

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 983**

51 Int. Cl.:

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 14/31 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2013 PCT/EP2013/072365**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14064238**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2013 E 13783334 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2912051**

54 Título: **Método para la separación de proteínas que contienen un dominio que se une a albúmina**

30 Prioridad:

25.10.2012 EP 12189948
25.10.2012 US 201261718246 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.07.2018

73 Titular/es:

AFFIBODY AB (100.0%)
Gunnar Asplunds Allé 24
171 69 Solna, SE

72 Inventor/es:

JONASSON, PER y
EKLUND, PÅR

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 674 983 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la separación de proteínas que contienen un dominio que se une a albúmina

Campo de la invención

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

Antecedentes

10 La albúmina sérica es la proteína más abundante en el suero de mamíferos (35-50 g/l, es decir 0,53-0,75 mM en los seres humanos) y diversas estrategias para acoplar covalentemente un péptido o una proteína a una molécula portadora que permitirán una asociación *in vivo* a la albúmina del suero, se han descrito, por ejemplo, en los documentos WO91/01743, WO01/45746 y en Dennis et al. (J Biol Chem 277:35035-43, 2002). El documento WO91/01743 describe, entre otras cosas, el uso de péptidos o proteínas que se unen a albúmina, obtenidos a partir de la proteína G estreptocócica (SpG) para incrementar la semivida de otras proteínas. La idea es fusionar el péptido/proteína que se une a albúmina, obtenido a partir de bacterias a un péptido/proteína terapéuticamente interesante, que se ha mostrado que se elimina rápidamente desde la sangre. La proteína de fusión generada se une a la albúmina sérica *in vivo*, y se beneficia de su semivida más larga, lo que aumenta la semivida neta del péptido/proteína fusionado terapéuticamente interesante. La semivida de la albúmina sérica es directamente proporcional al tamaño del animal, en donde, por ejemplo, la albúmina de suero humano (HSA) tiene una semivida de 19 días y la albúmina de suero de conejo tiene una semivida de aproximadamente 5 días (McCurdy et al., J Lab Clin Med 143:115, 2004).

25 La proteína G estreptocócica (SpG) es un receptor bifuncional presente en la superficie de ciertas cepas de estreptococos y es capaz de unirse tanto a IgG como a albúmina de suero (Björck et al., Mol Immunol 24:1113, 1987). La estructura es muy repetitiva, con varios dominios diferentes estructural y funcionalmente (Guss et al., EMBO J 5:1567, 1986), más precisamente tres dominios que se unen a Ig y tres dominios que se unen a albúmina sérica (Olsson et al., Eur J Biochem 168:319, 1987). La estructura de uno de los tres dominios que se unen a la albúmina sérica en SpG se ha determinado, mostrando un haz plegado de tres hélices (Kraulis et al., FEBS Lett 378:190, 1996, Johansson et al., J. Biol. Chem. 277:8114-20, 2002). Un motivo de 46 aminoácidos se definió como ABD (dominio que se une a albúmina, del inglés "albumin binding domain") y también se ha denominado posteriormente G148-GA3 (GA por unión a la albúmina relacionada con la proteína G y G148 de la cepa de *Streptococcus* a partir de la cual se obtiene).

35 Se han desarrollado variantes artificiales de GA3-G148 que tienen una afinidad muy mejorada hacia la albúmina de suero humano (Jonsson et al., Prot Eng Des Sel 21:515-27, 2008; documento WO2009/016043), así como variantes de alta afinidad modificadas genéticamente con propiedades estimulantes inmunes reducidas (documento WO2012/004384). Estas últimas estaban motivadas por el hecho de que algunos epítopos de linfocitos T y B se habían identificado experimentalmente dentro de GA3-G148 (Goetsch et al., Clin Diagn Lab Immunol 10:125-32, 2003), haciendo que este dominio, como tal, fuera menos adecuado para el uso en composiciones farmacéuticas para administración a seres humanos. A lo largo del presente texto, GA3-G148, así como los diversos derivados del mismo modificados genéticamente presentados, por ejemplo, en los documentos WO2009/016043 y WO2012/004384, se denominan colectivamente "ABD". Por lo tanto, en la presente descripción, "ABD" indica estas clases de polipéptidos que se unen a albúmina, en lugar de un polipéptido especificado con una secuencia de aminoácidos específica.

45 El aumento del interés en la incorporación de un dominio que se une a albúmina en composiciones terapéuticas o de diagnóstico, viene seguido de una creciente necesidad de estrategias de purificación de bajo costo y eficaces para el aislamiento de moléculas ligadas covalentemente a ABD, producidas por ejemplo mediante una expresión recombinante en sistemas procariontes o eucariotes, o mediante una conjugación química directa con ABD. Una estrategia general para la purificación de proteínas expresadas de forma recombinante sería incluir un marcador de afinidad utilizado comúnmente, tal como un marcador de polihistidina, una proteína que se une a quitina (CBP), una proteína que se une a maltosa (MBP), un marcador de glutatión-S-transferasa (GST) o un marcador FLAG, y llevar a cabo una separación clásica por afinidad usando resinas comerciales, desarrolladas específicamente para cada marcador. Sin embargo, para ciertas aplicaciones, y en particular para las moléculas que van a ser utilizadas como agentes terapéuticos, el producto final debe ser homogéneo. Debido a que el marcador se tendría que eliminar, por ejemplo, mediante escisión enzimática o química, es necesario asegurar una escisión completa para obtener un producto homogéneo, o sufrir una pérdida de rendimiento cuando se elimina un producto escindido de forma incompleta. Ambas cuestiones sirven para aumentar el costo de producción del producto. Por lo tanto, una estrategia más motivada sería utilizar el resto ABD mismo como un marcador de la purificación. Un ejemplo de ello sería acoplar albúmina recombinante a un soporte sólido (véase, por ejemplo, Jonsson et al., Prot Eng Des Sel 21:515-27, 2008; Andersen et al., J Biol Chem 286:5234-41, 2011). A partir de un soluto crudo, los compuestos que comprenden un marcador ABD son capturados por la albúmina, los contaminantes adsorbidos de forma no

específica se eliminan y los compuestos marcados con ABD se recuperan posteriormente mediante la interrupción de la interacción específica, pero reversible, con albúmina. Sin embargo, la albúmina es una molécula portadora natural grande con varios sitios de interacción para diferentes proteínas, ácidos grasos, esteroides, iones, etc., y por lo tanto, la unión de fondo de componentes específicos y no específicos puede contaminar la muestra recuperada. A pesar del hecho de que la albúmina humana recombinante ha sido desarrollada, todavía es costoso incluirla como un ligando de afinidad en la producción a gran escala de agentes terapéuticos, en particular porque es incompatible con los procedimientos convencionales para la limpieza *in situ*, que se tendrían que aplicar para el uso repetido de la matriz acoplada con albúmina. Además, unas condiciones de elución más duras pueden ser necesarias para recuperar moléculas que contienen variantes de ABD con una afinidad excepcionalmente alta hacia la albúmina. Tales condiciones pueden ser desfavorables también para la molécula ABD marcada.

La proteína A procedente de *Staphylococcus aureus* ha sido utilizada desde hace tiempo como un ligando de afinidad en la producción industrial de anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión de Fc, debido a la afinidad natural de la proteína A hacia la porción Fc de la IgG. El documento WO2010/056550 describe el uso de la Proteína A para purificar anticuerpos de dominio único. La Proteína A en su totalidad, así como los dominios individuales que se unen a Fc de las mismas, han servido posteriormente como puntos de partida para el diseño racional de ligandos de afinidad mediante ingeniería genética con propiedades mejoradas. Para una introducción, véanse los artículos de Nord K y colaboradores en Prot Eng (Nord et al., Prot Eng 8:601-608; 1995) y Nat Biotech (Nord et al., Nat Biotech 15:772-777; 1997). Un armazón avanzado para tales ligandos de afinidad se describe en el documento EP2077272.

Un objeto de la presente descripción es proporcionar nuevos métodos para la purificación, separación y/o cromatografía de moléculas de proteína que contienen ABD, por ejemplo, proteínas de fusión en las que ABD es un resto de fusión. Además, un objeto de la descripción es proporcionar usos para agentes que se unen a ABD en la biotecnología, por ejemplo, en aplicaciones de purificación y separación de proteínas.

Descripción de la invención

Estos objetos y otros objetos evidentes para el experto en la materia a partir de la presente descripción, se pueden alcanzar mediante uno o varios de los diversos aspectos inventivos descritos a continuación.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la descripción proporciona un método para separar al menos una molécula que contiene ABD presente en un líquido, de otros constituyentes en el líquido, en donde el método comprende una etapa de separación por afinidad, etapa en la que se utiliza, como ligando de afinidad, un polipéptido que se une a ABD que comprende un motivo que se une a ABD, BM, motivo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

EX₂X₃X₄AX₆X₇EI X₁₀X₁₁LPNLTX₁₇X₁₈QX₂₀ X₂₁AFIX₂₅KLX₂₈D

en donde, independientemente uno de otro,

X₂ se selecciona a partir de F, I y L;

X₃ se selecciona a partir de H, K, N, Q, R, S, T y V;

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

X₆ se selecciona a partir de F, I, L e Y;

X₇ se selecciona a partir de A, H, I, K, L, N, Q, R, S, T y V;

X₁₀ se selecciona a partir de G, H, K, N, Q, R y S;

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

X₁₇ se selecciona a partir de F, H, L, S y T;

X₁₈ se selecciona a partir de D, E, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T y V;

X₂₀ se selecciona a partir de H, K y R;

X₂₁ se selecciona a partir de I, L y V;

X₂₅ se selecciona a partir de F, I, L, V e Y;

X₂₈ se selecciona a partir de D y E.

Como realizará una persona con experiencia en la técnica de cromatografía por afinidad, el método de separación descrito se puede emplear en la eliminación y/o purificación de moléculas que comprenden ABD, es decir, "moléculas que contienen ABD". Tales moléculas pueden ser, en particular, proteínas de fusión, en las que un resto de fusión comprende uno o varios dominios ABD, y otros restos de fusión tienen otras funciones, tales como funciones biológicamente activas, por ejemplo, funciones terapéuticas o de diagnóstico.

El método comprende una etapa de separación por afinidad, etapa en la que se emplea un polipéptido como se ha definido anteriormente. Otras variantes y realizaciones específicas del polipéptido que se une a ABD se proporcionan a continuación. Por lo tanto, la invención proporciona el uso del polipéptido como se describe en este documento en un método de separación por afinidad. Adecuadamente, el método implica un dispositivo de separación. El dispositivo de separación puede comprender adecuadamente un soporte sólido, por ejemplo, seleccionado a partir de medios cromatográficos, membranas, celulosa, sílice, agarosa, poli(acrilamida), perlas magnéticas, sistemas de dos fases y otros materiales de este tipo usados comúnmente en la separación. En una realización, el polipéptido definido en el presente documento se ha acoplado a un soporte sólido de un dispositivo de separación. El dispositivo de separación así obtenido, que tiene un polipéptido como se define en el presente documento, acoplado al mismo, se denomina a lo largo de la descripción y las reivindicaciones una "matriz de afinidad" o "resina", y a una realización particular del mismo se hace referencia en los ejemplos como "agarosa anti-ABD".

Para los fines de purificación de una molécula que contiene ABD a partir de un líquido, el líquido que contiene la molécula que contiene ABD que se va a purificar, se aplica adecuadamente a una matriz de afinidad de este tipo en condiciones propicias para la unión de la molécula que contiene ABD a la matriz. Después de ello, la matriz de afinidad se lava en condiciones tales que la unión de la molécula que contiene ABD a la matriz se mantiene, pero la mayoría, idealmente todas las demás proteínas y contaminantes unidos a la matriz se eliminan por lavado. En una etapa de elución, la matriz se trata de tal manera que la molécula que contiene ABD se libera de la matriz en una fracción enriquecida que contiene ABD denominada "fracción de la molécula que contiene ABD", la cual se puede recuperar.

Si, por el contrario, los fines de la separación es la eliminación de la molécula que contiene ABD, esencialmente se siguen los mismos pasos que anteriormente de forma adecuada, con algunas excepciones. El líquido que contiene la molécula que contiene ABD que se va a eliminar, se aplica adecuadamente a una matriz de afinidad en condiciones propicias para unir la molécula que contiene ABD a la matriz. Después de ello, la matriz de afinidad se lava en condiciones tales que la unión de la molécula que contiene ABD a la matriz se mantiene, pero la mayoría, idealmente todas las demás proteínas se recuperan en el flujo a través, obteniendo así una "fracción agotada" con una sustancial reducción de contenido en molécula que contiene ABD, la cual se recupera. Por tanto, los constituyentes del líquido que no son moléculas que contienen ABD y que se habían eliminado en el método de purificación anterior, se pueden recuperar en su lugar y emplear y/o procesar adicionalmente.

Como una alternativa adicional del método inventivo, tanto la "fracción agotada" como la "fracción de molécula que contiene ABD" se pueden recuperar a partir de la misma ronda de separación. Entonces, una vez más, el líquido que contiene la molécula que contiene ABD se aplica adecuadamente a una matriz de afinidad en condiciones propicias para la unión de la molécula que contiene ABD a la matriz. A partir de entonces, se lava la matriz de afinidad, en condiciones tales que la unión de la molécula que contiene ABD a la matriz se mantiene, pero la mayoría, idealmente todas las demás proteínas se recuperan en el flujo a través. La "fracción agotada" obtenida de este modo con una reducción sustancial del contenido en molécula que contiene ABD, se recupera. En una etapa de elución, la matriz se trata de modo que la molécula que contiene ABD se libera de la matriz en una fracción enriquecida de molécula que contiene ABD denominada "fracción de molécula que contiene ABD", la cual se recupera.

En una realización, el método de separación descrito se lleva a cabo en una configuración por lotes. En otra realización, el método se lleva a cabo en una configuración en columna. En todavía otra realización, el método se lleva a cabo usando adsorción en lecho expandido. También es posible llevar a cabo el método descrito usando configuraciones híbridas, tales como la unión en modo por lotes, seguido de lavado y elución en una configuración en columna. La persona experta en la cromatografía de afinidad conoce las alternativas disponibles y puede ponerlas en práctica sin un esfuerzo excesivo.

El polipéptido que se une a ABD descrito en este documento presenta un conjunto de características, las cuales, por ejemplo cuando se acopla a un soporte sólido, hacen que sea adecuado como ligando de afinidad para la separación de moléculas que comprenden ABD. Por ejemplo, en comparación con el uso de albúmina humana como ligando de afinidad, el uso del polipéptido que se une a ABD descrito en el método de separación descrito, muestra las ventajas siguientes:

- Capacidad de separación más alta por ml de matriz acoplada al ligando.
- Compatibilidad con procedimientos repetidos de limpieza *in situ*, por ejemplo, utilizando hidróxido de sodio 0,5 M, lo que hace que el polipéptido que se une a ABD sea útil en la producción a gran escala de agentes terapéuticos.
- Habilitación de condiciones de elución más suaves, por ejemplo, una elución a un pH más alto, lo que hace posible la separación de una gama más amplia de diferentes moléculas que comprenden ABD.

En el contexto de la presente descripción, los términos "muestra" y "líquido" se pueden usar indistintamente. Ningún término implica algún tipo de limitación, por ejemplo, con respecto al volumen de líquido implicado u otras características. El líquido puede tener un volumen pequeño, tal como una parte alícuota de un volumen más grande,

por ejemplo, para fines analíticos; o alternativamente, el mecanismo de alimentación o el líquido usado en una separación a gran escala y/o un proceso de purificación.

5 El método descrito en este documento puede ser útil en una o varias de las diferentes etapas de la purificación. Por lo tanto, se puede utilizar sin limitación, ya sea en una o en varias de una primera etapa de captura, en cualquier etapa de purificación intermedia o en una etapa de pulido final.

10 El experto en la materia apreciará que una purificación con éxito de una proteína diana, utilizando un método de acuerdo con la presente descripción, empleando una resina que comprende un polipéptido que se une a ABD como se describe en este documento, se puede lograr independientemente de dónde está situado el resto ABD en la proteína diana. Por lo tanto, el resto ABD se puede colocar en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de la proteína diana. Alternativamente, la proteína diana puede ser una proteína de fusión que comprende un resto ABD flanqueado por otros restos de proteínas en ambos lados.

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

20 La definición anterior de una clase de secuencia relacionada, polipéptidos que se unen a ABD para uso en el método de separación descrito, se basa en un análisis estadístico de una serie de variantes de polipéptidos aleatorios de una estructura principal parental, que fueron seleccionados por su interacción con ABD en varios experimentos de selección diferentes. El motivo que se une a ABD identificado, o "BM", se corresponde con la región que se une a la diana de la estructura principal parental, esa región constituye dos hélices alfa dentro de un dominio proteico de haz de tres hélices. En la estructura principal parental, los diferentes residuos de aminoácidos de las dos hélices BM constituyen una superficie de unión para una interacción con la parte Fc constante de los anticuerpos. En la presente invención, la variación aleatoria de los residuos de la superficie de unión y la selección posterior de variantes han reemplazado la capacidad de interacción de Fc por una capacidad de interacción con ABD.

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

En una realización, X_2 en dicha secuencia se selecciona a partir de F y L.

En una realización, X_2 en dicha secuencia es F.

En una realización, X_2 en dicha secuencia es L.

En una realización, X_3 en dicha secuencia se selecciona a partir de H, K, R, T y V.

40 En una realización, X_3 en dicha secuencia se selecciona a partir de H, K, R y V.

En una realización, X_3 en dicha secuencia se selecciona a partir de H, K y V.

En una realización, X_3 en dicha secuencia se selecciona a partir de K y R.

En una realización, X_3 en dicha secuencia es K.

En una realización, X_3 en dicha secuencia es R.

45 En una realización, X_3 en dicha secuencia es V.

En una realización, X_4 en dicha secuencia se selecciona a partir de A, H, I, L, N, V y W.

