúmina depositados en el

Banco de Datos de Proteínas muestra que la secuencia de aminoácidos TIDQWL (SEQ ID NO: 42) encontrada N-terminal al inicio del ABD nativo (SEQ ID NO: 1) está estructuralmente ordenada como parte de la primera hélice alfa de esta molécula en varias estructuras cristalinas (por ejemplo, PDB 2VDB, *Acta Cryst* 2008 F64, 64-69). Esto se opone a la estructura de NMR original de ABD que mostraba que esta región estaba desordenada en solución PDB 1GAB, Johansson et al., *J.Mol.Biol.*266: 859-865, 1997). Por tanto, se hipotetizó que extender esta primera hélice alfa de las secuencias ABD y ABDCon podría impartir mayor estabilidad a esta región ya que la extensión de las hélices alfa puede impartir mayor estabilidad a dicha hélice (Su et al., *Biochemistry* 33:15501-15510, 1994).

Una alineación de secuencias múltiples de los dominios de unión a albúmina naturales presentados en la Tabla 1 no reveló una secuencia de clara consenso para estos residuos N-terminales. Sin embargo, una secuencia peptídica, TIDEWL (SEQ ID NO: 43), está presente N-terminal para 5 de estos dominios de proteína. Por tanto, se generó un nuevo constructo ABDCon, ABDCon12 (SEQ ID NO: 44), añadiendo la secuencia TIDEWL al extremo N-terminal de ABDCon. Esta proteína se expresó con una etiqueta de poli-histidina N-terminal y se purificó hasta la homogeneidad usando métodos estándar para cromatografía de afinidad de níquel y cromatografía de exclusión por tamaño. El ABDCon12 purificado se incubó a 37° C en PBS durante 28 días y la estabilidad se evaluó mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas. La SDS-PAGE mostró un patrón de migración ligeramente más rápido después del día 14 indicativo de degradación. Sin embargo, el análisis de masa total demuestra que esta degradación se produce exclusivamente en la etiqueta de polihistidina y no en la secuencia de ABDCon12, indicando que la secuencia TIDEWL mejoró la estabilidad de ABDCon. Se demostró una prueba adicional de estabilidad en la estabilidad de una proteína de fusión de dominio FN3-ABDCon12 generada (Figura 7B) que mostró productos de la degradación significativamente menores en comparación con las moléculas de dominio FN3-ABDCon originales (Figura 7A) cuando se incubaron a 37° C en PBS durante 28 días.

La temperatura de fusión de ABDCon12 se determinó mediante calorimetría de barrido diferencial usando los procedimientos esbozados en el Ejemplo 2 anterior para investigar el mecanismo de estabilización para esta molécula. Se obtuvo una temperatura de fusión de 90,9° C en PBS, un aumento de 9,4° en comparación con la molécula ABDCon original, sugiriendo que la disminución en la proteólisis/degradación observada para ABDCon12 y las proteínas de fusión ABDCon12 es un resultado de una mayor estabilidad conformacional proporcionada por la extensión de hélice alfa N-terminal.

SEQ ID NO 41: Tencon-ABDCon

MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDNFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERS
YDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTTGGGGSGGGGSLKEAKEKAIEE
LKKAGITSDYYFDLINKAKTVEGVNALKDEILKAGGHHHHHHH

SEQ ID NO: 42: Secuencia N-terminal de Strep G. ABD

TIDQWL

SEQ ID NO: 43: secuencia N-terminal añadida a ABDCon

TIDEWL

SEQ ID NO: 44: ABDCon12

TIDEWLLKEAKEKAIEELKKAGITSDYYFDLINKAKTVEGVNALKDEILKA

Ejemplo 6: Caracterización de ABDCon12

Se determinó la afinidad de la unión de ABDCon12 purificada a albúmina humana y murina mediante resonancia de plasmones superficiales usando los mismos métodos que se han descrito anteriormente en el Ejemplo 2. Se obtuvieron constantes de disociación de 0,7 nM y 8,2 nM para la unión de ABDCon12 a albúmina humana y murina, respectivamente. La capacidad de ABDCon12 para extender la vida media en suero de una molécula de fusión se demostró fusionando ABDCon12 con el extremo C-terminal de un dominio FN3 que se une específicamente a un antígeno. Esta molécula se administró a ratones mediante inyección IP a 2 mg/kg y se analizó como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 4. Se midió una vida media terminal de 55 horas para la proteína de fusión dominio FN3-ABNCon12.

Ejemplo 7: Estabilización de dominios de unión a albúmina

En base al análisis de secuencia de dominios de unión a albúmina de origen natural, se anticipa que otras secuencias añadidas al extremo N-terminal de los dominios de unión a albúmina pueden hacerlos más estables. Por

ejemplo, un número de secuencias diferentes se encuentran N-terminales para estos dominios naturales de unión a albúmina como, pero no limitados a, APAVDV (SEQ ID NO: 45), IAKEKA (SEQ ID NO: 46), TIDQWL (SEQ ID NO: 42), VPAADV (SEQ ID NO: 47), TVKSIE (SEQ ID NO: 48), TPAVDA (SEQ ID NO: 49), TLKSIK (SEQ ID NO: 50), WEKAAA (SEQ ID NO: 51), AVDANS (SEQ ID NO: 52), QLAAEA (SEQ ID NO: 53), ALKAAA (SEQ ID NO: 54), EKLAAA (SEQ ID NO: 55). La adición de estas secuencias a los dominios de unión a albúmina podría aumentar la estabilidad si estas secuencias producen hélices alfa más largas. Adicionalmente, se prevé que los péptidos de origen no natural que aumentan la longitud o estabilidad de la hélice alfa también estabilicen los dominios de unión a la albúmina.