En una realización, X_4 en dicha secuencia se selecciona a partir de H, L N, y V

En una realización, X_4 en dicha secuencia es V.

En una realización, X_4 en dicha secuencia es N.

50 En una realización, X_4 en dicha secuencia es H.

ES 2 674 983 T3

- En una realización, X_4 en dicha secuencia es L.
- En una realización, X_4 en dicha secuencia se selecciona a partir de A, L, N, V y W.
- En una realización, X_4 en dicha secuencia se selecciona a partir de A, N, V y W.
- En una realización, X_4 en dicha secuencia se selecciona a partir de A, N y W.
- 5 En una realización, X_6 en dicha secuencia se selecciona a partir de F y L.
- En una realización, X_6 en dicha secuencia es F.
- En una realización, X_6 en dicha secuencia es L.
- En una realización, X_7 en dicha secuencia se selecciona a partir de K, L, N, Q, R y S.
- En una realización, X_7 en dicha secuencia se selecciona a partir de K, N, Q, R y S.
- 10 En una realización, X_7 en dicha secuencia se selecciona a partir de K, Q, R y S.
- En una realización, X_7 en dicha secuencia se selecciona a partir de K y R.
- En una realización, X_7 en dicha secuencia es K.
- En una realización, X_7 en dicha secuencia es R.
- En una realización, X_{10} en dicha secuencia se selecciona a partir de H, K, N, y R.
- 15 En una realización, X_{10} en dicha secuencia se selecciona a partir de H, K y N.
- En una realización, X_{10} en dicha secuencia se selecciona a partir de K, N y R.
- En una realización, X_{10} en dicha secuencia se selecciona a partir de K y R.
- En una realización, X_{10} en dicha secuencia es N.
- En una realización, X_{10} en dicha secuencia es K.
- 20 En una realización, X_{10} en dicha secuencia es R.
- En una realización, X_{10} en dicha secuencia es H.
- En una realización, X_{11} en dicha secuencia se selecciona a partir de A, F, L, R, T e Y.
- En una realización, X_{11} en dicha secuencia se selecciona a partir de A, F, T e Y.
- En una realización, X_{11} en dicha secuencia es T.
- 25 En una realización, X_{11} en dicha secuencia es A.
- En una realización, X_{11} en dicha secuencia es Y.
- En una realización, X_{11} en dicha secuencia es F.
- En una realización, X_{11} en dicha secuencia se selecciona a partir de A, L, T e Y.
- En una realización, X_{11} en dicha secuencia se selecciona a partir de T e Y.
- 30 En una realización, X_{17} en dicha secuencia se selecciona a partir de F, H y L.
- En una realización, X_{17} en dicha secuencia se selecciona a partir de F y H.
- En una realización, X_{17} en dicha secuencia se selecciona a partir de H y L.
- En una realización, X_{17} en dicha secuencia es F.
- En una realización, X_{17} en dicha secuencia es H.
- 35 En una realización, X_{17} en dicha secuencia es L.
- En una realización, X_{18} en dicha secuencia se selecciona a partir de D, H, I, K y Q.
- En una realización, X_{18} en dicha secuencia se selecciona a partir de D, H y Q.

- En una realización, X_{18} en dicha secuencia se selecciona a partir de H y Q.
- En una realización, X_{18} en dicha secuencia es H.
- En una realización, X_{18} en dicha secuencia es Q.
- En una realización, X_{18} en dicha secuencia es D.
- 5 En una realización, X_{20} en dicha secuencia se selecciona a partir de K y R.
- En una realización, X_{20} en dicha secuencia se selecciona a partir de H y R.
- En una realización, X_{20} en dicha secuencia es R.
- En una realización, X_{20} en dicha secuencia es K.
- En una realización, X_{21} en dicha secuencia se selecciona a partir de I y L.
- 10 En una realización, X_{21} en dicha secuencia es I.
- En una realización, X_{21} en dicha secuencia es L.
- En una realización, X_{25} en dicha secuencia se selecciona a partir de I, L y V.
- En una realización, X_{25} en dicha secuencia se selecciona a partir de V e I.
- En una realización, X_{25} en dicha secuencia es I.
- 15 En una realización, X_{25} en dicha secuencia es V.
- En una realización, X_{25} en dicha secuencia es L.
- En una realización, X_{28} en dicha secuencia es D.
- En una realización, dicha secuencia se define del modo siguiente: independientemente una de otra,
- X_2 se selecciona a partir de F y L;
- 20 X_3 se selecciona a partir de H, K, R, T y V;
- X_4 se selecciona a partir de A, H, I, L, N, V y W;
- X_6 se selecciona a partir de F y L;
- X_7 se selecciona a partir de K, L, N, Q, R y S;
- X_{10} se selecciona a partir de H, K, N y R;
- 25 X_{11} se selecciona a partir de A, F, L, R, T e Y;
- X_{17} se selecciona a partir de F, H y L;
- X_{18} se selecciona a partir de D, H, I, K y Q;
- X_{20} se selecciona a partir de H y R;
- X_{21} se selecciona a partir de I y L;
- 30 X_{25} se selecciona a partir de I, L y V; y
- X_{28} es D.
- En una realización, dicha secuencia se define del modo siguiente: independientemente una de otra,
- X_2 se selecciona a partir de F y L;
- X_3 se selecciona a partir de H, K, T y V;
- 35 X_4 se selecciona a partir de H, L, N y V;
- X_6 se selecciona a partir de F y L;
- X_7 se selecciona a partir de K, R, Q y S;

X₁₀ se selecciona a partir de H, K y N;

X₁₁ se selecciona a partir de A, F, T e Y;

X₁₇ se selecciona a partir de F, H y L;

X₁₈ se selecciona a partir de D, H y Q;

5 X₂₀ es R;

X₂₁ se selecciona a partir de I y L;

X₂₅ se selecciona a partir de I, L y V; y

X₂₈ es D.

10 En una realización más específica se define una subclase del polipéptido que se une a ABD, dicha secuencia cumple al menos cuatro de las seis condiciones I-VI:

I. X₂ se selecciona a partir de F y L;

II. X₆ se selecciona a partir de F y L;

III. X₂₀ se selecciona a partir de H y R;

IV. X₂₁ se selecciona a partir de I y L;

15 V. X₂₅ se selecciona a partir de I y V; y

VI. X₂₈ es D.

En algunos ejemplos de un polipéptido que se une a ABD para uso en el método de separación descrito, dicha secuencia cumple al menos cinco de las seis condiciones I-VI. Más específicamente, dicha secuencia puede cumplir las seis condiciones I-VI.

20 Como se describe en detalle en la sección experimental a continuación, la selección de variantes de polipéptidos que se unen a ABD ha llevado a la identificación de una serie de secuencias individuales de motivos que se unen a ABD (*BM*). Estas secuencias constituyen realizaciones individuales de la secuencia del motivo de unión. Las secuencias de motivos que se unen a ABD individuales se presentan en la Figura 1 y como SEQ ID NO: 1-52. En algunas realizaciones de este aspecto, la secuencia de motivos de unión se selecciona a partir de una cualquiera entre SEQ ID NO: 1-52. Más específicamente, dicha secuencia se puede seleccionar a partir de una cualquiera de SEQ ID NO: 1-7, tal como a partir de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. En particular, dicha secuencia puede ser SEQ ID NO: 1.

30 En algunas realizaciones de la presente descripción, el *BM* como se ha definido anteriormente "forma parte de" un dominio proteico de haz de tres hélices. Esto se entiende que significa que la secuencia del *BM* se "inserta" o se "injerta" en la secuencia del dominio de haz de tres hélices original, de tal manera que el *BM* sustituye a un motivo estructural similar en el dominio original. Por ejemplo, sin desear estar ligado a la teoría, el *BM* se cree que constituye dos de las tres hélices de un haz de tres hélices, y por lo tanto puede reemplazar a un motivo de este tipo de dos hélices dentro de cualquier haz de tres hélices. El experto en la materia se dará cuenta de que reemplazar dos hélices del dominio de haz de tres hélices con las hélices de *BM* se tiene que realizar de modo que no afecte a la estructura básica del polipéptido. Es decir, el plegamiento global de la estructura principal C α del polipéptido de acuerdo con esta realización de la invención, es sustancialmente el mismo que el del dominio proteico de haz de tres hélices del que forma parte, por ejemplo, al tener los mismos elementos de estructura secundaria en el mismo orden, etc. Por lo tanto, un *BM* de acuerdo con la invención "forma parte" de un dominio de haz de tres hélices si el polipéptido de acuerdo con esta realización de la invención tiene el mismo plegamiento que el dominio original, lo que implica que las propiedades estructurales básicas se comparten, en donde esas propiedades, por ejemplo, dan como resultado espectros de CD similares. El experto en la materia conoce otros parámetros que son relevantes.

40 En realizaciones particulares, el motivo que se une a ABD (*BM*), por lo tanto, forma parte de un dominio proteico de haz de tres hélices. Por ejemplo, el *BM* puede estar constituido esencialmente por dos hélices alfa con un bucle de interconexión, dentro de dicho dominio proteico de haz de tres hélices. En realizaciones particulares, dicho dominio proteico de haz de tres hélices se selecciona a partir de dominios de proteínas receptoras bacterianas. Ejemplos no limitantes de tales dominios son los cinco dominios diferentes de tres hélices de la Proteína A de *Staphylococcus aureus*, tal como el dominio B, y sus derivados. En algunas realizaciones, el dominio proteico de haz de tres hélices es una variante de la proteína Z, que se obtiene a partir del dominio B de la proteína A estafilocócica.

50 En realizaciones en las que el polipéptido que se une a ABD para uso en el método de separación descrito forma parte de un dominio proteico de haz de tres hélices, el polipéptido que se une a ABD puede comprender la

secuencia de aminoácidos:

K-[BM]-DPSQS X_aX_bLLX_c EAKKL NDX_dQ;

en donde

[BM] es un motivo que se une a ABD como se ha definido anteriormente;

5 X_a se selecciona a partir de A y S;

X_b se selecciona a partir de N y E;

X_c se selecciona a partir de A, S y C;

X_d se selecciona a partir de A y S.

10 En una realización del polipéptido que se une a ABD para uso en el método de separación descrito, X_a en dicha secuencia es A. En una realización alternativa, X_a en dicha secuencia es S.

En una realización del polipéptido que se une a ABD para uso en el método de separación descrito, X_b en dicha secuencia es N. En una realización alternativa, X_b en dicha secuencia es E.

15 En una realización del polipéptido que se une a ABD para uso en el método de separación descrito, X_c en dicha secuencia es A. En una realización alternativa, X_c en dicha secuencia es S. En todavía otra realización alternativa, X_c en dicha secuencia es C.

En una realización del polipéptido que se une a ABD para uso en el método de separación descrito, X_d en dicha secuencia es A. En una realización alternativa, X_d en dicha secuencia es S.

En una realización del polipéptido que se une a ABD para uso en el método de separación descrito, en dicha secuencia, X_a es A; X_b es N; X_c es A y X_d es A.

20 En una realización adicional del polipéptido que se une a ABD para uso en el método de separación descrito, en dicha secuencia, X_a es A; X_b es N; X_c es C y X_d es A.

En una realización adicional del polipéptido que se une a ABD para uso en el método de separación descrito, en dicha secuencia, X_a es S; X_b es E; X_c es S y X_d es S.

25 En una realización adicional del polipéptido que se une a ABD para uso en el método de separación descrito, en dicha secuencia, X_a es S; X_b es E; X_c es C y X_d es S.

En una realización adicional del polipéptido que se une a ABD para uso en el método de separación descrito, en dicha secuencia, X_a es S; X_b es E; X_c es A y X_d es A.

En una realización adicional del polipéptido que se une a ABD para uso en el método de separación descrito, en dicha secuencia, X_a es S; X_b es E; X_c es C y X_d es A.

30 En una realización adicional más, dicha secuencia en la definición anterior de polipéptidos que se unen a ABD se selecciona a partir de SEQ ID NO: 53-104, en particular de SEQ ID NO: 53-59. En una realización adicional, dicha secuencia se selecciona a partir de SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56. En particular, dicha secuencia puede ser SEQ ID NO: 53.

35 También se describe el uso en el método de separación descrito de un polipéptido que se une a ABD como se ha definido anteriormente, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de:

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

en donde [BM] es un motivo que se une a ABD como se ha definido anteriormente y X_c se selecciona a partir de S y C; y

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

40 También se describe el uso en el método de separación descrito de un polipéptido que se une a ABD como se ha definido anteriormente, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de:

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

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

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

También se describe el uso en el método de separación descrito de un polipéptido que se une a ABD como se ha definido anteriormente, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de:

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

5 en donde [BM] es un motivo que se une a ABD como se ha definido anteriormente y X_c se selecciona a partir de A y C; y

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

En algunas realizaciones, el motivo que se une a ABD puede formar parte de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de

ADNNFNK-[BM]-DPSQSANLLSEAKKLNESQAPK;

10 ADNKFNK-[BM]-DPSQSANLLAEAKKLNDQAQAPK;

ADNKFNK-[BM]-DPSVSKEILAEAKKLNDQAQAPK;

ADAQQNNFNK-[BM]-DPSQSTNVLGEAKKLNESQAPK;

AQHDE-[BM]-DPSQSANVLGEAQLNDSQAPK;

VDNKFNK-[BM]-DPSQSANLLAEAKKLNDQAQAPK;

15 AEAKYAK-[BM]-DPSESSELLSEAKKLNKSQAPK;

VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDQAQAPK;

VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDSQAPK;

AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK;

VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK;

20 VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNKAQAPK; y

AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNKAQAPK.

En una realización, el polipéptido que se une a ABD para uso en el método de separación descrito comprende la secuencia de aminoácidos:

VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDQAQAPK;

25 en donde [BM] es un motivo que se une a ABD como se ha definido anteriormente.

La secuencia de aminoácidos comprendida en un polipéptido de este tipo se puede seleccionar a partir de una cualquiera de SEQ ID NO: 105-156. En particular, dicha secuencia se puede seleccionar a partir de una cualquiera de SEQ ID NO: 105-111, tal como seleccionar a partir de SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107 y SEQ ID NO: 108. En una realización específica de este polipéptido, dicha secuencia es SEQ ID NO: 105.

30 El polipéptido para uso en el método de separación descrito puede estar en forma monomérica o multimérica. En una realización, el polipéptido que se une a ABD está presente en forma multimérica, que comprende al menos dos unidades monoméricas de polipéptidos que se unen a ABD, cuyas secuencias de aminoácidos pueden ser iguales o diferentes. Las formas multiméricas del polipéptido pueden ser ventajosas porque pueden tener propiedades de unión mejoradas.

35 En una realización, dichas unidades monoméricas de polipéptidos que se unen a ABD están acopladas covalentemente entre sí. En una realización particular, las unidades monoméricas de polipéptidos que se unen a ABD se expresan como una proteína de fusión.

40 Los polipéptidos se pueden unir mediante acoplamiento covalente utilizando métodos de química orgánica conocidos, o expresados como uno o varios polipéptidos de fusión en un sistema para la expresión recombinante de polipéptidos, o unidos de cualquier otra manera, ya sea directamente o mediante un enlazador, por ejemplo, un enlazador de aminoácidos.

En una realización, dicho polipéptido que se une a ABD está en forma dimérica. Las posibles formas multiméricas también incluyen formas triméricas. Las formas multiméricas del polipéptido pueden comprender un número adecuado de secuencias de polipéptidos como se han definido anteriormente.

45 La persona experta entenderá que se pueden realizar diversas modificaciones y/o adiciones en un polipéptido que

se une a ABD, de acuerdo con cualquier aspecto dado a conocer en el presente documento con el fin de adaptar el polipéptido a una aplicación específica sin apartarse del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, cualquier polipéptido que se une a ABD, descrito en esta memoria puede comprender otros aminoácidos C-terminales y/o N-terminales. Tal polipéptido debe entenderse como un polipéptido que tiene residuos de aminoácidos adicionales en la primera y/o la última posición en la cadena polipeptídica, es decir, en los extremos N-terminal y/o C-terminal. Por lo tanto, un polipéptido que se une a ABD puede comprender cualquier cantidad adecuada de residuos de aminoácidos adicionales, por ejemplo, al menos un residuo de aminoácido adicional. Cada residuo de aminoácido adicional se puede añadir de forma individual o colectiva con el fin, por ejemplo, de mejorar la producción, la purificación, la estabilización *in vivo* o *in vitro*, el acoplamiento o la detección del polipéptido. Tales residuos de aminoácidos adicionales pueden comprender uno o varios residuos de aminoácidos añadidos con el fin de un acoplamiento químico, lo que podría permitir, por ejemplo, el acoplamiento del polipéptido que se une a ABD a una resina o una matriz, por ejemplo, una resina basada en Sefarosa o una resina de acoplamiento SulfoLink. Un ejemplo de ello es la adición de un residuo de cisteína como residuo de aminoácido adicional, o como uno entre una serie de residuos de aminoácidos adicionales. En una realización, el polipéptido que se une a ABD descrito en este documento comprende un residuo de cisteína en el extremo C-terminal del polipéptido, por ejemplo, en el C-terminal. En una realización, dicha cisteína es una parte de un VDC tripeptídico adicional C-terminal. En una realización, dicha cisteína es una C aislada, C-terminal.

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

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

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

Aunque la invención se ha descrito haciendo referencia a diversas realizaciones a modo de ejemplo, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar varios cambios y unos equivalentes pueden ser sustituidos por elementos de los mismos sin apartarse del alcance de la invención. Además, se pueden realizar muchas modificaciones para adaptar una situación particular o una molécula a las enseñanzas de la invención sin apartarse del alcance esencial de la misma. Por lo tanto, se entiende que la invención no se limita a ninguna realización particular, contemplada para llevar a cabo esta invención, sino que la invención incluirá todas las realizaciones que entren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un listado de las secuencias de aminoácidos de ejemplos de motivos que se unen a ABD comprendidos en polipéptidos que se unen a ABD de la invención (SEQ ID NO: 1-52), ejemplos de polipéptidos que se unen a ABD de 49 meros de acuerdo con la invención (SEQ ID NO: 53-104), ejemplos de polipéptidos que se unen a ABD de 58 meros de acuerdo con la invención (SEQ ID NO: 105-156), así como las secuencias de las variantes de dominios que se unen a albúmina (SEQ ID NO: 157-162) que se utilizan para la selección y el escrutinio, o se utilizan en proteínas de fusión para ilustrar la invención.

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

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

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

La Figura 5 muestra el resultado del estudio de columna II descrito en el Ejemplo 3. La Figura 5A representa las cantidades relativas de muestra liberadas desde cada una de las resinas acopladas a variantes Z que se unen a ABD, o desde una resina de HSA-Sefarosa incluida como referencia, después de una primera (a) o una segunda (b) elución con citrato de sodio 0,1 M, pH 3,0 o HAc 0,5 M, pH 2,5, respectivamente. La Figura 5B muestra el resultado de un análisis SDS-PAGE de las fracciones correspondientes eluidas desde la resina acoplada a la variante Z en la Figura 5A. "M" se refiere a un patrón de proteína teñida previamente Novex Sharp (Invitrogen; PM: 216, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 3,5 kDa) y "muestra cargada" se refiere al extracto bacteriano, que contiene PEP08515, inicialmente cargado en cada resina acoplada a la variante Z. Se cargaron 20 µl del material eluido de

- las resinas acopladas a la variante Z, 5 µl de patrón de proteína o extracto bacteriano se cargaron cada vez en un carril del gel SDS-PAGE. La Figura 5C muestra el resultado del análisis SDS-PAGE de las fracciones correspondientes eluidas desde la resina de HSA Sefarosa en la Figura 5A. Carril 1: Primera elución con citrato de sodio 0,1 M, pH 3,0 (pH 3 (a)). Carril 2: Segunda elución con citrato de sodio 0,1 M, pH 3,0 (pH 3 (b)). Carril 3: Primera elución con HAc 0,5 M, pH 2,5 (pH 2,5 (a)). Carril 4: Segunda elución con HAc 0,5 M, pH 2,5 (pH 2,5 (b)). Se cargaron 20 µl de cada material eluido en el gel de SDS-PAGE. "M" se refiere a un patrón de proteína teñida previamente Novex Sharp (Invitrogen; PM: 216, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 3,5 kDa) del que se cargaron 5 µl.
- La Figura 6 muestra un cromatograma de la purificación por afinidad, llevado a cabo como se describe en el Ejemplo 4, de una proteína de fusión-ABD sobre una resina de EAH-Sefarosa acoplada con His₆-(Z06677)₂-Cys (línea continua). La purificación de una muestra idéntica sobre una resina de Sefarosa acoplada con HSA (línea discontinua), se incluye como referencia. El punto de inyección de la muestra se indica con una flecha. A y B indican las fracciones de flujo a través, y C y D las fracciones eluidas, desde la resina acoplada con His₆-(Z06677)₂-Cys y la resina acoplada con HSA, respectivamente. La elución se realizó con un gradiente lineal de pH que variaba desde pH 5,5 a pH 2,3. El pH (línea de puntos) se controló mediante el medidor de pH incorporado en el sistema de HPLC.
- La Figura 7 muestra la capacidad de unión dinámica de His₆-(Z06677)₂-Cys acoplada a una resina de EAH-Sefarosa (línea continua), medida después de incubaciones alcalinas repetidas llevadas a cabo como se indica y se describe adicionalmente en el Ejemplo 4. La capacidad de unión de HSA acoplada a una resina de Sefarosa (línea discontinua) se incluye como referencia.
- La Figura 8A muestra un cromatograma de la purificación por afinidad de la proteína de fusión PEP10986-ABD sobre agarosa anti-ABD realizado como se describe en el Ejemplo 7. El punto de inyección de la muestra se indica con una flecha. La señal de la absorbancia a 280 nm se muestra (línea continua). FT y E se refieren a la fracción de flujo a través y la fracción eluida, respectivamente. La elución se realizó con HAc 0,1 M, pH 2,9 y el pH (línea de puntos) se vigiló mediante el medidor de pH incorporado en el sistema de HPLC.
- La Figura 8B muestra el resultado del análisis con SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas a partir de la purificación descrita en el Ejemplo 7. Carril 1: Extracto bacteriano clarificado cargado en la columna, Carril 2: Fracción E1, Carril 3: Fracción E2 y Carril 4: Fracción E3. "M" se refiere a un patrón de proteína teñida previamente Novex Sharp (Invitrogen; PM: 216, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 3,5 kDa). Se cargaron 5 µl de cada muestra en los respectivos carriles del gel de SDS-PAGE, excepto para el carril 2, en el que se cargaron 1,25 µl.
- La Figura 9A muestra un cromatograma de la purificación por afinidad de la proteína de fusión PEP03973-ABD sobre agarosa anti-ABD realizado como se describe en el Ejemplo 8. El punto de inyección de la muestra se indica con una flecha. La señal de la absorbancia a 280 nm se muestra (línea continua). FT y E se refieren a la fracción de flujo a través y la fracción eluida, respectivamente. La elución se realizó con HAc 0,1 M, pH 2,9 y el pH (línea de puntos), se vigiló mediante el medidor de pH incorporado en el sistema de HPLC.
- La Figura 9B muestra el resultado del análisis con SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas a partir de la purificación descrita en el Ejemplo 8. Carril 1: Extracto bacteriano clarificado cargado en la columna, Carril 2 y Carril 3: Flujo a través, Carril 4: Fracción E1, Carril 5: Fracción E2, Carril 6: Fracción E3, Carril 7: Fracción E4, Carril 8: Fracción E5. "M" se refiere a un patrón de proteína teñida previamente Novex Sharp (Invitrogen; PM: 216, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 3,5 kDa). Se cargaron 5 µl de cada muestra en los respectivos carriles del gel de SDS-PAGE.
- La Figura 10A muestra un cromatograma de la purificación por afinidad de la proteína de fusión PEP06548-ABD sobre agarosa anti-ABD realizado como se describe en el Ejemplo 9. El punto de inyección de la muestra se indica con una flecha. La señal de la absorbancia a 280 nm se muestra (línea continua). FT y E se refieren a la fracción de flujo a través y la fracción eluida, respectivamente. La elución se realizó con HAc 0,1 M, pH 2,9 y el pH (línea de puntos) se vigiló mediante el medidor de pH incorporado en el sistema de HPLC.
- La Figura 10B muestra el resultado del análisis con SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas a partir de la purificación descrita en el Ejemplo 9. Carril 1: Extracto bacteriano clarificado cargado en la columna, Carril 2: Fracción E1. "M" se refiere a un patrón de proteína teñida previamente Novex Sharp (Invitrogen; PM: 216, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 3,5 kDa). Se cargaron 5 µl en el carril M y en el carril 1 y 5,8 µl se cargaron en el carril 2 del gel de SDS-PAGE.
- La Figura 11A muestra un cromatograma de la purificación de la proteína de fusión PEP17081-ABD sobre agarosa anti-ABD realizado como se describe en el Ejemplo 10. La señal de la absorbancia a 280 nm (línea continua) y la conductividad (línea de puntos) se muestran. El punto de inyección de la muestra se indica con una flecha. FT y E se refieren a la fracción de flujo a través y la fracción eluida, respectivamente.
- La Figura 11B muestra el resultado del análisis con SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas a partir de diferentes estados de la purificación descrita en el Ejemplo 10. Carril M: 5 µl de patrón de proteína teñido previamente Novex Sharp, Invitrogen (216, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 3,5 kDa). Carril 1: 5 µl de lisado de *E. coli* clarificado, tratado con calor que se cargó en la columna de agarosa anti-ABD. Carril 2: 5 µl del flujo a

través de la columna de agarosa anti-ABD (FT en la Figura 11A). Carril 3: 3,6 µl del conjunto eluido desde la columna de agarosa anti-ABD (E en la Figura 11A). Carril 4: 12 µl de PEP17081 purificado adicionalmente mediante RPC (cromatografía de fase inversa) e intercambio de tampón.

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

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

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

25 La Figura 13B muestra el resultado del análisis con SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas a partir de la purificación descrita en el Ejemplo 12. Carril 1: Muestra de proteína cargada en la columna de agarosa anti-ABD. Carril 2: FT. Carriles 4-6: Fracciones de lavado. Carriles 7-13: Fracciones de proteínas eluidas dentro del doble pico marcado en la Figura 13A. Las fracciones correspondientes al primer pico dentro del pico doble se cargaron en los carriles 7-10. Los carriles marcados con "M" se cargaron con un marcador proteico del peso molecular (PM: 200, 116,3, 97,4, 66,3, 55,4, 36,5, 31, 21,5, 14,4, 6, 3,5, 2,5 kDa).

Ejemplos

Los siguientes materiales se utilizaron en este trabajo, excepto cuando se indique lo contrario:

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

Ejemplo 1:

Selección y escrutinio de las variantes Z que se unen a ABD

Materiales y métodos

40 **Biotinilación de la proteína diana:** ABD001 con una cisteína N-terminal (C-ABD001; SEQ ID NO: 158) y PEP07911 (SEQ ID NO: 162) se biotinilaron usando EZ-Link Maleimida PEG₂-Biotina (Pierce, n° de cat. 21901). Brevemente, la proteína se disolvió en fosfato sódico 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5. Se añadió ditiotretol (DTT) hasta una concentración final de 20 mM y las muestras se incubaron durante 1 hora a 34°C con una mezcla de extremo a extremo. El tampón se cambió a tampón de conjugación (fosfato sódico 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0) usando columnas PD-10 desechables (GE Healthcare, n° de cat. 17-0851-01). Un exceso molar de cinco veces (5x) de EZ-Link Maleimida PEG₂-Biotina (disuelto en tampón de conjugación) se añadió a las muestras de proteína y la incubación procedió durante 2 h a temperatura ambiente (TA) con mezcla de extremo a extremo. El cambio de tampón posterior a PBS (fosfato 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, pH 7,4) se realizó utilizando columnas PD-10. PEP07986 (SEQ ID NO: 161) se biotiniló de acuerdo con las recomendaciones del fabricante a TA durante 30 min utilizando No-Weigh EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotina (Pierce, n° de cat. 21327) con un exceso molar de 10x. El cambio de tampón a PBS subsiguiente se realizó usando un casete de diálisis (Slide-a-lyzer 3,5 K, 3500 MWCO, Pierce, n° de cat. 66333) según las instrucciones del fabricante.

55 **Selección de una presentación en fagos de variantes Z que se unen a ABD:** Un banco de variantes aleatorias de la proteína Z que se presentan sobre bacteriófagos, construido en el fagémido pAY02047 esencialmente como se describe en Grönwall et al. (J Biotechnol, 128:162-183, 2007), se utilizó para seleccionar los polipéptidos que se

unen a ABD. El banco, Zlib004Naive.I, utiliza la molécula que se une a la ADN polimerasa *Taq*, Z03639 (descrita en Gunneriusson et al., *Protein Eng* 12:873-878, 1999, en donde se denomina $Z_{TaqS1-1}$) como ligando de fusión. El banco tenía un tamaño real de $1,4 \times 10^{10}$ variantes.

5 Las reservas de fagos se prepararon en un fermentador de 20 l. Las células procedentes de una reserva de glicerol que contenía el banco de fagémidos los Zlib004Naive.I, se inocularon en 20 l de TSB-YE (caldo de soja triptico-extracto de levadura; 30 g/l de TSB, 5 g/l de extracto de levadura) complementado con 2% de glucosa y 100 µg/ml de ampicilina. Los cultivos se realizaron a 37°C en un fermentador (Belach Bioteknik, BR20). Cuando las células alcanzaron una densidad óptica (DO) de 0,7-0,8, aproximadamente 2,6 l del cultivo se infectó usando un exceso molar de 10 veces de fago auxiliar M13K07 (New England Biolabs, nº de cat. N0315S). Las células se incubaron durante 30 min, después de lo cual, el fermentador se llenó hasta 20 l con TSB-YE complementado con IPTG 0,1 mM (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido, para la inducción de la expresión), 25 µg/ml de kanamicina y 12,5 µg/ml de carbenicilina, y las células se cultivaron a 30°C durante 22 h. Las células en el cultivo se sedimentaron mediante centrifugación a 15.900 g y las partículas de fago que permanecían en el medio, precipitaron dos veces en PEG/NaCl (polietilenglicol/cloruro de sodio), se filtraron y se disolvieron en PBS y glicerol como se describe en Grönwall *et al.*, *supra*. Las reservas de fagos se almacenaron a -80°C antes del uso.

15 Las selecciones se llevaron a cabo en tres ciclos frente a las diferentes variantes de ABD biotinilado. La preparación de la reserva de fagos, el procedimiento de selección y la amplificación de los fagos entre los ciclos de selección, se realizaron esencialmente como se describe para la selección frente a otra diana en el documento WO2009/077175. PBS complementado con 0,1% de gelatina y 0,1% de Tween 20 se utilizó como tampón de selección y los complejos de diana-fago fueron capturados directamente mediante perlas de estreptavidina Dynabeads® M-280 (Dyna, nº de cat. 112.06). Se usó 1 mg de perlas por 0,25 µg de ABD. La cepa de *E. coli* XL1-Blue se utilizó para la amplificación de los fagos. La selección se realizó en tres ciclos divididos en tres pistas: una pista que empleaba PEP07911, una pista que empleaba C-ABD001 y una pista que alternaba entre C-ABD001 y PEP07986. En el ciclo 1 de las selecciones, PEP07911 o C-ABD001 100 nM fueron utilizados en las diferentes pistas de selección, y se realizaron dos lavados con PBST al 0,1% (PBS complementado con 0,1% de Tween-20). Un aumento del rigor, usando una concentración de diana reducida y un aumento del número de lavados, se aplicó en los dos ciclos subsiguientes. Para las pistas de selección con una sola diana PEP07911 o C-ABD001 50 nM seguido de 25 nM, fueron utilizados en el ciclo 2 y 3, respectivamente. En la pista con diana alternante, se utilizó PEP07986 75 nM en el ciclo 2 y C-ABD001 40 nM se utilizó en el ciclo 3. Para todas las pistas, se realizaron 4 y 8 lavados en el ciclo 2 y 3, respectivamente, utilizando PBST al 0,1%. Después del lavado, los fagos unidos se eluyeron con 500 µl de glicina-HCl 0,1 M, pH 2,2 seguido de una neutralización inmediata con 50 µl de Tris-HCl, pH 8,0 y 450 µl de PBS. En el último ciclo de selección, todas las pistas se eluyeron primero con HAc 0,5 M, pH 4,0, seguido de elución con glicina-HCl como se ha descrito anteriormente. Los diferentes materiales eluidos fueron tratados posteriormente por separado.

20 Escrutinio con ELISA de variantes Z: Para verificar que las moléculas de variantes Z seleccionadas podrían de hecho interactuar con diferentes variantes de ABD, se realizaron ensayos ELISA. Las variantes Z se produjeron mediante la inoculación de colonias individuales procedentes de las selecciones en 1 ml de medio TSB-YE complementado con 100 µg/ml de ampicilina e IPTG 0,1 mM en placas de pocillos profundos (Nunc, nº de cat. 278752). Las placas se incubaron durante 18-24 horas a 37°C. Las células se sedimentaron por centrifugación, se resuspendieron en 400 µl de PBST al 0,05% y se congelaron a -80°C para liberar la fracción periplásmica de las células. Muestras congeladas se descongelaron posteriormente en un baño de agua y la congelación-descongelación se repitió ocho veces. Se añadieron 400 µl de PBST al 0,05% a las muestras y las células se sedimentaron por centrifugación. El material sobrenadante periplásmico contenía las variantes Z como fusiones con la molécula Z03639 que se unía a la ADN polimerasa *Taq*, expresadas como AQHDEALE-[Z#####]-VDYV-[Z03639]-YVPG. Z##### se refiere a variantes Z individuales con 58 residuos de aminoácidos.

25 Placas de ELISA de media área de 96 pocillos (Costar, nº de cat. 3690) se recubrieron con 50 µl/pocillo de tampón de recubrimiento (carbonato sódico 50 mM, pH 9,6) que contenía 4 µg/ml de un anticuerpo específico para las variantes Z (Affibody, nº de cat. 20.1000.01.0005) y se incubaron durante una noche a 4°C. La solución de anticuerpo se separó por vertido y los pocillos se bloquearon con 100 µl de PBSC (PBS complementado con 0,5% de caseína; Sigma, nº de cat. C8654) durante 2 horas a TA. La solución de bloqueo se desechó y se añadieron 50 µl de solución periplásmica a los pocillos y se incubaron durante 1,5 h a TA bajo agitación lenta. El material sobrenadante se eliminó por vertido y los pocillos se lavaron 4 veces con PBST al 0,05%. A continuación, se añadieron 50 µl de PEP07986 o PEP07911 biotinilado, a una concentración de 2 µg/ml en PBSC, a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 1 h a TA seguido de lavados como se ha descrito anteriormente. Estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano picante; Thermo Scientific, nº de cat. N100) diluida 1:30.000 en PBSC, se añadió a los pocillos y las placas se incubaron durante 45 min. Después de lavar como se ha descrito anteriormente, 50 µl de sustrato ImmunoPure TMB (Thermo Scientific, nº de cat. 34021) se añadieron a los pocillos y las placas se trataron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La absorbancia de los pocillos se midió a 450 nm usando un lector de placas para múltiples pocillos, Victor³ (Perkin Elmer).

30 Como control positivo, una fracción periplásmica que contenía una variante Z que se unía a una proteína diana irrelevante, pero especificada y expresada como anteriormente, se sometió a ensayo frente a 5 µg/ml de esta proteína diana, biotinilada. Como control negativo, la misma preparación periplásmica se sometió a ensayo frente a

PEP07986 o PEP07911. La secuenciación se realizó para los clones con valores de absorbancia positivos frente a PEP07986 o PEP07911.