Las variantes con secuencias N-terminales adicionales pueden generarse usando técnicas estándar y probarse sus propiedades como se describe más arriba.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Jacobs, Steven

<120> Dominios de unión a albúmina de consenso no naturales

<130> JBI5009WOPCT

<140> A determinar

<141> 2013-03-23

<150> 61/651,642

<151> 2012-05-25

<150> 61/776,918

<151> 2013-03-12

<160> 55

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 44

<212> PRT

<213> Streptococcus sp. G148

<400> 1

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		

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

<210> 2

<211> 44

<212> PRT

<213> Streptococcus canis

<400> 2

ES 2 670 442 T3

Leu Ser Glu Ala Lys Glu Met Ala Ile Arg Glu Leu Asp Ala Gln Gly
 1 5 10 15
 5 Val Ser Asp Phe Tyr Lys Asn Lys Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30
 10 Gly Val Val Ala Leu Lys Asp Leu Ile Leu Asn Ser
 35 40
 <210> 3
 <211> 42
 15 <212> PRT
 <213> Streptococcus canis
 <400> 3
 20 Leu Asp Gln Ala Lys Gln Ala Ala Leu Lys Glu Phe Asp Arg Tyr Gly
 1 5 10 15
 25 Val Ser Asn Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30
 30 Gly Ile Met Glu Leu Gln Ala Gln Val Val
 35 40
 <210> 4
 <211> 44
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio de unión a albúmina no natural
 40 <400> 4
 Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Ile Lys Glu Leu Lys Gln Tyr Gly
 1 5 10 15
 45 Ile Gly Asp Tyr Tyr Ile Lys Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30
 50 Gly Val Glu Ser Leu Lys Asn Glu Ile Leu Lys Ala
 35 40
 <210> 5
 55 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Streptococcus equi
 <400> 5
 60
 65

ES 2 670 442 T3

	Leu	Leu	Lys	Ala	Lys	Glu	Ala	Ala	Ile	Asn	Glu	Leu	Lys	Gln	Tyr	Gly	
	1				5					10					15		
5	Ile	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Val	Thr	Leu	Ile	Asn	Lys	Ala	Lys	Thr	Val	Glu	
				20					25					30			
10	Gly	Val	Asn	Ala	Leu	Lys	Ala	Glu	Ile	Leu	Ser	Ala					
			35					40									
	<210> 6																
	<211> 45																
	<212> PRT																
15	<213> Finecoldia Magna																
	<400> 6																
20	Leu	Lys	Asn	Ala	Lys	Glu	Asp	Ala	Ile	Lys	Glu	Leu	Lys	Glu	Ala	Gly	
	1				5					10					15		
25	Ile	Lys	Ser	Gln	Phe	Phe	Phe	Asn	Leu	Ile	Asn	Asn	Ala	Lys	Thr	Val	
				20					25					30			
30	Glu	Gly	Val	Glu	Ser	Leu	Lys	Asn	Glu	Ile	Leu	Lys	Ala				
			35					40					45				
	<210> 7																
	<211> 45																
	<212> PRT																
	<213> Finecoldia Magna																
35	<400> 7																
40	Leu	Lys	Asp	Ala	Lys	Glu	Lys	Ala	Ile	Glu	Ala	Ile	Arg	Lys	Glu	Gly	
	1				5					10					15		
45	Val	Lys	Ser	Lys	Leu	Tyr	Glu	Asp	Leu	Ile	Asn	Lys	Ala	Lys	Thr	Ile	
				20					25					30			
50	Asp	Gly	Val	Asn	Ala	Leu	Arg	Asp	Gln	Ile	Ile	Glu	Ala				
			35					40					45				
	<210> 8																
	<211> 45																
	<212> PRT																
	<213> Peptostreptococcus magnus																
55	<400> 8																
60	Leu	Lys	Asn	Ala	Lys	Glu	Glu	Ala	Ile	Lys	Glu	Leu	Lys	Glu	Ala	Gly	
	1				5					10					15		
65	Ile	Thr	Ser	Asp	Leu	Tyr	Phe	Ser	Leu	Ile	Asn	Lys	Ala	Lys	Thr	Val	
				20					25					30			
70	Glu	Gly	Val	Glu	Ala	Leu	Lys	Asn	Glu	Ile	Leu	Lys	Ala				
			35					40					45				

ES 2 670 442 T3

<210> 9
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Peptostreptococcus magnus
 5 <400> 9
 Leu Lys Asn Ala Lys Glu Ala Ala Ile Lys Glu Leu Lys Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 10
 Ile Thr Ala Glu Tyr Leu Phe Asn Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val
 20 25 30
 15
 Glu Gly Val Glu Ser Leu Lys Asn Glu Ile Leu Lys Ala
 35 40 45
 20 <210> 10
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Peptostreptococcus magnus
 25 <400> 10
 Leu Lys Asn Ala Lys Glu Asp Ala Ile Lys Glu Leu Lys Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 30
 Ile Ser Ser Asp Ile Tyr Phe Asp Ala Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val
 20 25 30
 35
 Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asn Glu Ile Leu Lys Ala
 35 40 45
 40 <210> 11
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Peptostreptococcus magnus
 45 <400> 11
 Leu Lys Asn Ala Lys Glu Asp Ala Ile Lys Glu Leu Lys Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 50
 Ile Thr Ser Asp Ile Tyr Phe Asp Ala Ile Asn Lys Ala Lys Thr Ile
 20 25 30
 55
 Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asn Glu Ile Leu Lys Ala
 35 40 45
 60 <210> 12
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Finegoldia magna
 <400> 12
 65

ES 2 670 442 T3

	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	Val	Ala	His	Glu	Glu	Phe	Thr	Lys	Ala	Gly	
	1				5					10					15		
5	Ile	Thr	Gly	Lys	Ile	Phe	His	Asp	Ala	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	Thr	Val	
				20					25					30			
10	Glu	Gly	Leu	Lys	Ala	Tyr	Val	Ala	Glu	Thr	Leu	Ala	Ala				
			35					40					45				
	<210> 13																
	<211> 45																
	<212> PRT																
15	<213> Finegoldia magna																
	<400> 13																
20	Leu	Lys	Glu	Ala	Lys	Glu	Lys	Ala	Val	Glu	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Gly	
	1				5					10					15		
25	Ile	Thr	Ser	Glu	Lys	Tyr	Ile	Asp	Gln	Ile	Asn	Lys	Ala	Lys	Thr	Val	
				20					25					30			
30	Glu	Gly	Val	Asn	Ala	Leu	Lys	Asp	Glu	Ile	Ile	Lys	Ala				
			35					40					45				
	<210> 14																
	<211> 45																
	<212> PRT																
	<213> Finegoldia magnoa																
35	<400> 14																
40	Leu	Lys	Glu	Ala	Lys	Glu	Lys	Ala	Val	Glu	Glu	Leu	Lys	Asn	Asn	Gly	
	1				5					10					15		
45	Ile	Thr	Ser	Glu	Lys	Tyr	Ile	Asp	Gln	Ile	Asn	Lys	Ala	Lys	Thr	Val	
				20					25					30			
50	Glu	Gly	Val	Asn	Ala	Leu	Lys	Asp	Glu	Ile	Ile	Lys	Ala				
			35					40					45				
	<210> 15																
	<211> 45																
	<212> PRT																
	<213> Lactobacillus iners																
55	<400> 15																
60	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	Val	Ala	His	Glu	Glu	Phe	Thr	Lys	Ala	Gly	
	1				5					10					15		
65	Ile	Thr	Gly	Lys	Ile	Phe	His	Asp	Ala	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	Thr	Val	
				20					25					30			
70	Glu	Gly	Leu	Gln	Ala	Tyr	Val	Ala	Glu	Thr	Leu	Ala	Ala				
			35					40					45				