5 Secuenciación: los fragmentos de PCR fueron amplificados en dos etapas desde colonias individuales utilizando un programa estándar de PCR y los cebadores AFFI-21 (5'-tgctccggctcgatgtgtgtg; SEQ ID NO: 163) y AFFI-22 (5'-cggaaccagagccaccaccgg; SEQ ID NO: 164). La secuenciación de los fragmentos amplificados se realizó usando el oligonucleótido biotinilado AFFI-72 (5'-biotin-cggaaccagagccaccaccgg; SEQ ID NO: 165) y un kit de secuenciación BigDye® Terminator v3.1 Cycle (Applied Biosystems, n° de cat. 4336919), utilizado de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las reacciones de secuenciación se purificaron mediante la unión a perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (perlas Detach Streptavidin Beads, Nordiag, n° de cat. 2012-01) usando Magnatrix 8000 (Magnetic Biosolution) y analizadas sobre un analizador genético ABI PRISM® 3130xl (PE Applied Biosystems).

10 ELISA de bloqueo: Un subconjunto de clones procedentes del escrutinio con ELISA inicial, fueron sometidos a un ensayo de bloqueo con ELISA con el fin de elucidar si la unión de la diana se había visto afectada por la presencia de HSA. Para las variantes Z seleccionadas, se utilizaron las mismas fracciones periplásmicas que anteriormente. El ensayo de bloqueo con ELISA se realizó como el ensayo de escrutinio con ELISA, con la siguiente modificación del protocolo, introducida en la etapa de la diana: HSA se mezcló con la proteína diana antes de la adición a la placa de ensayo. Se mezclaron 0,2 µg/ml de PEP07911 biotinilado con un exceso molar de 10x de HSA y después se incubaron durante 15 min a TA para permitir la formación del complejo antes de la adición a la placa. Como control positivo, una fracción periplásmica que contenía una molécula que se unía a una proteína diana irrelevante y se expresaba como anteriormente, se sometió a ensayo frente a 5 µg/ml de proteína diana específica biotinilada. Como control negativo, la misma preparación periplásmica se sometió a ensayo frente a PEP07911 biotinilado. Como blanco, PBSC se añadió en lugar de una preparación periplásmica y PEP07911 biotinilado se añadió como diana. Todos los controles se prepararon como muestras con y sin adición de HSA del mismo modo que anteriormente.

Resultados

25 Selección de la presentación de fagos de variantes Z que se unen a ABD: Los clones individuales se obtuvieron después de tres ciclos de selecciones de presentación en fagos frente a diferentes variantes de ABD biotinilado. El rendimiento en partículas de fago (partículas de fago positivas/partículas de fago negativas) aumentó en cada ciclo, lo que indicaba el enriquecimiento en clones que se unían a la diana.

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

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

40 Secuenciación: La secuenciación se realizó para los clones con valores de absorbancia positivos frente a ABD en el escrutinio con ELISA. Cada variante tenía un número de identificación único #####, y las variantes individuales se denominaban Z#####. Las secuencias de aminoácidos de las variantes Z con 58 residuos de aminoácidos de longitud se enumeran en la Figura 1 y en la lista de secuencias como SEQ ID NO: 105-156. Los motivos que se unen a ABD deducidos de estas variantes Z se denominan BM##### y se enumeran en la Figura 1 y en la lista de secuencias como SEQ ID NO: 1-52. Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos con 49 residuos de aminoácidos de longitud que se preveía que iban a constituir el haz completo de tres hélices dentro de cada una de estas variantes Z, se denominan P##### y se enumeran en la Figura 1 y en la lista de secuencias como SEQ ID NO: 53-104.

Ejemplo 2:

Clonación y producción de variantes Z que se unen a ABD

50 Materiales y métodos

55 Subclonación de variantes Z: El ADN de siete variantes Z que se unen a ABD, Z06608 (SEQ ID NO: 107), Z06620 (SEQ ID NO: 110), Z06638 (SEQ ID NO: 106), Z06650 (SEQ ID NO: 108), Z06677 (SEQ ID NO: 105), Z06678 (SEQ ID NO: 109) y Z06695 (SEQ ID NO: 111), se amplificó a partir del vector pAY02047 del banco. Una estrategia de subclonación para la construcción de moléculas de variantes Z diméricas con marcador His₆ N-terminal y Cys C-terminal se aplicó usando técnicas de biología molecular convencionales y como se describe con detalle en el documento WO 2009/077175 para variantes Z que se unen a otra diana. Los fragmentos de genes Z se subclonaron en el vector de expresión pAY01449 dando como resultado la secuencia codificada MGSSHHHHHLLQ-

[Z#####][Z#####]-VDC.

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

Se resuspendieron 4,8 g de cada sedimento celular en 30 ml de tampón de unión desnaturizante (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, urea 8 M, pH 7,4) complementado con 29 U/ml de Benzonase® (Merck, n° de cat. 1.01654.0001) y se incubaron con agitación a TA durante 1 h para liberar la proteína expresada. Los residuos celulares se eliminaron por centrifugación y cada material sobrenadante se aplicó sobre una columna de 1 ml His GraviTrap IMAC (GE Healthcare, n° de cat. 11-0033-99). Los contaminantes se eliminaron mediante lavado con tampón de unión desnaturizante, tampón de unión natural (fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, pH 7,4) y tampón de lavado (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 60 mM, pH 7,4) y las variantes Z que se unían a ABD eluyeron posteriormente con tampón de elución (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 250 mM, pH 7,4). Cada variante Z que se unía a ABD purificada se transfirió a NH₄HCO₃ 10 mM mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Las concentraciones de proteína se determinaron midiendo la absorbancia a 280 nm, utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 y usando el coeficiente de extinción de la proteína respectiva. Las variantes Z que se unían a ABD se liofilizaron y la pureza de los productos finales se analizaron por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. La identidad de cada variante Z que se unía a ABD purificada fue confirmada usando un análisis HPLC-MS.

Resultados

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

El análisis con SDS-PAGE de cada preparación de proteína final mostraba que estas contenían predominantemente la variante Z que se une a ABD, respectiva. El peso molecular correcto de cada variante Z que se une a ABD se confirmó por HPLC-MS.

Ejemplo 3:

Evaluación de las características de unión y elución de las variantes Z que se unen a ABD

En este ejemplo, las características de unión y elución de un conjunto de polipéptidos que se une a ABD, seleccionado y producido como se describe en el Ejemplo 1 y 2, respectivamente, fueron estudiadas en un formato a pequeña escala usando columnas de centrifugación.

Materiales y métodos

Acoplamiento de las variantes Z que se unen a ABD a la resina: 1 mg de cada variante Z que se une a ABD liofilizada Z06608, Z06620, Z06638, Z06650, Z06677, Z06678 y Z06695, en el formato His₆-(Z#####)₂-Cys producida como se describe en el Ejemplo 2, se resuspendió en un tampón reductor (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, DTT 20 mM, pH 8,5) y se incubó a TA durante 2 h. Soluciones de proteínas reducidas se transfirieron a un tampón de acoplamiento (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8,5) incluyendo DTT 50 mM, usando cromatografía de exclusión por tamaño, y después se mezclaron con porciones de 0,2 ml de resina de acoplamiento SulfoLink (Thermo Fisher Scientific, n° de cat. 20401). Este procedimiento permite una reacción dirigida a un sitio entre los grupos tiol de los residuos de cisteína C-terminales de las variantes Z que se unen a ABD y los grupos yodoacetilo de la resina, formando un enlace tioéter covalente. La reacción de acoplamiento se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El grado de acoplamiento, definido como mg de variante Z que se une a ABD acoplada por ml de resina de unión, se determinó del modo siguiente: La cantidad de variante Z que se une a ABD acoplada se calculaba restando la cantidad de material no acoplado de la cantidad original de la muestra, en base a concentraciones obtenidas mediante mediciones espectrofotométricas de la absorbancia a 280 nm. La cantidad de variante Z que se une a ABD acoplada en mg, se dividió a continuación por el volumen de la resina de acoplamiento SulfoLink.

Estudio de Columna I: Evaluación de las resinas acopladas a la variante Z que se une a ABD usando una muestra pura: Un primer estudio de columna se realizó para analizar las propiedades de unión, lavado y elución de cada una de las siete variantes Z que se unen a ABD, acopladas a una resina y mediante el uso de una muestra previamente purificada de la proteína de fusión con ABD, PEP08517. PEP08517 comprende el dominio que se une a albúmina PP013 (SEQ ID NO: 160) fusionado en su extremo N-terminal a una variante de la proteína Z que se une a citocina. Porciones de 0,1 ml de las resinas se transfirieron a tubos de ensayo y se añadieron 0,1 ml de una muestra pura de

5 PEP08517 a 2 mg/ml en tampón de acoplamiento. Los tubos se incubaron en una rueda giratoria durante 1 h a TA. Cada mezcla de muestra-resina se transfirió a una columna de centrifugado vacía. La proteína no unida se recogió por centrifugación (flujo a través, FT). Posteriormente se añadieron 0,1 ml de las diferentes soluciones, especificadas en la Tabla 1, para lavar y posteriormente eluir las moléculas de PEP08517 unidas. Cada fracción de lavado y elución se recogió por centrifugación.

Las fracciones recogidas se analizaron en un espectrofotómetro mediante la medición de la absorbancia a 280 nm.

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

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

10 Estudio de columna II: Evaluación de las resinas acopladas a variantes Z que se unen a ABD usando un extracto bacteriano: Un segundo estudio de columna se realizó para estudiar adicionalmente las propiedades de unión, lavado y elución de cuatro resinas acopladas a variantes Z que se unen a ABD procedentes del estudio de columna I. Los ligandos de esas resinas eran His₆-(Z06608)₂-Cys, His₆-(Z06638)₂-Cys, His₆-(Z06677)₂-Cys y His₆-(Z06650)₂-Cys. Una columna adicional empaquetada con HSA Sefarosa (albúmina de suero humano acoplada, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a través de aminas libres con Sefarosa 4 Fast Flow activada con CNBr, GE Healthcare, n° de cat. 17-0981) se incluyó como referencia. Un extracto bacteriano clarificado, preparado a partir de un sedimento de E. coli mediante ultrasonidos y centrifugación, se utilizó como muestra en este experimento. Se transfirieron 0,17 ml del extracto bacteriano, que contenía aproximadamente 0,5 mg de PEP08515 (que comprendía el dominio que se une a albúmina PP013 (SEQ ID NO: 160) fusionado en su extremo N-terminal a una variante que se unía a PDGFR-β (receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas) de la proteína Z) a columnas de centrifugación empaquetadas con cada resina acoplada a una variante Z que se une a ABD respectiva o a HSA Sefarosa. El flujo a través se recogió por centrifugación y se volvió a aplicar dos veces a las columnas. Diferentes soluciones, especificadas en la Tabla 2, se añadieron para eliminar las proteínas hospedadoras bacterianas y para eluir posteriormente las moléculas de PEP08515 unidas. Las fracciones de lavado y elución se recogieron por centrifugación y se analizaron en un espectrofotómetro mediante la medición de la absorbancia a 280 nm, y por SDS-PAGE.

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

Etapa	Muestra / Solución	Abreviatura	Volumen (ml)
1	Muestra: extracto bacteriano que contiene PEP08515	PEP08515	0,17
2	Flujo a través II recogido después de la aplicación de la muestra	FT I	0,17
3	Flujo a través II recogido después de volver a aplicar el flujo a través	FT II	0,17
4	KCl 2,68 mM , KH ₂ PO ₄ 1,47 mM, NaCl 137 mM, Na ₂ HPO ₄ 8,1 mM, pH 7,4	PBS	4 x 0,2

Etapa	Muestra / Solución	Abreviatura	Volumen (ml)
5	NH ₄ Ac 5 mM, pH 5,5	NH ₄ Ac	2 x 0,2
6	Citrato de sodio 0,1 M, pH 3,0	pH 3,0 (a)	0,1
7	Citrato de sodio 0,1 M, pH 3,0	pH 3,0 (b)	0,1
8	HAc 0,5 M, pH 2,5	pH 2,5 (a)	0,1
9	HAc 0,5 M, pH 2,5	pH 2,5 (b)	0,1

Resultados

Eficacia del acoplamiento de polipéptidos que se unen a ABD: El grado de acoplamiento de cada polipéptido que se une a ABD a la resina de acoplamiento SulfoLink se muestra en la Tabla 3.

- 5 Tabla 3: El grado de acoplamiento de las variantes Z que se unen a ABD a la resina SulfoLink

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

- 10 Estudio de Columna I: Evaluación de las resinas acopladas a la variante Z que se une a ABD usando una muestra pura: La cantidad de la muestra PEP08517 liberada a partir de cada una de las siete resinas acopladas a variantes Z que se unen ABD después de las diferentes etapas de lavado y elución especificadas en la Tabla 1, y tal y como se determina mediante la medición de la absorbancia a 280 nm, se muestra en la Figura 4.

En las condiciones estudiadas, las resinas acopladas con las variantes Z que se unen a ABD (His₆-(Z06608)₂-Cys, His₆-(Z06638)₂-Cys, His₆-(Z06650)₂-Cys y His₆-(Z06677)₂-Cys, respectivamente, mostraron el perfil de elución más favorable con una pérdida menor de muestra durante la aplicación de la muestra y el lavado y en donde la mayoría de muestra se liberaba en la elución con un tampón de pH 2,5.

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

- 20 Estudio de columna II: Evaluación de las resinas acopladas a variantes Z que se unen a ABD usando un extracto bacteriano: Las cuatro resinas con mejor rendimiento acopladas a variantes Z que se unen a ABD del estudio de columna I, incluyendo los ligandos de afinidad His₆-(Z06608)₂-Cys, His₆-(Z06638)₂-Cys, His₆-(Z06650)₂-Cys y His₆-(Z06677)₂-Cys, fueron seleccionadas para estudios adicionales de la unión, el lavado y la elución en los que se utilizó un extracto bacteriano que contenía PEP08515 como muestra. La cantidad de PEP08515 liberada a partir de

cada una de las cuatro resinas acopladas a variantes Z que se unen a ABD, o a partir de una resina de HSA-Sefarosa incluida como referencia, después de las diferentes etapas de elución especificadas en la Tabla 2, y como se determinaba mediante la medición de la absorbancia a 280 nm, se muestra en la Figura 5A.

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

10 La pureza de todas las muestras eluidas era en general muy alta (superior al 95%, como se estimó con un análisis con SDS-PAGE), pero se pudieron observar ligeras diferencias para las diferentes variantes Z que se unen a ABD.

15 En comparación con la resina de HSA Sefarosa (análisis con SDS-PAGE mostrado en la Figura 5C), las resinas acopladas a variantes Z que se unen a ABD parecen tener una capacidad de unión superior, así como propiedades de elución más favorables tal y como se juzgó tanto a partir de las lecturas de la absorbancia como del análisis con SDS-PAGE. La diferencia en la capacidad no puede ser debida a diferencias en la densidad de ligando; de hecho, el número de moléculas de HSA acopladas sobre la HSA Sefarosa era de aproximadamente 1,5 - 2,2 veces mayor, en comparación con las resinas acopladas a variantes Z que se unen a ABD.

Ejemplo 4:

Caracterización adicional y estudios de columna de una variante Z que se une a ABD

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

Materiales y métodos

Determinación del punto de fusión mediante análisis de dicroísmo circular:

25 El análisis de dicroísmo circular (DC) se llevó a cabo para determinar el punto de fusión (Pf) de His₆-(Z06677)₂-Cys. La muestra purificada se diluyó hasta 0,5 mg/ml en PBS. Se realizó una medición con temperatura variable (VTM), en la que se controló la absorbancia a 220 nm durante el calentamiento de la muestra desde 20°C a 90°C, con una pendiente de temperatura de 5°C/min. El Pf se determinó a partir del punto medio de la transición en la señal de DC con respecto a la temperatura. La medición del DC se realizó en un espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco Scandinavia AB) utilizando una celda con una longitud de camino óptico de 1 mm.

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

35 El experimento de elución se realizó utilizando un sistema cromatográfico ÄKTAexplorer 10 (GE Healthcare). Las dos columnas estaban fijadas al sistema y equilibradas con PBS. Se cargaron 2 ml de una muestra que contenía 1 mg de PEP08519 (que comprendía el dominio que se une a albúmina PP013 (SEQ ID NO: 160) fusionado en su extremo N-terminal a una variante de la proteína Z que se unía a polimerasa *Taq*) en cada columna seguido por un lavado con PBS y citrato de sodio 0,1 M, 0,9% de NaCl, pH 5,5. La proteína unida eluyó con un gradiente lineal de pH que variaba desde pH 5,5 a pH 2,3 (usando citrato de sodio 0,1 M, 0,9% de NaCl, pH 5,5, y citrato de sodio 0,1 M, 0,9% de NaCl, pH 2,3) en más de 16 volúmenes de columna (VC). El pH se controló mediante el medidor de pH incorporado en el sistema ÄKTAexplorer.

45 Estudio cromatográfico de la capacidad de unión y la resistencia a los álcalis de un polipéptido que se une a ABD: En este experimento, la capacidad de unión dinámica y la resistencia a los álcalis se sometió a ensayo para la resina His₆-(Z06677)₂-Cys y una resina de HSA Sefarosa empaquetada en columnas Tricorn 5/50 utilizadas en el estudio cromatográfico descrito en la sección anterior.

50 El experimento se realizó utilizando un sistema cromatográfico ÄKTAexplorer 10. Las dos columnas estaban fijadas al sistema y equilibradas con PBS. Para el estudio de la capacidad, una muestra que contenía 0,25 mg/ml de PEP08519 en PBS se cargó en cada columna con un caudal de 0,2 ml/min (correspondiente a un tiempo de residencia de 2,4 min) hasta que la absorbancia a 280 nm de la solución que emergía de las columnas alcanzaba el 10% de la absorbancia de la muestra original (es decir, 10% de avance). El volumen muerto (es decir, el volumen de los tubos y la columna, medido mediante la ejecución de una muestra a través de una columna que no comprendía ligando de afinidad) se restó del volumen de la muestra. La proteína unida eluyó con citrato de sodio 0,1 M, 0,9% de NaCl, pH 2,3. Las columnas se volvieron a equilibrar después con PBS.

55

Después de las ejecuciones de la capacidad, las columnas se sometieron a un tratamiento con álcali mediante la aplicación de 5 VC de NaOH 0,2 M con un caudal de 1 ml/min, seguido de un período de incubación sin flujo. El tiempo total de incubación en álcali era de 25 min. La neutralización de las columnas se llevó a cabo mediante un lavado con 5 VC de PBS a 1 ml/min, seguido de una nueva medición de la capacidad como se ha descrito anteriormente.

5

Dos tratamientos más con álcali, seguidos de mediciones de la capacidad se llevaron a cabo como anteriormente, pero con la concentración de NaOH incrementada a 0,5 M y, en el último tratamiento alcalino, el tiempo de incubación se extendió a 2 h.

Resultados

10 Análisis del dicroísmo circular: El punto de fusión de His₆-(Z06677)₂-Cys se determinó que era de 54°C.

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

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

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

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

25

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

30

Ejemplo 5:

Estudios de columna de una variante Z que se une a ABD inmovilizados sobre diferentes resinas

35 En este ejemplo, la variante Z que se une a ABD His₆-(Z06677)₂-Cys se inmovilizó sobre cuatro tipos diferentes de resinas, y la capacidad de unión y la resistencia a los álcalis se evaluaron mediante cromatografía.

Materiales y métodos

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

40

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

45

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

50 Se determinó el grado de acoplamiento para cada resina como se ha descrito en el Ejemplo 3.

Estudio cromatográfico de la capacidad de unión y la resistencia a los álcalis de las cuatro resinas que se unen a ABD: Las cuatro resinas acopladas a His₆-(Z06677)₂-Cys se empaquetaron en columnas Tricorn 5/50. La capacidad

de unión dinámica se sometió a ensayo, después de lo cual las resinas fueron sometidas a NaOH 0,5 M durante 2 h, seguido de un segundo ensayo de la capacidad de unión dinámica. Los ensayos de la capacidad y las incubaciones alcalinas se llevaron a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 4.

Resultados

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

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

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

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

Tabla 6: La capacidad de unión dinámica de His₆-(Z06677)₂-Cys acoplada a diferentes resinas

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

- 15 Las capacidades de unión dinámicas de las dos resinas acopladas a yodoacetilo, de la resina acoplada a SulfoLink y de la EAH Sefarosa activada, se determinaron para 2,3 y 3,4 mg de muestra por ml de resina, respectivamente. Sin embargo, cuando se comparaba la cantidad molar de muestra que se puede unir por mol de ligando de afinidad, estas resinas muestran la misma capacidad de unión dinámica (1,4 mol de la muestra/mol de ligando His₆-(Z06677)₂-Cys). En otras palabras, para His₆-(Z06677)₂-Cys acoplada a la resina SulfoLink, las dos moléculas Z dentro del dímero se unen cada una a una molécula de la muestra con un grado más alto en comparación con His₆-(Z06677)₂-Cys acoplada a una resina de EAH Sefarosa.

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

- 25 La capacidad de unión dinámica de la resina NHS era menos de la mitad en comparación con la resina CNBr, a pesar del hecho de que la resina NHS tiene un brazo espaciador que mejoraría teóricamente la capacidad, haciendo que los ligandos de afinidad sean más accesibles.

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

5 Tabla 7. Comparación de las capacidades de unión dinámica antes y después del tratamiento alcalino.

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

Ejemplo 6:

Producción de agarosa anti-ABD

10 Este ejemplo describe una producción a mayor escala de la variante Z que se une que se une a ABD, Z06677 en un formato dimérico y con una Cys C-terminal, es decir, (Z06677)₂-Cys, y su posterior inmovilización sobre una resina de acoplamiento SulfoLink.

Materiales y métodos

15 Cultivo y purificación: La variante Z que se une a ABD, Z06677 se subclonó como un dímero en un vector de expresión en el que la expresión estaba regulada por un promotor T7. El polipéptido que se une a ABD se expresaba con la secuencia de aminoácidos N-terminal adicional GSSLQ y la secuencia de aminoácidos C-terminal adicional VDC. Por lo tanto, el polipéptido expresado tiene la secuencia GSSLQ-[Z06677]₂-VDC. Células de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) fueron transformadas con el plásmido y se cultivaron a 37°C en 20 l de medio TSB + YE (caldo de soja triptica con extracto de levadura) complementado con 50 µg/ml de kanamicina. Con una DO₆₀₀ = 1, IPTG con una concentración final de 0,17 mM, se añadió para inducir la expresión de proteínas y el cultivo se incubó a 37°C durante otras 5 h. Las células se recogieron por centrifugación.

20 Como se observa en el Ejemplo 4 y el Ejemplo 5, se demostró que His₆-(Z06677)₂-Cys era resistente a los álcalis. Esta propiedad fue aprovechada en la purificación de (Z06677)₂-Cys, ya que concentraciones elevadas de NaOH contribuyen tanto a la ruptura celular como a la purificación, y una gran parte de las proteínas del hospedador *E. coli* se desnaturalizan a un pH alto, mientras que (Z06677)₂-Cys permanece en la solución.

25 Se resuspendieron 165 g de sedimento celular en 1,2 l de NaOH 0,5 M mediante el uso de Ultra-Turrax T-50 basic (IKA WERKE). La suspensión se incubó durante 1 h a TA con agitación y luego se congeló a -20°C. La muestra congelada se descongeló y se valoró a pH 8,2 mediante la adición de 300 ml de HCl 2 M y Tris base hasta una concentración final de 20 mM. Se retiraron los residuos celulares, la proteína desnaturalizada y el ADN por centrifugación. A la muestra clarificada, se añadieron 800 ml de [Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, 4,6 g de DTT] y Benzonase® (Merck, nº de cat. 1.01654.0001) hasta una concentración final de 10 U/ml y la incubación procedió durante 1 h a TA. A partir de entonces, se añadieron 300 g de sulfato de amonio hasta una concentración de 1 M, y la muestra se incubó a TA con agitación durante 40 min. La proteína precipitada después de la adición del sulfato de amonio se retiró mediante centrifugación, seguido de filtración a través de un filtro para la parte superior de una botella de Nalgene (0,45 µm).

35 Se añadió acetonitrilo (ACN) a la muestra hasta una concentración de 2% (v/v). La muestra se cargó en una columna FineLine 35 (GE Healthcare) empaquetada con 125 ml de SOURCE 30 RPC (GE Healthcare) mediante el uso de un sistema de cromatografía ÄKTAexplorer 100 (GE Healthcare). La columna se lavó con 2% de ACN en agua Milli-Q que contenía 0,1% de TFA (ácido trifluoroacético) seguido de lavado con un tampón idéntico, que contenía 4% de ACN. La proteína unida eluyó aumentando la concentración de ACN de 4% a 25% de ACN durante

15 VC. Las fracciones eluidas se recogieron y se analizaron por SDS-PAGE y LC-MS. Las fracciones pertinentes se combinaron y se transfirieron a tampón de acoplamiento (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8,5) mediante cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna XK-50 (GE Healthcare) empaquetada con 500 ml de Sephadex G-25 (GE Healthcare). La muestra con el tampón cambiado se analizó mediante espectrometría midiendo la absorbancia a 280 nm y mediante SDS-PAGE, cargando diversas cantidades diferentes de (Z06677)₂-Cys, y tiñendo posteriormente con azul de Comassie.

Acoplamiento del polipéptido que se une a ABD (Z06677)₂-Cys a la resina: La muestra que contenía (Z06677)₂-Cys a una concentración de 3,4 mg/ml en tampón de acoplamiento, se redujo mediante la adición de DTT a una concentración de 20 mM, seguido de incubación con agitación durante 1 h a TA. El DTT se eliminó mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna XK-50 empaquetada con 500 ml de Sephadex G-25, equilibrada previamente con tampón de acoplamiento. El (Z06677)₂-Cys reducido se mezcló con la resina de acoplamiento SulfoLink (Thermo Scientific, n° de cat. 20404) en una proporción de 6 mg de (Z06677)₂-Cys por ml de resina. La posterior reacción de acoplamiento se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero la incubación de la mezcla de proteína-resina se extendió de 15 a 35 min. La eficacia del acoplamiento se estimó mediante análisis SDS-PAGE de la proteína no acoplada.

Resultados

Cultivo y purificación: La variante Z que se une a ABD dimérica purificada (Z06677)₂-Cys se analizó en un espectrofotómetro mediante la medición de la absorbancia a 280 nm y mediante SDS-PAGE. (Z06677)₂-Cys carece de triptófanos, dando como resultado lecturas bajas de la absorbancia a 280 nm. Por consiguiente, la concentración de la molécula de la variante Z se estimó a partir del análisis de SDS-PAGE, que incluía varias cantidades diferentes de (Z06677)₂-Cys. La inspección visual del gel de SDS-PAGE estimaba la concentración de (Z06677)₂-Cys en 3,4 mg/ml con una pureza de aproximadamente el 95%.

Acoplamiento del polipéptido que se une a ABD (Z06677)₂-Cys a la resina: La densidad del ligando se estimó en 5,8 mg de (Z06677)₂-Cys/ml de resina de acoplamiento SulfoLink mediante una inspección visual de una ejecución de gel de SDS-PAGE de la fracción de proteína no acoplada de la reacción de acoplamiento.

A la resina acoplada a (Z06677)₂-Cys producida se hace referencia adicionalmente como "agarosa anti-ABD", y en los siguientes Ejemplos se utilizó para demostrar la amplia capacidad de aplicación de la resina, en términos de unión a diferentes restos del dominio que se une a albúmina, en fusión con diferentes proteínas de diferentes tamaños y funciones. Se muestra que se consigue una purificación con éxito, independientemente de dónde está situado el resto ABD en la proteína diana. En otras palabras, el resto ABD se puede colocar en el extremo N-terminal, en el extremo C-terminal o incluso dentro de una proteína de fusión, de tal manera que está flanqueado por otros restos de proteínas en cada lado.

Ejemplo 7:

Purificación de PEP10986 usando agarosa anti-ABD

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

Materiales y métodos

Células de *E. coli* sedimentadas que albergaban PEP10986 soluble se suspendieron en tampón TST (Tris, solución salina, Tween: Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, NaCl 200 mM, 0,05% de Tween 20, pH 8,0) complementado con 20 U/ml de Benzonase®. Las células se rompieron con ultrasonidos y los restos celulares se eliminaron por centrifugación. La cromatografía se realizó utilizando un sistema ÄKTAexplorer 100. La muestra clarificada se aplicó sobre una columna XK-50 empaquetada con 100 ml de agarosa anti-ABD (preparada como se describe en el Ejemplo 6) y equilibrada previamente con TST. La columna se lavó con 8 VC de TST seguido de 8 VC de NH₄Ac 5 mM pH 5,5. La proteína unida eluyó mediante la aplicación de 3 VC de HAc 0,1 M, pH 2,9. Las fracciones de flujo a través, las fracciones de lavado y las fracciones eluidas se recogieron para otros análisis por SDS-PAGE y HPLC-MS.

Para investigar la resistencia y la estabilidad alcalina de la resina de agarosa anti-ABD, varias purificaciones, cada una seguida por un ciclo de CIP (limpieza in situ) de 2-3 volúmenes de columna de NaOH 0,5 M, se llevaron a cabo posteriormente utilizando la misma columna que anteriormente.

Resultados

El cromatograma de la purificación de PEP10986 sobre la resina de agarosa anti-ABD se presenta en la Figura 8A y el análisis con SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas se muestra en la Figura 8B. Las fracciones eluidas E1, E2 y E3, que se corresponden con el carril 2, 3 y 4, respectivamente, en la Figura 8B, se agruparon. La masa correcta de PEP10986 se verificó por análisis HPLC-MS y la pureza se estimó que era superior al 95% como se

juzgó a partir del análisis con SDS-PAGE. De acuerdo con el análisis espectrofotométrico, la agrupación contenía 908 mg de PEP10986 purificado, que corresponde a un rendimiento de aproximadamente el 90%.

5 La resistencia y la estabilidad alcalina de la resina de agarosa anti-ABD se confirmó mediante purificaciones adicionales tanto de PEP10986 como de otras moléculas de fusión con ABD, cada una seguida por un ciclo CIP (limpieza *in situ*) de 2-3 volúmenes de columna de NaOH 0,5 M, usando la misma columna que en ese Ejemplo. Después de 23 ciclos CIP, todavía no se había observado ninguna disminución significativa de la capacidad.

Ejemplo 8:

Purificación de PEP03973 utilizando agarosa anti-ABD

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

Materiales y métodos

15 Células de *E. coli* sedimentadas que albergaban PEP03973 soluble, se suspendieron en tampón TST complementado con 20 U/ml de Benzonase®. Las células se rompieron con ultrasonidos y los restos celulares se eliminaron por centrifugación. La cromatografía se realizó utilizando un sistema ÄKTAexplorer 100. La muestra clarificada se aplicó sobre una columna XK-50 empaquetada con 100 ml de agarosa anti-ABD (preparada como se describe en el Ejemplo 6) y equilibrada previamente con TST. La columna se lavó con 5 VC de TST seguido de 3 VC de NH₄Ac 5 mM pH 5,5. La proteína unida eluyó mediante la aplicación de 3 VC de HAc 0,1 M, pH 2,9. Las fracciones de flujo a través, las fracciones de lavado y las fracciones eluidas se recogieron para otros análisis por SDS-PAGE y HPLC-MS.

Resultados

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

Ejemplo 9:

30 Purificación de PEP06548 utilizando agarosa anti-ABD

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

Materiales y métodos

40 Sedimentos de células de *E. coli* que albergaban PEP06548 soluble se suspendieron en tampón TST complementado con 27 U/ml de Benzonase®. Las células se rompieron con ultrasonidos y los restos celulares se eliminaron por centrifugación. Las cisteínas C-terminales de las moléculas de la muestra de PEP06548 se redujeron mediante la adición de DTT hasta una concentración final de 20 mM, seguido de incubación durante 30 min a TA. La cromatografía se realizó utilizando un sistema ÄKTAexplorer 100. La muestra clarificada y reducida se aplicó sobre una columna XK-16 empaquetada con 9 ml de agarosa anti-ABD y equilibrada previamente con TST. Este lote de agarosa anti-ABD se preparó esencialmente como se describe en el Ejemplo 6, excepto una densidad de ligando menor de aproximadamente 2,3 mg de (Z06677)₂-Cys por ml de resina. La columna se lavó con 5,5 VC de TST seguido de 3,3 VC de NH₄Ac 5 mM pH 5,5. La proteína unida eluyó mediante la aplicación de 2,9 VC de HAc 0,1 M, pH 2,9. Las fracciones se recogieron para análisis adicionales mediante SDS-PAGE y HPLC-MS.

Resultados

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

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

Ejemplo 10:

Purificación de PEP17081 usando agarosa anti-ABD

- 5 En este ejemplo, PEP17081 (18,6 kDa), que comprende un dominio que se une a albúmina (PEP07986, SEQ ID NO: 161) fusionado a dos restos de una variante de la proteína Z que se une a citocina en el formato Z-PEP07986-Z, se purificó utilizando una columna empaquetada con agarosa anti-ABD. La purificación posterior también se describe.

Materiales y métodos

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

- 15 Una primera etapa de purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad de agarosa anti-ABD utilizando un sistema de ÄKTApurifier 100. La muestra clarificada se aplicó sobre una columna XK-26 empaquetada con 25 ml de agarosa anti-ABD y equilibrada previamente con 2x TST (es decir, tampón TST con todos los componentes con una concentración doble). La columna se lavó con 5 VC de 2x TST seguido de 8 VC de NH₄Ac 5 mM, pH 5,5. La proteína unida eluyó mediante la aplicación de 3 VC de HAc 0,1 M, pH 2,9. Las fracciones se recogieron para un análisis adicional mediante SDS-PAGE y HPLC-MS.

- 20 Una segunda etapa de purificación se realizó mediante RPC, utilizando un sistema ÄKTAexplorer 100. La proteína eluida de la columna de agarosa anti-ABD se complementó con acetonitrilo hasta una concentración final del 10% y se cargó sobre una columna HR-16 (GE Healthcare) empaquetada con 24 ml de SOURCE 15 RPC (GE Healthcare) y equilibrada previamente con 10% de acetonitrilo, 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua Milli-Q (Disolvente A). La columna se lavó con 3,9 VC de Disolvente A. El material unido eluyó con un gradiente lineal de 15 VC de incremento de concentración de 80% de acetonitrilo, 0,1% de TFA en agua Milli-Q (Disolvente B), terminando en 50% de Disolvente B. Las fracciones se recogieron para análisis posteriores mediante SDS-PAGE y HPLC-MS.

- 25 Una tercera etapa de purificación y de intercambio de tampón se realizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando un sistema ÄKTAexplorer 100. Las fracciones seleccionadas eluidas de la columna de RPC se agruparon y se cambió el tampón a 1x PBS sobre una columna XK-50 empaquetada con 500 ml de Sephadex G-25 (GE Healthcare). Las fracciones se recogieron para análisis posteriores mediante SDS-PAGE y HPLC-MS.

30 *Resultados*

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

- 35 El tratamiento térmico de las células de *E. coli* servía tanto como una etapa de ruptura celular como una etapa de purificación. PEP17081 es resistente al calor mientras que muchas otras proteínas de *E. coli* no y en consecuencia precipitaban tras el calentamiento. Como resultado, el material cargado sobre la columna de agarosa anti-ABD era relativamente puro (carril 1, Figura 11B).