ES 2 670 442 T3

<210> 16
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Peptostreptococcus magnus

<400> 16

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

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

Glu Glu Val Asn Ala Leu Lys Asn Glu Ile Leu Lys Ala
 35 40 45

<210> 17
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Finegoldia magna

<400> 17

Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Val Glu Glu Leu Lys Asn Asn Gly
 1 5 10 15

Ile Thr Ser Glu Lys Tyr Ile Glu Gln Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val
 20 25 30

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

<210> 18
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus iners

<400> 18

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

Ile Thr Gly Lys Ile Phe His Asp Ala Ile Asp Ala Ala Lys Thr Val
 20 25 30

Glu Gly Leu Gln Ala Tyr Val Ala Glu Thr Leu Ala Ala
 35 40 45

<210> 19
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus iners

<400> 19

ES 2 670 442 T3

	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	Ala	Ala	His	Glu	Glu	Phe	Thr	Lys	Ala	Gly
	1				5					10					15	
5	Ile	Thr	Gly	Lys	Ile	Phe	His	Asp	Ala	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	Thr	Val
				20					25					30		
10	Glu	Gly	Leu	Gln	Ala	Tyr	Val	Ala	Glu	Thr	Leu	Lys	Ala			
			35					40					45			
	<210> 20															
	<211> 45															
	<212> PRT															
15	<213> Finegoldia magna															
	<400> 20															
20	Leu	Lys	Glu	Ala	Lys	Glu	Lys	Ala	Ile	Glu	Glu	Leu	Lys	Asn	Asn	Gly
	1				5					10					15	
	Ile	Thr	Ser	Glu	Lys	Tyr	Ile	Glu	Gln	Ile	Asn	Lys	Ala	Lys	Thr	Val
				20					25					30		
25	Glu	Gly	Val	Asn	Ala	Leu	Lys	Asp	Glu	Ile	Ile	Lys	Ser			
			35					40					45			
30	<210> 21															
	<211> 45															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
	<220>															
35	<223> Dominio de unión a albúmina no natural															
	<400> 21															
40	Leu	Lys	Glu	Ala	Lys	Glu	Lys	Ala	Ile	Glu	Glu	Leu	Lys	Lys	Ala	Gly
	1				5					10					15	
	Ile	Thr	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Leu	Ile	Asn	Lys	Ala	Lys	Thr	Val
				20					25					30		
45	Glu	Gly	Val	Asn	Ala	Leu	Lys	Asp	Glu	Ile	Leu	Lys	Ala			
			35					40					45			
50	<210> 22															
	<211> 45															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
55	<220>															
	<223> Dominio de unión a albúmina no natural															
	<220>															
	<221> MOD_RES															
60	<222> (21)..(21)															
	<223> Xaa1 puede ser cualquier aminoácido															
	<220>															
	<221> MOD_RES															
65	<222> (22)..(22)															

<223> Xaa2 puede ser cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
5 <222> (30)..(30)
<223> Xaa3 puede ser cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
10 <222> (31)..(31)
<223> Xaa4 puede ser cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
15 <222> (37)..(37)
<223> Xaa5 puede ser cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
20 <222> (41)..(41)
<223> Xaa6 puede ser cualquier aminoácido

<400> 22

25 Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Lys Lys Ala Gly
 1 5 10 15

30 Ile Thr Ser Asp Xaa Xaa Phe Asp Leu Ile Asn Lys Ala Xaa Xaa Val
 20 25 30

35 Glu Gly Val Asn Xaa Leu Lys Asp Xaa Ile Leu Lys Ala
 35 40 45

<210> 23
<211> 45
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40

<220>
<223> Dominio de unión a albúmina no natural

<220>
45 <221> MOD_RES
<222> (21)..(21)
<223> Xaa1 es Lys, Arg, Asp, Glu, Ala, Gly, Phe o Tyr

<220>
50 <221> MOD_RES
<222> (22)..(22)
<223> Xaa2 es Ala, Ser, Val, Lys, Arg, Asp, Glu o Tyr

<220>
55 <221> MOD_RES
<222> (30)..(30)
<223> Xaa3 es Asp, Glu o Lys

<220>
60 <221> MOD_RES
<222> (31)..(31)
<223> Xaa4 es Ala, Gly o Thr

<220>
65 <221> MOD_RES

<222> (37)..(37)
 <223> Xaa5 es Val, Tyr o Ala

 <220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (41)..(41)
 <223> Xaa6 es Qln, Asn, Lys, Arg o Glu

 <400> 23
 10
 Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Lys Lys Ala Gly
 1 5 10 15

 15
 Ile Thr Ser Asp Xaa Xaa Phe Asp Leu Ile Asn Lys Ala Xaa Xaa Val
 20 25 30

 20
 Glu Gly Val Asn Xaa Leu Lys Asp Xaa Ile Leu Lys Ala
 35 40 45

 <210> 24
 <211> 45
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Dominio de unión a albúmina no natural
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa1 es Lys, Ala o Tyr
 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa2 es Ala, Ser, Val o Tyr
 40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa3 es Asp o Lys
 45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa4 es Ala o Thr
 50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (37)..(37)
 <223> Xaa5 es Val, Tyr o Ala
 55
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (41)..(41)
 <223> Xaa6 es Qln o Glu
 60
 <400> 24