- 40 La gran mayoría de PEP17081 se unía a la resina de agarosa anti-ABD, lo que se demuestra por la ausencia aparente de PEP17081 en la muestra del flujo a través (carril 2, Figura 11B). Según el análisis espectrofotométrico, la agrupación eluida contenía 330 mg de PEP17081, correspondiente a una capacidad de unión de 13 mg de PEP17081 por ml de resina y un rendimiento superior al 95%. La pureza de PEP17081 eluido se estimó que era superior al 95% según se juzgó a partir del análisis con SDS-PAGE (carril 3, Figura 11B). Se obtuvo un aumento adicional de la pureza después de la RPC y el intercambio de tampón mediante SEC (carril 4, Figura 11B). La masa correcta de PEP17081 se verificó mediante un análisis de HPLC-MS.

Ejemplo 11:

- 45 Purificación de una hormona proteica usando agarosa anti-ABD

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

Materiales y métodos

- 50 La Proteína 1 se expresaba en *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión. Después de la solubilización y el replegamiento de los cuerpos de inclusión, el material se analizó tres veces con cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para estudiar el intercambio de tampón y la purificación. Se cargaron 8 mg de la Proteína 1 purificada

mediante SEC, en PBS diluido 1:10 en TST, a 0,5 ml/min sobre una columna XK 16/20 (GE Healthcare) empaquetada con 10-12 ml de agarosa anti-ABD y equilibrada previamente con TST. La columna se lavó con 4 VC de TST, seguido de un lavado adicional con 3 VC con NH₄Ac 5 mM, pH 5,5, con un caudal de 1 ml/min. La proteína unida eluyó con 3 VC de HAc 0,1 M, pH 2,9, y después se neutralizó hasta pH 7 con Tris-HCl 1 M, pH 9. Las fracciones de flujo a través, las fracciones de lavado y las fracciones eluidas se recogieron para un análisis posterior mediante SDS-PAGE. Geles de 4-12% de Bis-Tris NuPAGE (Invitrogen) se ejecutaron de forma no reducida y la proteína se tiñó con Simply Blue (Life Technologies). La columna se volvió a equilibrar con TST después de la elución y se limpió *in situ* (CIP) con 3 VC de NaOH 0,5 M seguido de 3 VC de TST. Entre las purificaciones, la resina se almacenó en TST + 20% de etanol.

10 Resultados

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

20 De los 8 mg iniciales de proteína 1 purificada mediante SEC, se recogieron 5,4 mg en las fracciones eluidas de la columna de agarosa anti-ABD, lo que daba como resultado un rendimiento de aproximadamente el 68%. Aunque no se detectó ninguna proteína en la muestra de flujo a través cargada en el carril 5 (Figura 12B), había alguna pérdida de Proteína 1 después del lavado con TST así como la eliminación de dímeros y proteínas contaminantes.

Ejemplo 12

25 Purificación de una hormona peptídica usando agarosa anti-ABD

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

Materiales y métodos

30 Cien ml de material sobrenadante de *Pichia Pink* que contenían Proteína 2 secretada, se liofilizaron y se resuspendieron en 2 ml de DMSO (sulfóxido de dimetilo) y posteriormente se diluyeron con 200 ml de TST. La muestra se cargó a 1 ml/min en una columna XK 16/20 empaquetada con 10-12 ml agarosa anti-ABD y equilibrada previamente con TST. La columna se lavó con 8 VC de TST, seguido de un lavado adicional de 3 VC con NH₄Ac 5 mM, pH 5,5. El lavado habitual de 4 VC de TST se incrementó debido a la alta densidad de proteínas contaminantes del medio. La proteína unida eluyó con 3 VC de HAc 0,1 M, pH 2,9 y después se ajustó a pH 4 con Tris-HCl 1 M, pH 9. La columna se volvió a equilibrar con TST después de la elución seguido de CIP y almacenamiento en TST + 20% de etanol. Las fracciones de flujo a través, las fracciones de lavado y las fracciones eluidas se recogieron para un análisis posterior mediante SDS-PAGE.

Resultados

40 El cromatograma de la purificación de la Proteína 2 sobre la resina de agarosa anti-ABD se presenta en la Figura 13A y se muestra el análisis con SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas en la Figura 13B. El pico de elución desde la columna de agarosa anti-ABD contenía 3-5 mg de Proteína 2, que se corresponde con un rendimiento de aproximadamente el 75% (estimada a partir de una transferencia Western). La masa correcta de la Proteína 2 eluida se verificó mediante un análisis con HPLC-MS. La pureza se estimó que era superior al 98% a juzgar por el análisis de SDS-PAGE seguido por tinción con Simply Blue. No se pudieron detectar proteínas contaminantes del medio en las fracciones de elución (carriles 7-13, Figura 13B). Se reconoce que la Proteína 2 en los geles de SDS-PAGE tiene recorridos más cortos, tal y como se indica por los patrones del peso molecular incluidos en los geles.

Lista de Secuencias

<110> AFFIBODY AB

50 <120> NUEVO MÉTODO

<130> 21066537

<150> EP12189948.8

<151> 2012-10-25

<150> US 61/718,246
 <151> 2012-10-25

<160> 165

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 1

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

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

<210> 2

<211> 29

15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 2

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

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

<210> 3

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 3

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

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

<210> 4

30 <211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

35 <400> 4

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

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

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

5 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 5
 Glu Leu Arg Trp Ala Leu Asn Glu Ile Arg Arg Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

10 <210> 6
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

15 <400> 6
 Glu Phe Arg Ala Ala Leu Leu Glu Ile Lys Leu Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

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

20 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 7
 Glu Phe Thr Ile Ala Leu Arg Glu Ile His Ala Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

25 <210> 8
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

30 <400> 8
 Glu Leu Arg Lys Ala Phe His Glu Ile Gln Ile Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

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

35 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 9

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

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

<210> 10

<211> 29

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 10

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

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

10

<210> 11

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 11

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

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

20

<210> 12

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

25

<400> 12

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

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

30

<210> 13

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 13

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

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

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

5 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 14
 Glu Leu Lys Ala Ala Phe Arg Glu Ile Asn Asp Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

10 <210> 15
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

15 <400> 15
 Glu Leu Lys Met Ala Phe Gln Glu Ile Arg Tyr Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

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

20 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 16
 Glu Trp Lys Lys Ala Leu Arg Glu Ile His Tyr Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

25 <210> 17
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

30 <400> 17
 Glu Phe Glu Lys Ala Leu Val Glu Ile Lys Thr Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

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

35 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 18

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

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

<210> 19

<211> 29

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 19

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

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

10

<210> 20

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 20

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

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

20

<210> 21

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

25

<400> 21

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

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

30

<210> 22

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 22

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

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

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

5 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 23
 Glu Leu Gly Val Ala Leu Lys Glu Ile Gly Gln Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

10 <210> 24
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

15 <400> 24
 Glu Leu Ser Ile Ala Leu Asn Glu Ile Lys Gly Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

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

20 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 25
 Glu Ile Arg Ser Ala Tyr Lys Glu Ile Asn Val Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

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

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

30 <400> 26
 Glu Leu Ser Ser Ala Leu Leu Glu Ile Ser His Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

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

35 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 27

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

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

<210> 28

<211> 29

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 28

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

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

10

<210> 29

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 29

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

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

20

<210> 30

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

25

<400> 30

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

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

30

<210> 31

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 31

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

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

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

5 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 32
 Glu Leu Gln Arg Ala Phe Ala Glu Ile Gln Ser Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

10 <210> 33
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

15 <400> 33
 Glu Leu Lys Ala Ala Phe Arg Glu Ile Arg Thr Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

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

20 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 34
 Glu Leu Thr Thr Ala Met Lys Glu Ile Gln Ala Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

25 <210> 35
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

30 <400> 35
 Glu Asp Met Arg Ala Phe His Glu Ile Asn Lys Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

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

35 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 36

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

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

<210> 37

<211> 29

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 37

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

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

10

<210> 38

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 38

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

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

20

<210> 39

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

25

<400> 39

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

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

30

<210> 40

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 40

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

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

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

5 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 41
 Glu Glu Gln Thr Ala Met Gln Glu Ile Asn Ser Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

10 <210> 42
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

15 <400> 42
 Glu Leu Gly Trp Ala Phe Arg Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

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

20 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 43
 Glu Asn Leu Trp Ala Phe Asn Glu Ile Lys Gly Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

25 <210> 44
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

30 <400> 44
 Glu Leu Ser Phe Ala Phe Ser Glu Ile Asn Val Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

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

35 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 45
 Glu Phe Arg Gly Ala Ile Ala Glu Ile Arg Asp Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

<210> 46
 <211> 29
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 46
 Glu Glu Glu Asn Ala Tyr Lys Glu Ile Gly Ser Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

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

15 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 47
 Glu Leu Arg Gln Ala Leu Gln Glu Ile His Ile Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

20 <210> 48
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

25 <400> 48
 Glu Asn His Ala Ala Phe Gln Glu Ile Leu Ser Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

<210> 49
 <211> 29
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 49
 Glu Thr Asn Tyr Ala Phe Lys Glu Ile Asp Leu Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

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

5 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 50
 Glu Ile Ser Leu Ala Phe Lys Glu Ile Lys Ala Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

10 <210> 51
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

15 <400> 51
 Glu Leu Ser Lys Ala Leu Thr Glu Ile Arg Met Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

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

20 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 52
 Glu Leu Asp Met Ala Tyr Thr Glu Ile Gly Leu Leu Pro Asn Leu Thr
 1 5 10 15

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

25 <210> 53
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

30 <400> 53
 Lys Glu Leu Lys Val Ala Phe Lys Glu Ile Asn Thr Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15

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

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

 Gln

ES 2 674 983 T3

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

5 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 54
 Lys Glu Leu Val Asn Ala Phe Ser Glu Ile Lys Ala Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15
 Thr Leu His Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30
 Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

Gln

10 <210> 55
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

15 <400> 55
 Lys Glu Leu His His Ala Phe Arg Glu Ile Lys Phe Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15
 Thr Phe His Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30
 Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

Gln

20 <210> 56
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 56
 Lys Glu Phe Lys Leu Ala Leu Gln Glu Ile His Tyr Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15
 Thr Leu Asp Gln Arg Leu Ala Phe Ile Leu Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30
 Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

Gln

25 <210> 57
 <211> 49

ES 2 674 983 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

5 <400> 57
 Lys Glu Leu Arg Trp Ala Leu Asn Glu Ile Arg Arg Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15
 Thr Phe Lys Gln His Ile Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30
 Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

Gln

10 <210> 58
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

15 <400> 58
 Lys Glu Phe Arg Ala Ala Leu Leu Glu Ile Lys Leu Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15
 Thr Phe Ile Gln Arg Leu Ala Phe Ile Val Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30
 Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

Gln

20 <210> 59
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 59
 Lys Glu Phe Thr Ile Ala Leu Arg Glu Ile His Ala Leu Pro Asn Leu
 1 5 10 15
 Thr Leu His Gln Arg Leu Ala Phe Ile Ile Lys Leu Asp Asp Asp Pro
 20 25 30
 Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 35 40 45

Gln

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

ES 2 674 983 T3

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 60

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

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

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

Gln

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

<220>

- 10 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 61

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

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

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

Gln

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

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 62

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

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

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

- 20 Gln
- <210> 63
- <211> 49
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 25 <220>
- <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 63

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

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

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

Gln

<210> 64

<211> 49

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 64

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

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

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

Gln

<210> 65

<211> 49

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 65

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

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

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

20 Gln

<210> 66

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 66

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

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

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

Gln

<210> 67

<211> 49

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 67

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

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

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

10 Gln

<210> 68

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 68

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

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

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

Gln

20 <210> 69

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 69

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

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

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

Gln

- 5 <210> 70
- <211> 49
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

- 10 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 70

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

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

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

Gln

- 15 <210> 71
- <211> 49
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

- <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 71

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

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

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

- 20 Gln
- <210> 72
- <211> 49
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

- 25 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 72

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

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

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

Gln

<210> 73

<211> 49

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 73

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

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

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

10 Gln

<210> 74

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 74

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

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

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

20 Gln

<210> 75

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 75

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

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

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

Gln

<210> 76

<211> 49

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 76

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

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

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

10 Gln

<210> 77

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 77

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

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

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

Gln

20 <210> 78

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 78

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

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

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

Gln

<210> 79

<211> 49

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 79

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

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

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

10 Gln

<210> 80

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 80

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

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

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

Gln

20 <210> 81

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 81

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

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

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

Gln

- 5 <210> 82
- <211> 49
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 82

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

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

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

Gln

- 15 <210> 83
- <211> 49
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 83

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

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

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

- 20 Gln
- <210> 84
- <211> 49
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 25 <220>
- <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 84

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

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

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

Gln

<210> 85

<211> 49

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 85

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

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

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

10 Gln

<210> 86

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 86

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

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

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

20 Gln

<210> 87

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 87

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

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

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

Gln

<210> 88

<211> 49

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 88

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

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

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

10 Gln

<210> 89

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 89

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

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

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

Gln

20 <210> 90

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 90

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

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

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

Gln

<210> 91

<211> 49

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 91

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

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

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

Gln

<210> 92

<211> 49

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 92

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

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

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

20 Gln

<210> 93

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 93

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

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

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

Gln

- 5 <210> 94
- <211> 49
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 94

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

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

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

Gln

- 15 <210> 95
- <211> 49
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 95

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

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

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

- 20 Gln
- <210> 96
- <211> 49
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 25 <220>
- <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 96

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

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

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

Gln

<210> 97

<211> 49

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 97

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

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

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

10 Gln

<210> 98

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 98

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

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

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

20 Gln

<210> 99

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 99

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

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

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

Gln

<210> 100

<211> 49

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 100

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

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

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

10 Gln

<210> 101

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 101

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

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

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

Gln

<210> 102

20 <211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 102

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

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

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

Gln

<210> 103

<211> 49

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 103

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

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

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

Gln

<210> 104

<211> 49

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 104

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

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

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

20 Gln

<210> 105

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 105

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

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

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

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

<210> 106

<211> 58

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 106

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

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

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

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

10

<210> 107

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 107

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

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

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

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

<210> 108

20

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 108

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

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

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

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

<210> 109

<211> 58

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 109

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

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

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

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

10

<210> 110

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 110

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

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

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

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

20

<210> 111

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 111

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

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

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

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

<210> 112

<211> 58

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 112

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

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

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

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

10

<210> 113

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 113

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

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

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

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

<210> 114

20

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 114

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

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

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

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

<210> 115

<211> 58

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 115

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

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

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

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

<210> 116

<211> 58

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 116

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

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

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

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

20 <210> 117

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 117

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

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

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

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

<210> 118

<211> 58

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 118

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

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

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

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

10

<210> 119

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 119

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

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

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

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

20

<210> 120

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 120

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

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

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

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

- 5 <210> 121
- <211> 58
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

- 10 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 121

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

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

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

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

- 15 <210> 122
- <211> 58
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

- <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 122

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

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

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

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

- 20 <210> 123
- <211> 58
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

- 25 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 123

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

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

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

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

<210> 124

<211> 58

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 124

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

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

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

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

10

<210> 125

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 125

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

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

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

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

20

<210> 126

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 126

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

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

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

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

<210> 127

<211> 58

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 127

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

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

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

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

<210> 128

<211> 58

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 128

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

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

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

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

<210> 129

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 129

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

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

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

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

<210> 130

<211> 58

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 130

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

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

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

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

10

<210> 131

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 131

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

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

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

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

20

<210> 132

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 132
 Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu His Asn Ala Phe Ser Glu Ile
 1 5 10 15

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

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

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

5 <210> 133
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 133
 Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Gly Val Asn Ala Phe Asn Glu Ile
 1 5 10 15

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

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

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

15 <210> 134
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 134
 Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Lys Tyr Ala Leu Met Glu Ile
 1 5 10 15

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

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

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

<210> 135
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 135

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

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

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

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

<210> 136

<211> 58

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 136

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

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

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

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

10

<210> 137

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 137

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

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

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

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

20

<210> 138

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

25

ES 2 674 983 T3

<400> 138

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

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

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

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

<210> 139

<211> 58

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 139

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

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

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

10 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 140

<211> 58

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 140

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

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

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

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

<210> 141

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 674 983 T3

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 141

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

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

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

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

5 <210> 142

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 142

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

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

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

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

15 <210> 143

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 143

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

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

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

20 <210> 144

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 674 983 T3

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 144

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

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

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

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

<210> 145

<211> 58

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 145

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

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

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

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

15 <210> 146

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 146

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

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

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

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

<210> 147

<211> 58

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

5 <400> 147
 Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Asn Leu Trp Ala Phe Asn Glu Ile
 1 5 10 15

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

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

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

<210> 148
 <211> 58
 <212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 148
 Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Ser Phe Ala Phe Ser Glu Ile
 1 5 10 15

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

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

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

15 <210> 149
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 149
 Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Phe Arg Gly Ala Ile Ala Glu Ile
 1 5 10 15

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

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

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

ES 2 674 983 T3

<210> 150
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 150
 Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Glu Glu Asn Ala Tyr Lys Glu Ile
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Pro Asn Leu Thr Leu Ala Gln Lys Val Ala Phe Ile Leu
 20 25 30
 Lys Leu Glu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

10 <210> 151
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

15 <400> 151
 Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Arg Gln Ala Leu Gln Glu Ile
 1 5 10 15
 His Ile Leu Pro Asn Leu Thr His Ser Gln Arg Val Ala Phe Ile Val
 20 25 30
 Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

20 <210> 152
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 152
 Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Asn His Ala Ala Phe Gln Glu Ile
 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Pro Asn Leu Thr Leu Asn Gln Arg Leu Ala Phe Ile Thr
 20 25 30
 Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

ES 2 674 983 T3

<210> 153
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 153
 Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Thr Asn Tyr Ala Phe Lys Glu Ile
 1 5 10 15
 Asp Leu Leu Pro Asn Leu Thr Leu Met Gln Lys Leu Ala Phe Ile Val
 20 25 30
 Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

10 <210> 154
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

15 <400> 154
 Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Ile Ser Leu Ala Phe Lys Glu Ile
 1 5 10 15
 Lys Ala Leu Pro Asn Leu Thr Gly Gln Gln Arg Phe Ala Phe Ile Leu
 20 25 30
 Lys Leu Asp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

20 <210> 155
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 155

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

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

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

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

<210> 156

<211> 58

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que se une a ABD modificado genéticamente

<400> 156

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

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

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

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

<210> 157

<211> 46

15 <212> PRT

<213> Streptococcus spG148

<400> 157

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

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

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

<210> 158

20 <211> 47

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio que se une a albúmina modificado genéticamente

ES 2 674 983 T3

<400> 158

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

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

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

<210> 159

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio que se une a albúmina modificado genéticamente

<400> 159

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

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

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

<210> 160

<211> 46

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio que se une a albúmina modificado genéticamente

<400> 160

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

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

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

<210> 161

<211> 48

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Dominio que se une a albúmina modificado genéticamente

<400> 161

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

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

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

ES 2 674 983 T3

<210> 162
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Dominio que se une a albúmina modificado genéticamente

<400> 162
 Gly Leu Ala Ser Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr
 1 5 10 15

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

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

<210> 163
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 163
 tgcttcggc tcgtatgtg tgtg 24

20 <210> 164
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

25 <400> 164
 cggaaccaga gccaccaccg g 21

<210> 165
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

<400> 165
 cggaaccaga gccaccaccg g 21

35

REIVINDICACIONES

1. Método de separación de al menos una molécula que contiene ABD presente en un líquido de otros constituyentes en el líquido, que comprende una etapa de separación por afinidad, etapa en la que se utiliza, como ligando de afinidad, un polipéptido que se une a ABD que comprende un motivo BM que se une a ABD, motivo que
5 consiste en la secuencia de aminoácidos:

$$EX_2X_3X_4AX_6X_7EIX_1OX_{11}LPNLTX_{17}X_{18}QX_{20}X_{21}AFIX_{25}KLX_{28}D$$

en donde, independientemente uno de otro,

- X_2 se selecciona a partir de F, I y L;
 X_3 se selecciona a partir de H, K, N, Q, R, S, T y V;
 10 X_4 se selecciona a partir de A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y;
 X_6 se selecciona a partir de F, I, L e Y;
 X_7 se selecciona a partir de A, H, I, K, L, N, Q, R, S, T y V;
 X_{10} se selecciona a partir de G, H, K, N, Q, R y S;
 X_{11} se selecciona a partir de A, D, F, G, I, K, L, N, Q, R, S, T, V e Y;
 15 X_{17} se selecciona a partir de F, H, L, S y T;
 X_{18} se selecciona a partir de D, E, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T y V;
 X_{20} se selecciona a partir de H, K y R;
 X_{21} se selecciona a partir de I, L y V;
 X_{25} se selecciona a partir de F, I, L, V e Y;
 20 X_{28} se selecciona a partir de D y E.