 65

ES 2 670 442 T3

1 Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Lys Lys Ala Gly
 5 1 5 10 15
 5 Ile Thr Ser Asp Xaa Xaa Phe Asp Leu Ile Asn Lys Ala Xaa Xaa Val
 20 25 30
 10 Glu Gly Val Asn Xaa Leu Lys Asp Xaa Ile Leu Lys Ala
 35 40 45
 <210> 25
 <211> 45
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio de unión a albúmina no natural ABDCon2
 20 <400> 25
 1 Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Lys Lys Ala Gly
 5 10 15
 25 Ile Thr Ser Asp Ala Tyr Phe Asp Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val
 20 25 30
 30 Glu Gly Val Asn Ala Leu Lys Asp Glu Ile Leu Lys Ala
 35 40 45
 <210> 26
 <211> 45
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio de unión a albúmina no natural ABDCon3
 40 <400> 26
 1 Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Lys Lys Ala Gly
 5 10 15
 45 Ile Thr Ser Asp Lys Tyr Phe Asp Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val
 20 25 30
 50 Glu Gly Val Asn Ala Leu Lys Asp Glu Ile Leu Lys Ala
 35 40 45
 <210> 27
 55 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> Dominio de unión a albúmina no natural ABDCon4
 <400> 27
 65

ES 2 670 442 T3

5 Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Lys Lys Ala Gly
 1 5 10 15
 10 Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Phe Asp Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val
 20 25 30
 15 Glu Gly Val Asn Ala Leu Lys Asp Glu Ile Leu Lys Ala
 35 40 45
 15 <210> 28
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Dominio de unión a albúmina no natural ABDCon5
 <400> 28
 25 Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Lys Lys Ala Gly
 1 5 10 15
 30 Ile Thr Ser Asp Tyr Ser Phe Asp Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val
 20 25 30
 35 Glu Gly Val Asn Ala Leu Lys Asp Glu Ile Leu Lys Ala
 35 40 45
 35 <210> 29
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Dominio de unión a albúmina no natural ABDCon6
 <400> 29
 45 Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Lys Lys Ala Gly
 1 5 10 15
 50 Ile Thr Ser Asp Tyr Val Phe Asp Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val
 20 25 30
 55 Glu Gly Val Asn Ala Leu Lys Asp Glu Ile Leu Lys Ala
 35 40 45
 60 <210> 30
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Dominio de unión a albúmina no natural ABDCon7
 <400> 30

ES 2 670 442 T3

Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Lys Lys Ala Gly
 1 5 10 15

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

10 Glu Gly Val Asn Ala Leu Lys Asp Gln Ile Leu Lys Ala
 35 40 45

<210> 31
 <211> 45
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Dominio de unión a albúmina no natural ABDCon8

20 <400> 31

Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Lys Lys Ala Gly
 1 5 10 15

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

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

<210> 32
 35 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 40 <223> Dominio de unión a albúmina no natural ABDCon9

<400> 32

Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Lys Lys Ala Gly
 45 1 5 10 15

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

50 Glu Gly Val Asn Ala Leu Lys Asp Glu Ile Leu Lys Ala
 35 40 45

<210> 33
 <211> 45
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Dominio de unión a albúmina no natural ABDCon10

60 <400> 33

65

ES 2 670 442 T3

	Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Lys Lys Ala Gly	
	1 5 10 15	
5	Ile Thr Ser Asp Tyr Tyr Phe Asp Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val	
	20 25 30	
10	Glu Gly Val Asn Val Leu Lys Asp Glu Ile Leu Lys Ala	
	35 40 45	
	<210> 34	
	<211> 45	
	<212> PRT	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Dominio de unión a albúmina no natural ABDCon11	
20	<400> 34	
	Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Lys Lys Ala Gly	
	1 5 10 15	
25	Ile Thr Ser Asp Tyr Tyr Phe Asp Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val	
	20 25 30	
30	Glu Gly Val Asn Tyr Leu Lys Asp Glu Ile Leu Lys Ala	
	35 40 45	
	<210> 35	
	<211> 135	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> ADNc optimizado con codón para expresar dominio de unión a albúmina no natural ABDCon	
40	<400> 35	
	ctgaaagaag cgaaagaaaa agcgattgaa gaactgaaaa aagcgggcat taccagcgat	60
45	tattatttttg atctgattaa caaagcgaaa accgtggaag gcgtgaacgc gctgaaagat	120
	gaaattctga aagcg	135
50	<210> 36	
	<211> 585	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
55	<400> 36	
60		
65		

ES 2 670 442 T3

	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	
	1				5					10					15		
5	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	
				20					25					30			
10	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	
			35					40					45				
15	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	
		50					55					60					
20	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	
	65					70					75					80	
25	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	
					85					90					95		
30	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	
				100					105					110			
35	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	
			115					120					125				
40	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	
		130					135					140					
45	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	
	145					150					155					160	
50	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	
					165					170					175		
55	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	
				180					185					190			
60	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	
			195					200					205				
65																	

ES 2 670 442 T3

	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	
	210						215					220					
5	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	
	225					230					235					240	
10	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	
					245					250					255		
15	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	
				260					265					270			
20	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	
			275					280					285				
25	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	
	290						295					300					
30	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	
	305					310					315					320	
35	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	
					325					330					335		
40	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	
				340					345					350			
45	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	
			355					360					365				
50	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	
	370						375					380					
55	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	
	385					390					395					400	
60	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	
				405						410					415		
65	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	
				420					425					430			
70	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	
			435					440					445				
75	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	
	450						455					460					

ES 2 670 442 T3

	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	465	470	475	480
5	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr		485	490	495
10	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp		500	505	510
15	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala		515	520	525
20	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu		530	535	540
25	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	545	550	555	560
30	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val		565	570	575
35	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu									580	585	
	<210> 37																			
	<211> 584																			
	<212> PRT																			
	<213> Macaca mulatta																			
	<400> 37																			
40	Asp	Thr	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	1	5	10	15
45	Glu	His	Phe	Lys	Gly	Leu	Val	Leu	Val	Ala	Phe	Ser	Gln	Tyr	Leu	Gln		20	25	30
50	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Glu	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu		35	40	45
55	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys		50	55	60
60	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	65	70	75	80
65	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro		85	90	95

ES 2 670 442 T3

	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	
				100					105					110			
5	Pro	Pro	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	
			115					120					125				
10	Asp	Asn	Glu	Ala	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Val	Ala	Arg	
		130					135					140					
15	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Ala	Arg	
	145					150					155					160	
20	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Ala	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	
					165					170					175		
25	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	
				180					185					190			
30	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Asp	
			195					200					205				
35	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Lys	Phe	Pro	
		210					215					220					
40	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	
	225					230					235					240	
45	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	
					245					250					255		
50	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Met	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	
				260					265					270			
55	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Asp	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	
			275					280					285				
60	Cys	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	
		290					295					300					
65	Leu	Ala	Ala	Asp	Tyr	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	
	305					310					315					320	
70	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	
					325					330					335		

ES 2 670 442 T3

	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Met	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Ala	
				340					345					350			
5	Tyr	Glu	Ala	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	
			355					360					365				
10	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Gln	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	
		370					375					380					
15	Gln	Asn	Leu	Val	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	
	385					390					395					400	
20	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	
				405						410					415		
25	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	
				420					425					430			
30	Val	Gly	Ala	Lys	Cys	Cys	Lys	Leu	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	
			435					440					445				
35	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Arg	Leu	Cys	Val	Leu	His	
		450					455					460					
40	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Glu	Lys	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	
	465					470					475					480	
45	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Leu	Asp	Glu	Ala	
				485						490					495		
50	Tyr	Val	Pro	Lys	Ala	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	
				500					505					510			
55	Met	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Lys	Gln	Val	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	
			515					520					525				
60	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	
		530					535					540					
65	Lys	Gly	Val	Met	Asp	Asn	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	
	545					550				555						560	
70	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Ala	Cys	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Pro	Lys	Phe	Val	
				565						570					575		
75	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Ala									
				580													

ES 2 670 442 T3

<210> 38
 <211> 584
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 38

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

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

Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30

Lys Cys Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp
 35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys
 50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu
 65 70 75 80

Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro
 85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu
 100 105 110

Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys
 115 120 125

Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr Leu His Glu Val Ala Arg
 130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln
 145 150 155 160

Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala Glu Ala Asp Lys Glu Ser
 165 170 175

Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly Val Lys Glu Lys Ala Leu Val Ser
 180 185 190

Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser Met Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Thr Phe Pro
 210 215 220

ES 2 670 442 T3

	Asn	Ala	Asp	Phe	Ala	Glu	Ile	Thr	Lys	Leu	Ala	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	225	230	235	240
5	Val	Asn	Lys	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp		245	250	255
10	Arg	Ala	Glu	Leu	Ala	Lys	Tyr	Met	Cys	Glu	Asn	Gln	Ala	Thr	Ile	Ser		260	265	270
15	Ser	Lys	Leu	Gln	Thr	Cys	Cys	Asp	Lys	Pro	Leu	Leu	Lys	Lys	Ala	His		275	280	285
20	Cys	Leu	Ser	Glu	Val	Glu	His	Asp	Thr	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ala		290	295	300
25	Ile	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Asp	Gln	Glu	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	305	310	315	320
30	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Thr	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Arg		325	330	335
35	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Lys		340	345	350
40	Tyr	Glu	Ala	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Glu	Ala	Asn	Pro	Pro	Ala		355	360	365
45	Cys	Tyr	Gly	Thr	Val	Leu	Ala	Glu	Phe	Gln	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro		370	375	380
50	Lys	Asn	Leu	Val	Lys	Thr	Asn	Cys	Asp	Leu	Tyr	Glu	Lys	Leu	Gly	Glu	385	390	395	400
55	Tyr	Gly	Phe	Gln	Asn	Ala	Ile	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ala	Pro		405	410	415
60	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Ala	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Arg		420	425	430
65	Val	Gly	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Leu	Pro	Glu	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Cys		435	440	445
	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Ala	Ile	Leu	Asn	Arg	Val	Cys	Leu	Leu	His	450	455	460	
	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Glu	His	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Ser	Gly	Ser				

ES 2 670 442 T3

	465		470		475		480
5	Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Thr Val Asp Glu Thr	485		490		495	
10	Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp	500		505		510	
15	Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala	515		520		525	
20	Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu	530		535		540	
25	Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys	545		550		555	560
30	Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val	565		570		575	
35	Thr Arg Cys Lys Asp Ala Leu Ala	580					
	<210> 39						
	<211> 145						
	<212> PRT						
	<213> Secuencia Artificial						
	<220>						
	<223> Proteína de fusión Tencon25-ABDcon						
40	<400> 39						
45	Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp	1	5	10		15	
50	Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe	20		25		30	
55	Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu	35		40		45	
60	Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro	50		55		60	
65	Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg	65		70		75	80
70	Ser Asn Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly	85		90		95	

ES 2 670 442 T3

Gly Gly Gly Ser Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu
 100 105 110

5 Lys Lys Ala Gly Ile Thr Ser Asp Tyr Tyr Phe Asp Leu Ile Asn Lys
 115 120 125

10 Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Asn Ala Leu Lys Asp Glu Ile Leu Lys
 130 135 140

15 Ala
 145

<210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Conector

25 <400> 40

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

30 <210> 41
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Proteína de fusión Tencon-ABDCon
 <400> 41

40 Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
 1 5 10 15

45 Ser Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe
 20 25 30

50 Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu
 35 40 45

55 Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
 50 55 60

60 Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg
 65 70 75 80

65 Ser Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly

ES 2 670 442 T3

				85					90					95					
5		Gly	Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Glu	Ala	Lys	Glu	Lys	Ala	Ile	Glu	Glu	Leu		
				100						105					110				
10		Lys	Lys	Ala	Gly	Ile	Thr	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Leu	Ile	Asn	Lys		
				115					120					125					
15		Ala	Lys	Thr	Val	Glu	Gly	Val	Asn	Ala	Leu	Lys	Asp	Glu	Ile	Leu	Lys		
			130					135					140						
		Ala																	
		145																	
20	<210>	42																	
	<211>	6																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Secuencia Artificial																	
25	<220>																		
	<223>	Extensión N-terminal																	
	<400>	42																	
30									Thr	Ile	Asp	Gln	Trp	Leu					
									1				5						
	<210>	43																	
	<211>	6																	
35	<212>	PRT																	
	<213>	Secuencia Artificial																	
	<220>																		
	<223>	Extensión N-terminal																	
40	<400>	43																	
									Thr	Ile	Asp	Glu	Trp	Leu					
									1				5						
45	<210>	44																	
	<211>	51																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Secuencia Artificial																	
50	<220>																		
	<223>	ABDCon12																	
	<400>	44																	
55									Thr	Ile	Asp	Glu	Trp	Leu	Leu	Lys	Glu	Ala	Lys
									1				5				10		Lys
																		Glu	Lys
																		Ala	Ile
																		15	Glu
60									Glu	Leu	Lys	Lys	Ala	Gly	Ile	Thr	Ser	Asp	Tyr
												20					25		Tyr
																		Phe	Asp
																		30	Leu
																			Ile
65																			