2. Método según la reivindicación 1, que comprende las etapas:

- a) aplicar el líquido a una matriz de afinidad que comprende dicho polipéptido que se une a ABD en condiciones que son propicias para la unión de una molécula que contiene ABD a la matriz de afinidad;
 b) lavar la matriz de afinidad para eliminar las sustancias no unidas a la misma; y
 25 c) eluir cualquier molécula unida que contiene ABD desde la matriz de afinidad, obteniendo de este modo una fracción de molécula que contiene ABD con un contenido enriquecido de molécula que contiene ABD; y
 d) recuperar dicha fracción de molécula que contiene ABD.

3. Método según la reivindicación 1, que comprende las etapas:

- 30 a) aplicar el líquido a una matriz de afinidad que comprende dicho polipéptido que se une a ABD en condiciones que son propicias para la unión de una molécula que contiene ABD a la matriz de afinidad;
 b) lavar la matriz de afinidad para recuperar las sustancias no unidas a la misma, obteniendo de este modo una fracción agotada con un contenido en molécula que contiene ABD sustancialmente reducido; y
 c) recuperar dicha fracción agotada.

4. Método según la reivindicación 1, que comprende las etapas:

- 35 a) aplicar el líquido a una matriz de afinidad que comprende dicho polipéptido que se une a ABD en condiciones que son propicias para la unión de una molécula que contiene ABD a la matriz de afinidad;
 b) lavar la matriz de afinidad para recuperar las sustancias no unidas a la misma, obteniendo de este modo una fracción agotada con un contenido en molécula que contiene ABD sustancialmente reducido; y
 40 c) eluir la molécula que contiene ABD unida desde la matriz de afinidad, obteniendo de este modo una fracción de molécula que contiene ABD con un contenido en molécula que contiene ABD; y
 d) recuperar dicha fracción de molécula que contiene ABD y dicha fracción agotada.

5. Método según cualquier reivindicación precedente, en el que dicha secuencia de aminoácidos cumple al menos cuatro de las seis condiciones I-VI:

I. X₂ es F o L;

II. X₆ es F o L;

5 III. X₂₀ es H o R;

IV. X₂₁ es I o L;

V. X₂₅ es I o V; y

VI. X₂₈ es D.

10 6. Método según cualquier reivindicación precedente, en el que dicha secuencia de aminoácidos se selecciona a partir de SEQ ID NO: 1-52.

7. Método según la reivindicación 6, en donde dicha secuencia de aminoácidos se selecciona a partir de SEQ ID NO: 1-7.

15 8. Método según cualquier reivindicación precedente, en donde dicho motivo que se une a ABD forma parte de un dominio proteico de haz de tres hélices seleccionado a partir de los dominios de la proteína A de *Staphylococcus aureus* o derivados de los mismos.

9. Método según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho polipéptido que se une a ABD comprende la secuencia de aminoácidos:

K-[BM]-DPSQS X_aX_bLLX_c EAKKL NDX_dQ;

en donde

20 [BM] es un motivo que se une a ABD como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5-7;

X_a se selecciona a partir de A y S;

X_b se selecciona a partir de N y E;

X_c se selecciona a partir de A, S y C;

X_d se selecciona a partir de A y S.

25 10. Método según la reivindicación 9, en donde dicha secuencia de aminoácidos se selecciona a partir de una cualquiera de SEQ ID NO: 53-104.

11. Método según la reivindicación 10, en donde dicha secuencia de aminoácidos se selecciona a partir de una cualquiera de SEQ ID NO: 53-59.

12. Método según cualquier reivindicación precedente, que comprende la secuencia de aminoácidos:

30 VDAKYAK-[BM]- DPSQSSELLAEAKKLNDQAQPK;

en donde [BM] es un motivo que se une a ABD como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5-7.

13. Método según la reivindicación 12, en el que dicha secuencia de aminoácidos se selecciona a partir de SEQ ID NO: 105-156.

35 14. Método según la reivindicación 13, en el que dicha secuencia de aminoácidos se selecciona a partir de SEQ ID NO: 105-111.

Designación	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
BM06677	ELKVAFKREINTLPNLTHQQRIFAIIKLLDD	1
BM06638	ELVNAFSEIKALPNLTLHQRIFAIVKLLDD	2
BM06608	ELHHAFREIKFLPNLTFHQIFAIVKLLDD	3
BM06650	EFKLA_QEIHLYLPNLTDQRIAFIILKLLDD	4
BM06678	ELRWA_NEIRRLPNLTFKQHIAFIVKLLDD	5
BM06620	EFRAA_LLEIKLLPNLTFIQRIAFIVKLLDD	6
BM06695	EFTIA_REIHALPNLTLHQRIFAIIKLLDD	7
BM06681	ELKKAFFEIQIILPNLTLHQRIAFIVKLLDD	8
BM06655	EFKDA_LDEIKDLPNLTSQRIFAIVKLLDD	9
BM06602	ELTTAFAEIQKLPNLTFEQKIAFIIKLLDD	10
BM06670	EFREAIIEIRRLPNLTLHQRIFAIVKLLDD	11
BM06668	EIKTAFAEIRVLPNLTFQRIFAIVKLLDD	12
BM06690	ERRYAFREIRLLPNLTFQRIFAIVKLLDD	13
BM06667	ELKAAAFREINDLPNLTHTORIFAIVKLLDD	14
BM06641	ELKMAFQEIYRYPNLTRLQRIAFIVKLLDD	15
BM06686	EWKKA_LREIHLYLPNLTLQRIAFIVKLLDD	16
BM06664	EFKKA_LVEIKTLPNLTAIQRIAFIVKLLDD	17
BM06583	EFIFAL_SEIKVLPNLTHVQKIAFIVKLLDD	18
BM06687	EFKYAIQEIKDLPNLTSQRIAFIVKLLDD	19
BM06700	ELMQA_LWEIRQLPNLTFNQRVAFIVKLLDD	20
BM06661	ELQGA_LTEIKNLPNLTFHQIFAIVKLLDD	21
BM06669	ELADA_LYEIKNLPNLTFHQIFAIVKLLDD	22
BM06676	ELGYA_LKEIGQLPNLTHHQRIAFIILKLLDD	23
BM06680	ELSTA_NEIKGLPNLTLQKIAFIVKLLDD	24
BM06531	EIRSAKKEINVLPNLTFKQIFAIVKLLDD	25
BM06665	ELSSA_LLEIHLPNLTHQRIAFIVKLLDD	26
BM06683	ELVHAFGEIRYLPNLTHSQRIFAIIKLLDD	27
BM06698	ELHNAFSEIKQLPNLTTQRIAFIILKLLDD	28
BM06692	EGVNAFNEIKGLPNLTFHQIFAIVKLLDD	29

FIGURA 1A

Designación	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
BM06660	ELKYA_MEIRYLPNLTFRQKIAFILKLLDD	30
BM06645	ELRWAVSEIRHLPNLTFHQRIAFIVKLLDD	31
BM06508	ELQRAFAEIQSLPNLTLNQHIAFIYKLED	32
BM06649	ELKAAFRERTLPLNLTGQRTAFIVKLLDD	33
BM06666	ELTTAMKEIQALPNLTHQQRIAFIVKLLDD	34
BM06549	EDMRAFHEINKLPNLTIAQRVAFIYKLED	35
BM06552	ELNAAFTFESSLPNLTLDQRIAFIFKLLDD	36
BM06672	ELRWA_NELHILPNLTLQKVAFIVKLLDD	37
BM06484	ELKNVAFTEIKNLPNLTNTQTIAFIVKLLDD	38
BM06652	ELSLAFVEIHKLPNLTTHQRIAFIVKLLDD	39
BM06480	ELQWAFNEIHNLPNLTYVQRIAFIVKLLDD	40
BM06512	EEQTAMQEIINSLPNLTLQRIAFIFKLED	41
BM06648	ELGWAFREIRNLPNLTHTYQRIAFIMKLLDD	42
BM06691	ENLWAFNEIKGLPNLTHDQRIAFIVKLLDD	43
BM06501	ELSFVAFSEINVLPNLTFHQKIAFIYKLED	44
BM06544	EFRGAIARIDLPNLTLEQKYAFIFKLED	45
BM06487	EEENAYKEIGSLPNLTLQKVAFILKLED	46
BM06688	ELRQA_LQEIHILPNLTHSQRVAFIVKLLDD	47
BM06503	ENHAAFQEIILSLPNLTLNQRFAFITKLLDD	48
BM06491	ETNYAFKEIDLPLNLTLMQKIAFIVKLLDD	49
BM06675	EISLAFKEIKALPNLTGQRFVAFILKLLDD	50
BM06584	ELSKA_LTEIRMLPNLTFRQRIAFIILKLLDD	51
BM06540	ELDMAYTEIGLLPNLTFSQLAFIILKLLDD	52
P06677	KELKVAFKEINTLPNLTTHQQRIAFIKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	53
P06638	KELVNAFSEIKALPNLTLHQRLAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	54
P06608	KELHHAFFREIKFLPNLTFHQRLAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	55
P06650	KEFKLALQEIHYLPLNLTLDQRLAFIILKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	56
P06678	KELRWALNEIRRLPNLTFKQHTAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	57
P06620	KEFPAALLEIKLLPNLTFIQRLAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	58

FIGURA 1B

Designación	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
P06695	KEFTIALREIHALPNLTLHQRLAFIIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	59
P06681	KELKAFHEIQILPNLTLTSQRLAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	60
P06655	KEFKDALDEIKDLPNLTSMQRTAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	61
P06602	KELTTAFAEIQKLPNLTFFEQKIAFIIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	62
P06670	KEFREAIIEIRRLPNLTLHQRLAFIIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	63
P06668	KEIKTAFAEIRVLPNLTFAQRLAFIIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	64
P06690	KERRYAFREIRLLPNLTLFSQRTAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	65
P06667	KELKAAFREINDLPNLTHTQRTAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	66
P06641	KELKMAFQEIHYLPNLTQLRTAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	67
P06686	KEMKKALREIHYLPNLTLTQRLAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	68
P06664	KEFEKALVEIKTLPNLTLAIQRTAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	69
P06583	KEFIFALSEIKVLPNLTTHVQRTAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	70
P06687	KEFKYAIQEIKDLPNLTSGQRTAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	71
P06700	KELNQAWEIROLPNLTFNORVAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	72
P06661	KELOQALTEIKNLPNLTGHQRTAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	73
P06669	KELADALYEIKNLPNLTHEQRTAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	74
P06676	KELGVALKEIQGLPNLTLTQRTAFIIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	75
P06680	KELSIÁLNEIKGLPNLTLTQRTAFIIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	76
P06531	KEIRSAKKEINVLPNLTLFSQRTAFIIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	77
P06665	KESSALLEISHLPNLTHQRTAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	78
P06683	KELVHAFGEIRYLPNLTSHQRTAFIIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	79
P06698	KELHNAFSEIKQLPNLTLTQRTAFIIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	80
P06692	KEGYNAFNEIKGLPNLTLFHQRTAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	81
P06660	KELKYLMEIRYLPNLTTHQRTAFIIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	82
P06645	KELRWAYSEIRHLPNLTTHQRTAFIIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	83
P06508	KELQRAFAEIQSLPNLTLNQRTAFIIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	84
P06649	KELKAAFREIRTLPNLTLFGQRTAFIIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	85
P06666	KELTTAMKEIQALPNLTLHQRTAFIIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	86
P06549	KEDMRAFHEIKNLPNLTIAQRTAFIIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	87

FIGURA 1C

Designación	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
P06552	KELNAAFTTEISSLPNLTLDQRLAFIFKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	88
P06672	KELRWALNEIHIILPNLTLEQKVAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	89
P06484	KELKNAFTEIKNLPNLTNQTAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	90
P06652	KEISLAFVEIHKLPNLTTHQRLAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	91
P06480	KEIQWAFNEIHNLPNLTYVQRTAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	92
P06512	KEEQTAMQEIINSLPNLTLEQRLAFIFKLEDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	93
P06648	KELGWAFREIRNLPNLTTHYQRTAFIMKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	94
P06691	KENLWAFNEIKGLPNLTHDQRTAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	95
P06501	KELSAFSEIIVLPNLTFHQRTAFIVKLEDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	96
P06544	KEFRGATAEIRDLPNLTLEQKYAFIFKLEDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	97
P06487	KEENAYKEIGSLPNLTHAQVAFILKLEDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	98
P06688	KELQALQEIHIILPNLTHSQVAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	99
P06503	KENHAAFOEILSLPNLTLNQLAFITKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	100
P06491	KETNYAFKEIDLLPNLTIHQVAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	101
P06675	KEISLAFKEIKALPNLTGQQRPAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	102
P06584	KEISKALTEIRMLPNLTFRQRTAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	103
P06540	KELDMAYTEIGLLPNLTFSQLAFITKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	104
Z06677	VDAKYAKELKVAFKEINTLPNLTHTQRTAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	105
Z06638	VDAKYAKELVNAFSEIKALPNLTLHQRTAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	106
Z06608	VDAKYAKELHHAFFREIKFVLPNLTFFHQRTAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	107
Z06650	VDAKYAKELKALQEIHYLPNLTLDQRLAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	108
Z06678	VDAKYAKELRWALNEIRRLPNLTFKQRTAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	109
Z06620	VDAKYAKELFRALLEIKLLPNLTFIQRTAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	110
Z06695	VDAKYAKELFTIALREIHALPNLTLHQRTAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	111
Z06681	VDAKYAKELRKAFHEIQILPNLTLHQRTAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	112
Z06655	VDAKYAKELKDALDEIKDLPNLTSMQRTAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	113
Z06602	VDAKYAKELTTAFAEIQKLPNLTFEQRTAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	114
Z06670	VDAKYAKELFREALIEIRRLPNLTLHQRTAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	115
Z06668	VDAKYAKELKTAFAEIRVLPNLTFAQRTAFIVKLLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQ	116