ES 2 670 442 T3

	Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Asn Ala Leu Lys Asp Glu Ile
	35 40 45
5	Leu Lys Ala
	50
	<210> 45
	<211> 6
10	<212> PRT
	<213> Secuencia Artificial
	<220>
	<223> Extensión N-terminal
15	<400> 45
	Ala Pro Ala Val Asp Val
	1 5
20	<210> 46
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> Secuencia Artificial
25	<220>
	<223> Extensión N-terminal
	<400> 46
30	Ile Ala Lys Glu Lys Ala
	1 5
	<210> 47
	<211> 6
35	<212> PRT
	<213> Secuencia Artificial
	<220>
	<223> Extensión N-terminal
40	<400> 47
	Val Pro Ala Ala Asp Val
	1 5
45	<210> 48
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> Secuencia Artificial
50	<220>
	<223> Extensión N-terminal
	<400> 48
55	Thr Val Lys Ser Ile Glu
60	1 5
	<210> 49
	<211> 6
	<212> PRT
65	<213> Secuencia Artificial

	<220>	
	<223> Extensión N-terminal	
5	<400> 49	
		Thr Pro Ala Val Asp Ala
		1 5
10	<210> 50	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Extensión N-terminal	
	<400> 50	
20		Thr Leu Lys Ser Ile Lys
		1 5
25	<210> 51	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Extensión N-terminal	
	<400> 51	
		Trp Glu Lys Ala Ala Ala
		1 5
35	<210> 52	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Extensión N-terminal	
	<400> 52	
45		Ala Val Asp Ala Asn Ser
		1 5
50	<210> 53	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
55	<220>	
	<223> Extensión N-terminal	
	<400> 53	
60		Gln Leu Ala Ala Glu Ala
		1 5
65	<210> 54	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 670 442 T3

<220>

<223> Extensión N-terminal

<400> 54

5

Ala Leu Lys Ala Ala Ala
1 5

<210> 55

10

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Extensión N-terminal

<400> 55

20

Glu Lys Leu Ala Ala Ala
1 5

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un dominio de unión a albúmina aislado no natural que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.
- 2.** El dominio de unión a albúmina aislado no natural de la reivindicación 1, que comprende un aminoácido de la SEQ ID NO: 21 que tiene sustituciones en los residuos 1, 2, 3, 4, 5, o 6.
- 10 **3.** El dominio de unión a albúmina aislado de la reivindicación 2, en donde las sustituciones en los residuos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 tienen lugar en una o más posiciones de aminoácidos Y21, Y22, L25, K30, T31, E33, G34, A37, L38, E41, I42 y A45 de la SEQ ID NO: 21.
- 15 **4.** El dominio de unión a albúmina aislado de la reivindicación 2, en donde las sustituciones en los residuos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 tienen lugar en una o más posiciones de aminoácidos Y21, Y22, K30, T31, A37, y E41 de la SEQ ID NO: 21.
- 5.** El dominio de unión a albúmina aislado no natural de cualquier reivindicación anterior, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 21-34 o 44.
- 20 **6.** El dominio de unión a albúmina aislado no natural de cualquier reivindicación anterior, que comprende además una extensión de 6 aminoácidos en su extremo N-terminal, opcionalmente en donde la extensión de 6 aminoácidos comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 42, 43 y 45-55, opcionalmente en donde la extensión de aminoácidos comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43.
- 25 **7.** El dominio de unión a albúmina aislado de cualquier reivindicación anterior, en donde el dominio de unión a albúmina tiene:
 - a) una constante de disociación (K_D) de unión a albúmina humana entre aproximadamente 50 pM-1 μ M usando resonancia de plasmones superficiales a un caudal de 100 μ l/min usando PBST (PBS, 0005% de Tween20) como tampón de ejecución; y/o
 - b) una constante de velocidad de disociación (K_{off}) de unión a albúmina humana a $3,6 \times 10^{-5}$ a $1,1 \times 10^{-1}$ usando resonancia de plasmones superficiales a un caudal de 100 μ l/min usando PBST (PBS, 0005% de Tween20) como tampón de ejecución.
- 30 **8.** Un método para elaborar el dominio de unión a albúmina aislado de cualquier reivindicación anterior, que comprende:
 - a) proporcionar una polinucleótido que codifica el dominio de unión a albúmina aislado;
 - b) expresar el polinucleótido en un huésped o in vitro; y
 - c) recuperar el dominio de unión a albúmina aislado.
- 35 **9.** Un polinucleótido aislado que codifica el dominio de unión a albúmina de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende opcionalmente:
 - a) un polinucleótido que codifica una dominio de unión a albúmina seleccionado del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 21-34 ó 44; o
 - b) un polinucleótido de la SEQ ID NO: 35.
- 40 **10.** Un vector aislado que comprende el polinucleótido aislado de la reivindicación 9.
- 11.** Una célula huésped que comprende el vector aislado de la reivindicación 10.
- 12.** Una proteína de fusión que comprende un dominio de unión a albúmina de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un agente bioactivo.
- 55 **13.** La proteína de fusión de la reivindicación 12, en donde el agente bioactivo es un andamiaje de proteína que se une específicamente a una molécula objetivo, opcionalmente en donde el andamiaje de proteína está basado en Tencon25 que comprende los residuos de aminoácidos 1-90 de la SEQ ID NO: 39, o variantes del mismo.
- 60 **14.** La proteína de fusión de la reivindicación 13, en donde la proteína de unión a albúmina y el agente bioactivo se ligan operativamente usando un conector, opcionalmente en donde el conector comprende un conector Gly-Ser, como en donde el conector comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40.
- 65 **15.** Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la reivindicación 14 y por lo menos un

portador o diluyente farmacéuticamente acceptable.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1.

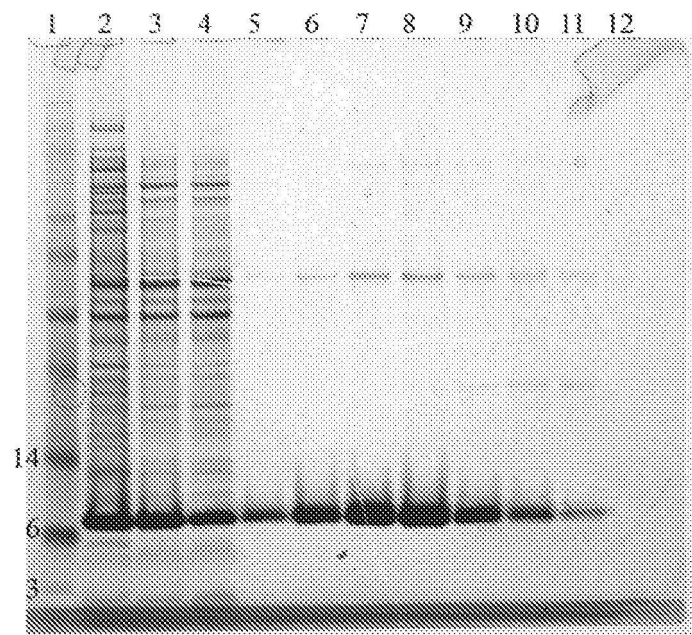


Figura 2.

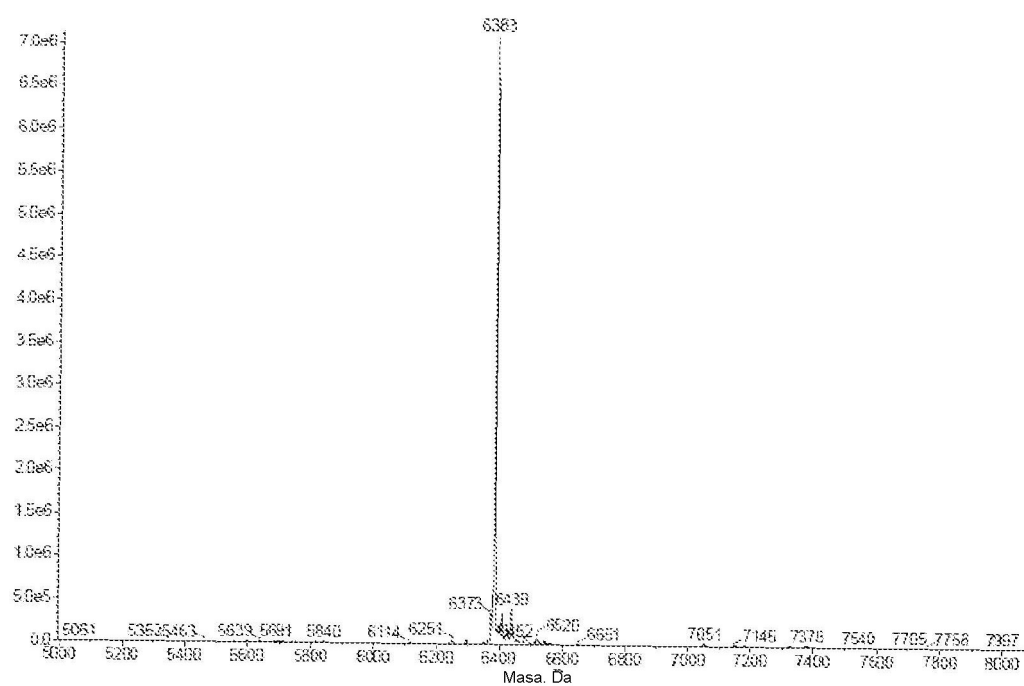


Figura 3.

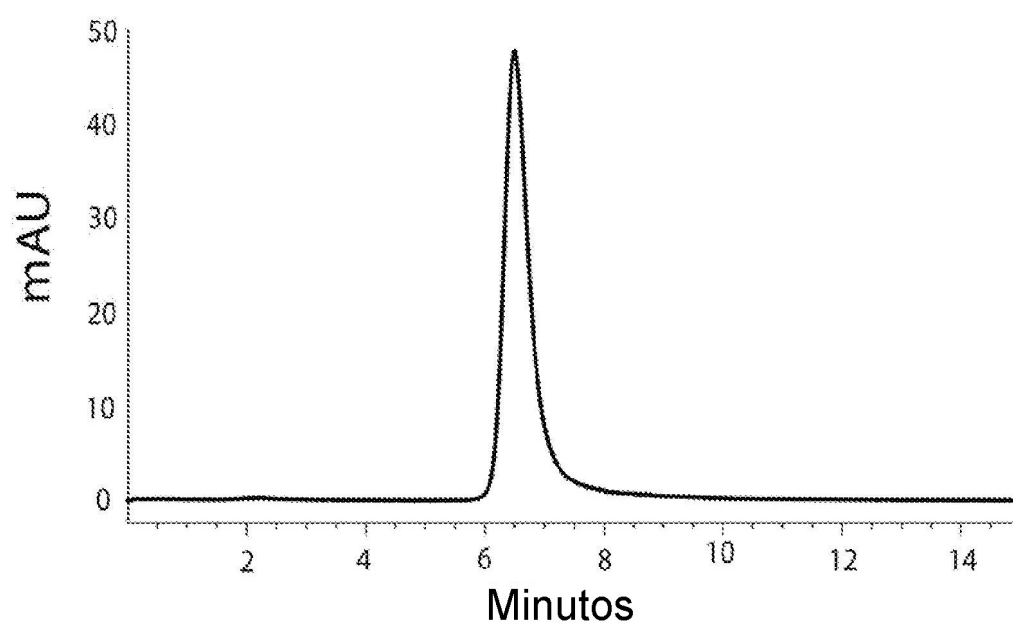


Figura 4A

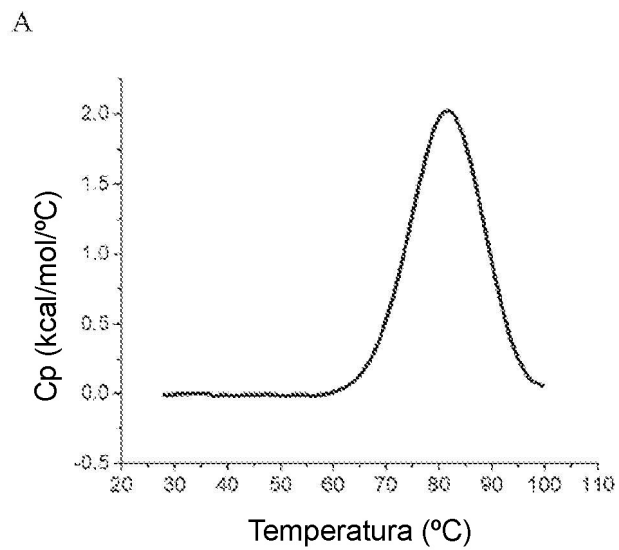


Figura 4B

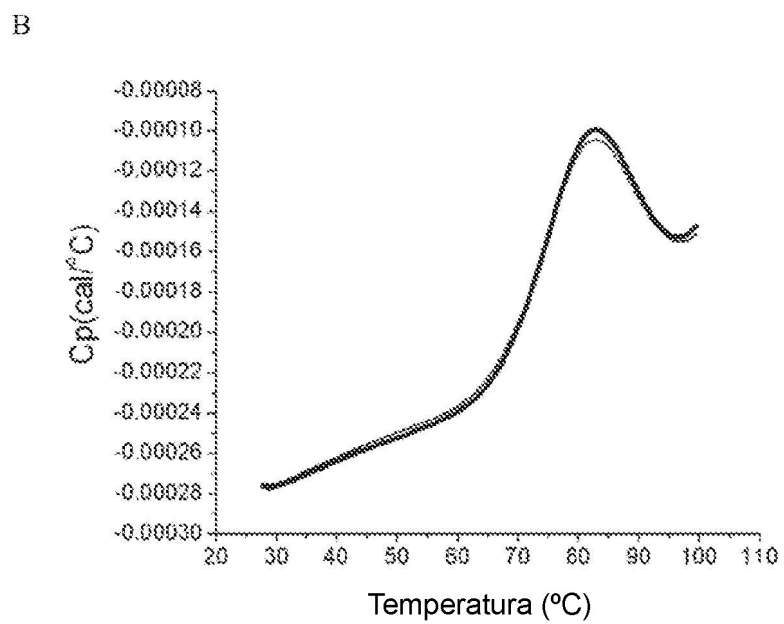


Figura 5.

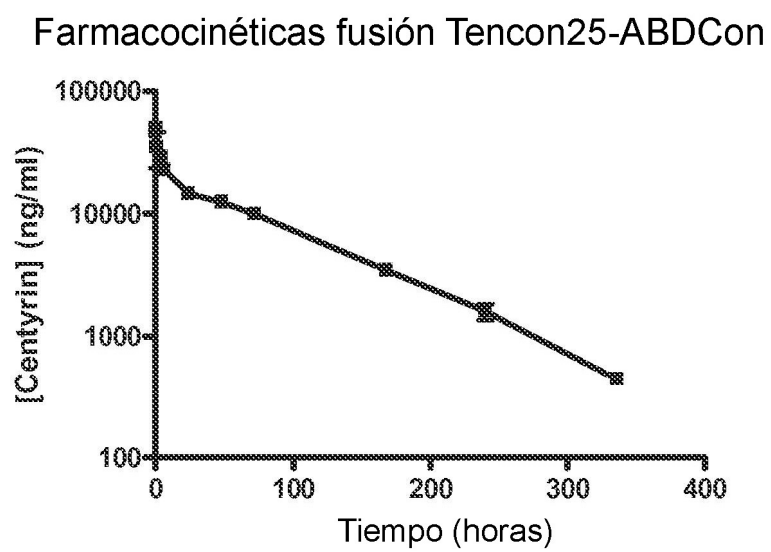


Figura 6.

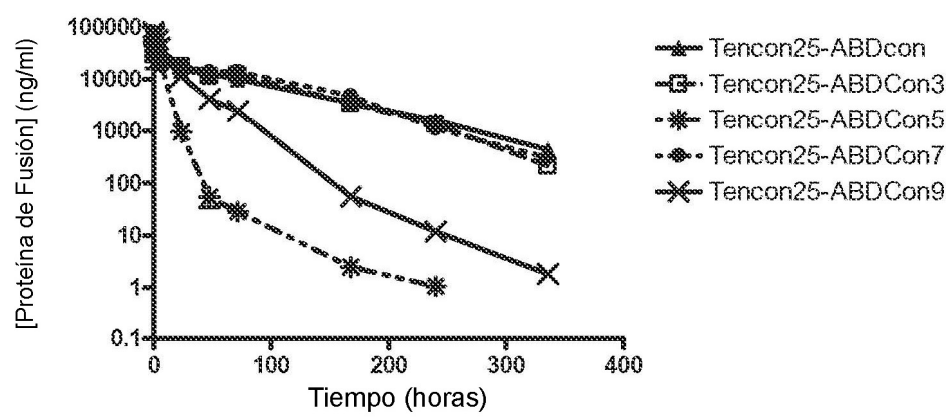


Figura 7A.

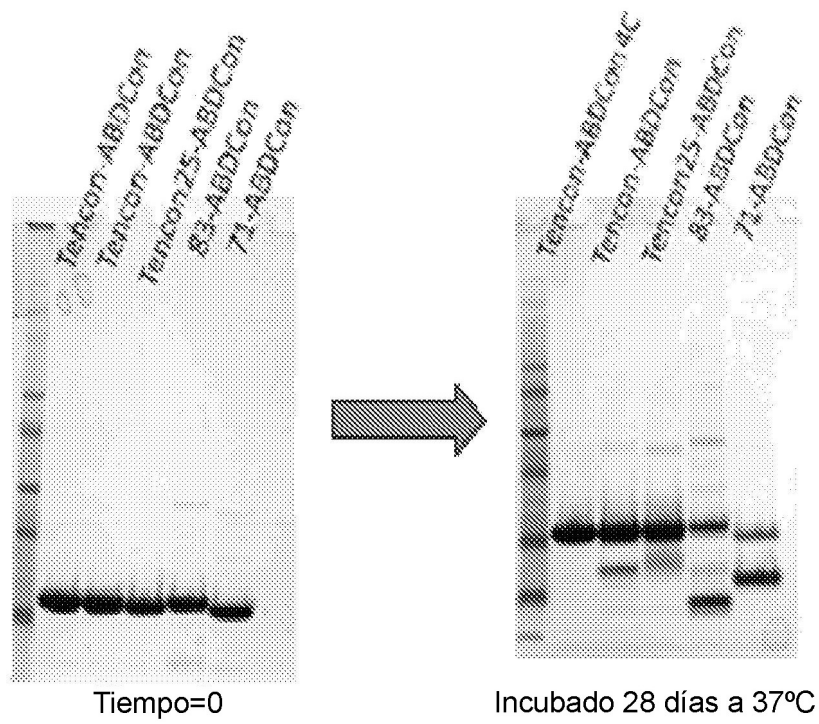


Figura 7B