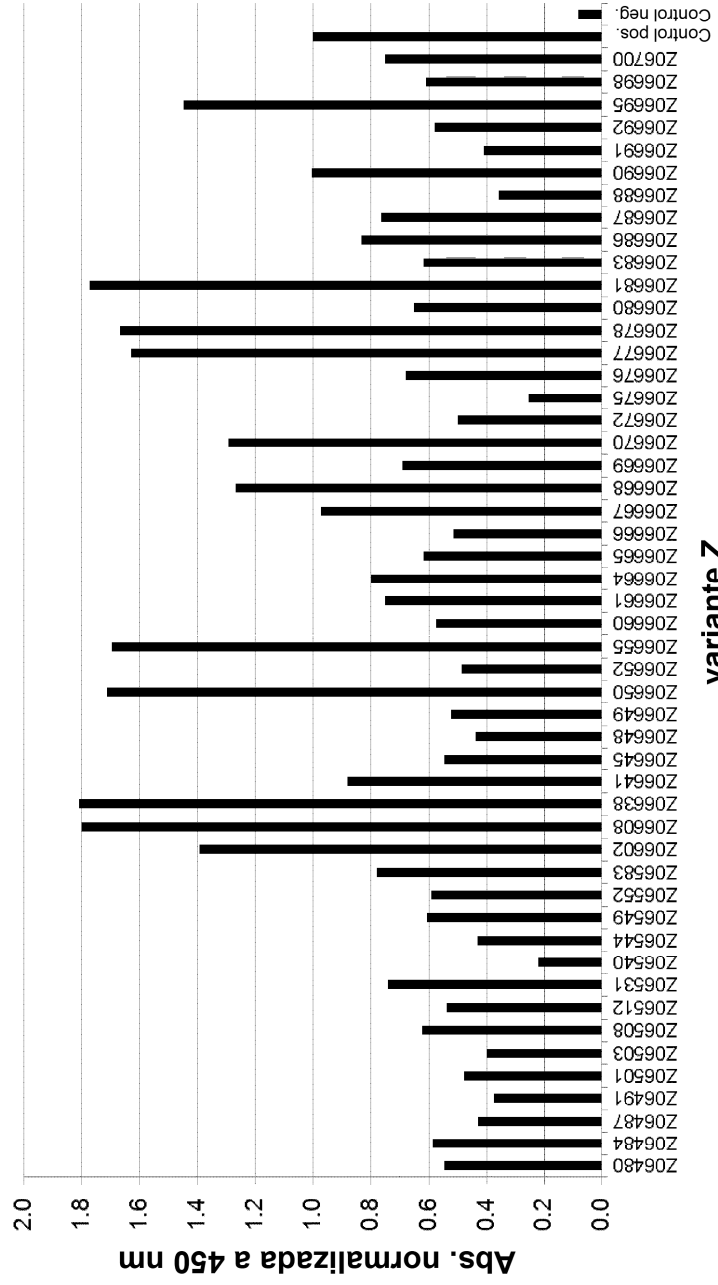
FIGURA 1D

Designación	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
Z06690	VDKYYAKERRRYAFREIRLLPNLTFQSRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	117
Z06667	VDKYYAKELKAAAFREINDLPNLTHTQRIAFIKLDDDPSSSELLAEAKKLNDAQAPK	118
Z06641	VDKYYAKELKMAFOEIRYLPNLTQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	119
Z06686	VDKYYAKEWKKAALREIHYLPNLTQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	120
Z06664	VDKYYAKEFKALVEIKTLPNLTAIQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	121
Z06583	VDKYYAKEFIIFALSEIKVLPNLTQVQKIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	122
Z06687	VDKYYAKEFKYAIOEIKDLPNLTSGQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	123
Z06700	VDKYYAKELNQALWEIRQLPNLTFNQRFVAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	124
Z06661	VDKYYAKELQALTEIKNLPNLTHGQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	125
Z06669	VDKYYAKELADALYEIKNLPNLTHEQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	126
Z06676	VDKYYAKELGVALKEIQQLPNLTHQRIAFIKLDDDPSSSELLAEAKKLNDAQAPK	127
Z06680	VDKYYAKELSLALNEIKGLPNLTSQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	128
Z06531	VDKYYAKELRSAYKEINVLPNLTFQSRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	129
Z06665	VDKYYAKELSSALLEISHLPNLTQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	130
Z06683	VDKYYAKELVHAFGEIRYLPNLTHSRIAFIKLDDDPSSSELLAEAKKLNDAQAPK	131
Z06698	VDKYYAKELHNAFSEIKQLPNLTTQRIAFIKLDDDPSSSELLAEAKKLNDAQAPK	132
Z06692	VDKYYAKELGVNAFNEIKGLPNLTFHQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	133
Z06660	VDKYYAKELKYALMEIRYLPNLTHQRIAFIKLDDDPSSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	134
Z06645	VDKYYAKELRWAVSEIRHLPNLTFHQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	135
Z06508	VDKYYAKELQRAFAEIQSLPNLTLNQHIAFYKLEDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	136
Z06649	VDKYYAKELKAAAFREIRTLPNLTFQRTAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	137
Z06666	VDKYYAKELTTAMKEIQALPNLTHQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	138
Z06549	VDKYYAKEDMRAFHEIKNLPNLTLAQRFVAFYKLEDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	139
Z06552	VDKYYAKELNAAFTEISSLPNLTLQRIAFIKLDDDPSSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	140
Z06672	VDKYYAKELRWALNEIHTLPNLTLQKVAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	141
Z06484	VDKYYAKELKNAFTEIKNLPNLTTNQTAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	142
Z06652	VDKYYAKELSLAFVEIHKLPNLTHQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	143
Z06480	VDKYYAKELQWAFNEIHNLPNLTYQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	144
Z06512	VDKYYAKEEQTAMQEIINSLPNLTLQRIAFIVKLEDDPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK	145

FIGURA 1E

Designación	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
Z06648	VDKYYAKELGWAFREIRNLPNLTHTYQRIAFIMKLDLDDPSQSSELLAEAKKINDAQAPK	146
Z06691	VDKYYAKENLWAFNEIKGLPNLTHDQRIAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKINDAQAPK	147
Z06501	VDKYYAKELSFATSEINVLNPLTFHQKIAFIYKLEDDPSQSSELLAEAKKINDAQAPK	148
Z06544	VDKYYAKEFRGATAEIRDLPNLTLQKYAFIFKLEDDPSQSSELLAEAKKINDAQAPK	149
Z06487	VDKYYAKEEENAYKEIGSLPNLTLAQKVAFIFKLEDDPSQSSELLAEAKKINDAQAPK	150
Z06688	VDKYYAKELRQALQEIHLNPLNLTHTSQRVAFIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKINDAQAPK	151
Z06503	VDKYYAKENHAAFQEIISLPLNLTINQLAFTKLDLDDPSQSSELLAEAKKINDAQAPK	152
Z06491	VDKYYAKETNYAFKEIDLLPNLTLMQKLAFTIVKLDLDDPSQSSELLAEAKKINDAQAPK	153
Z06675	VDKYYAKEISLAFKEIKALPNLTGQQRFAFIFKLDLDDPSQSSELLAEAKKINDAQAPK	154
Z06584	VDKYYAKELSKALTEIRMLPNLTFRQRIAFIIFKLDLDDPSQSSELLAEAKKINDAQAPK	155
Z06540	VDKYYAKELDMAYTEIGLLPNLTFSQLAFTIKLDLDDPSQSSELLAEAKKINDAQAPK	156
ABD001	LAEAKVLANRELDKYGVSDYKNNLNNNAKTVEGVKALIDELIILALP	157
C-ABD001	CLAEAKVLANRELDKYGVSDYKNNLNNNAKTVEGVKALIDELIILALP	158
ABD035	LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVKALIKHLIILALP	159
PP013	LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVKALIKDAIILALP	160
PEP07986	GSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVKALIKDAIILALP	161
PEP07911	GLASAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVKALIKDAIILALP	162

FIGURA 1F



variante Z
FIGURA 2

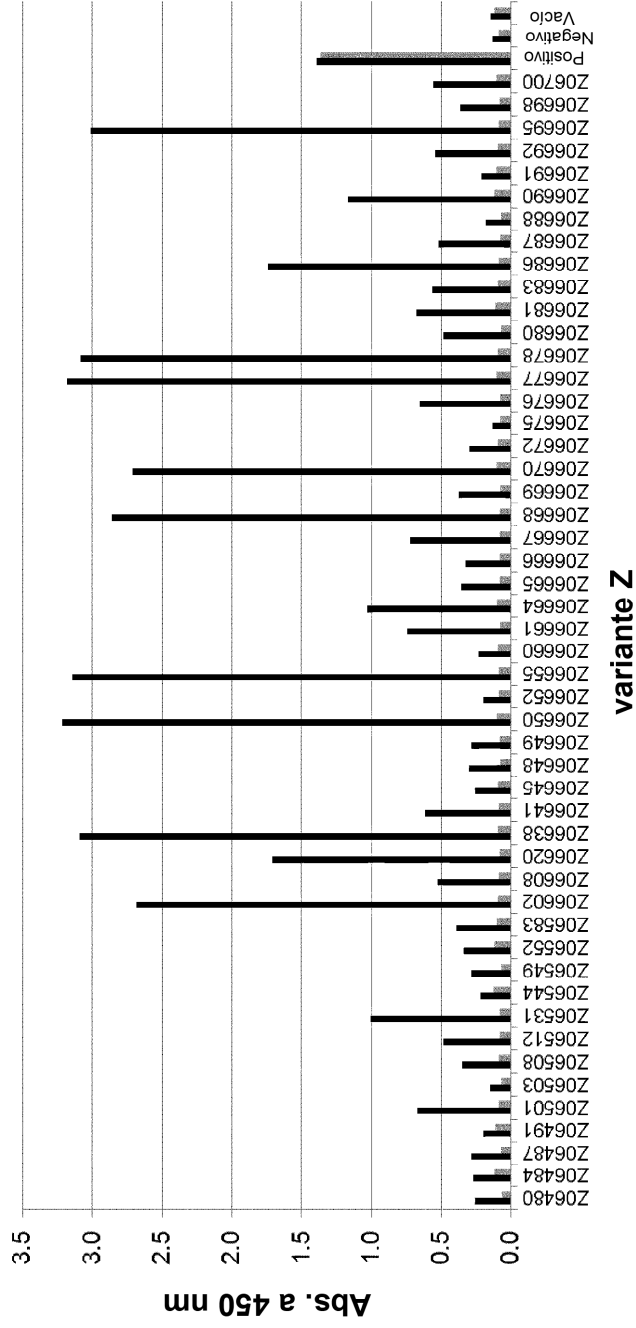


FIGURA 3

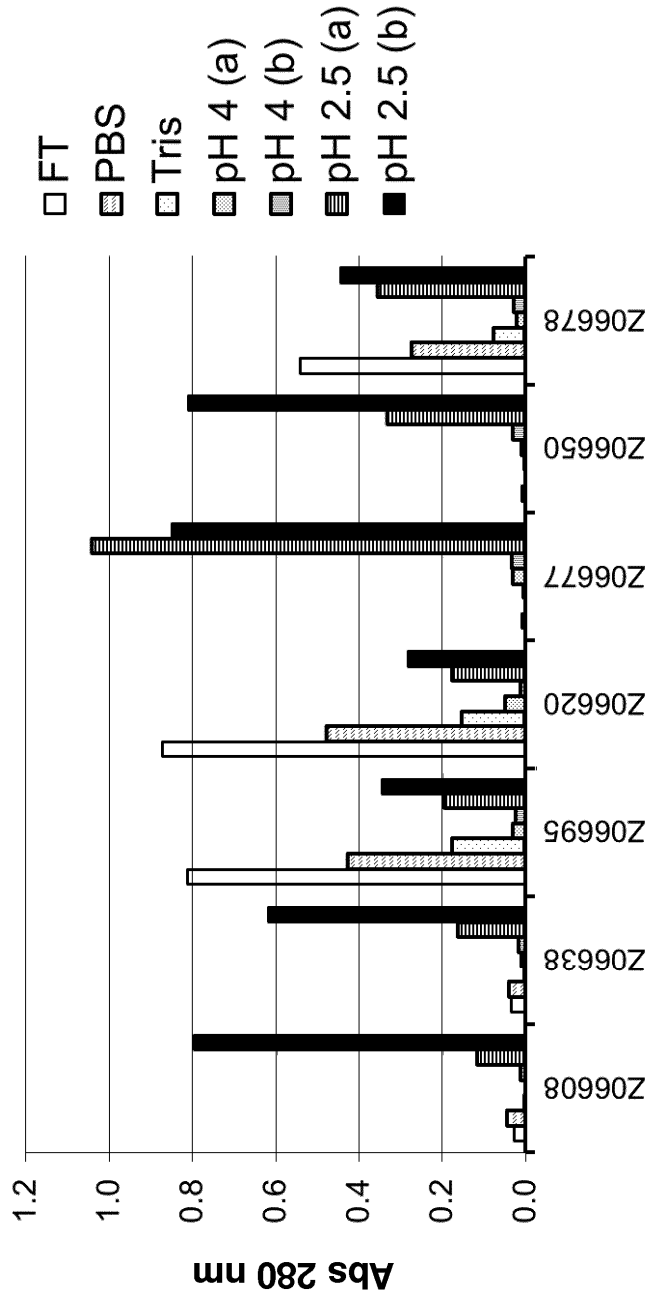


FIGURA 4

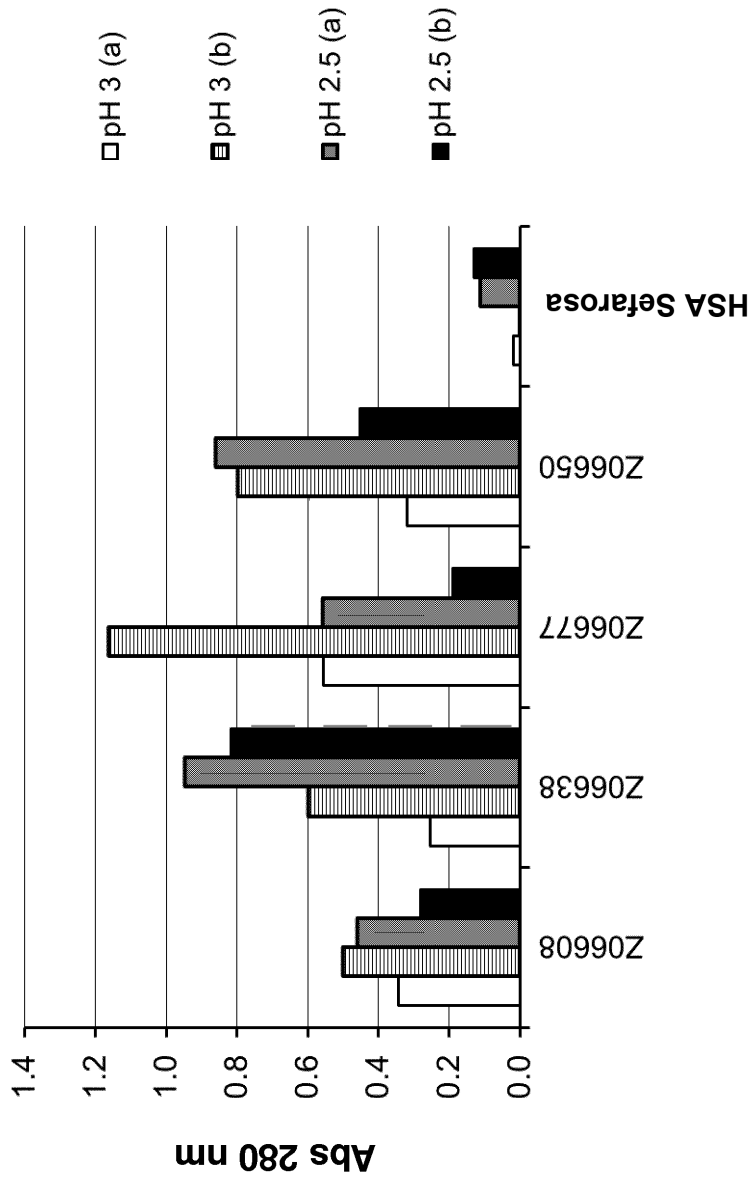


FIGURA 5A

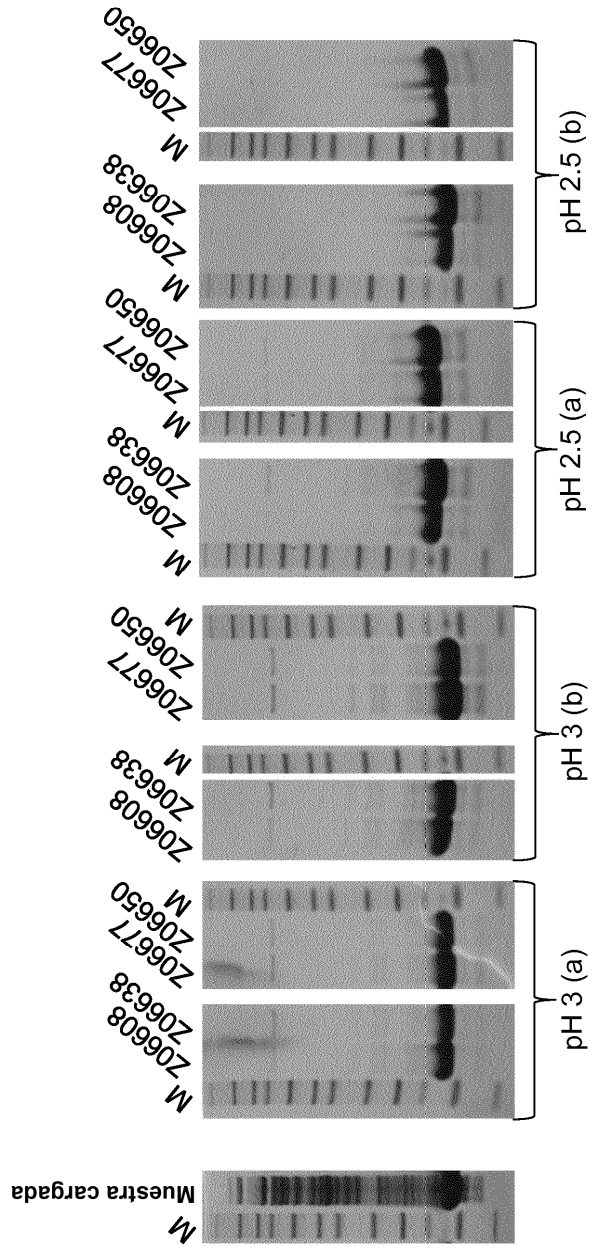


FIGURA 5B

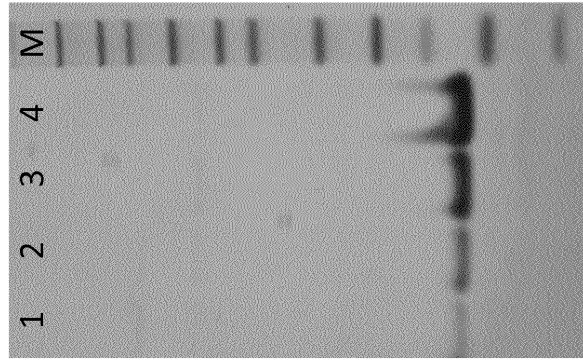


FIGURA 5C

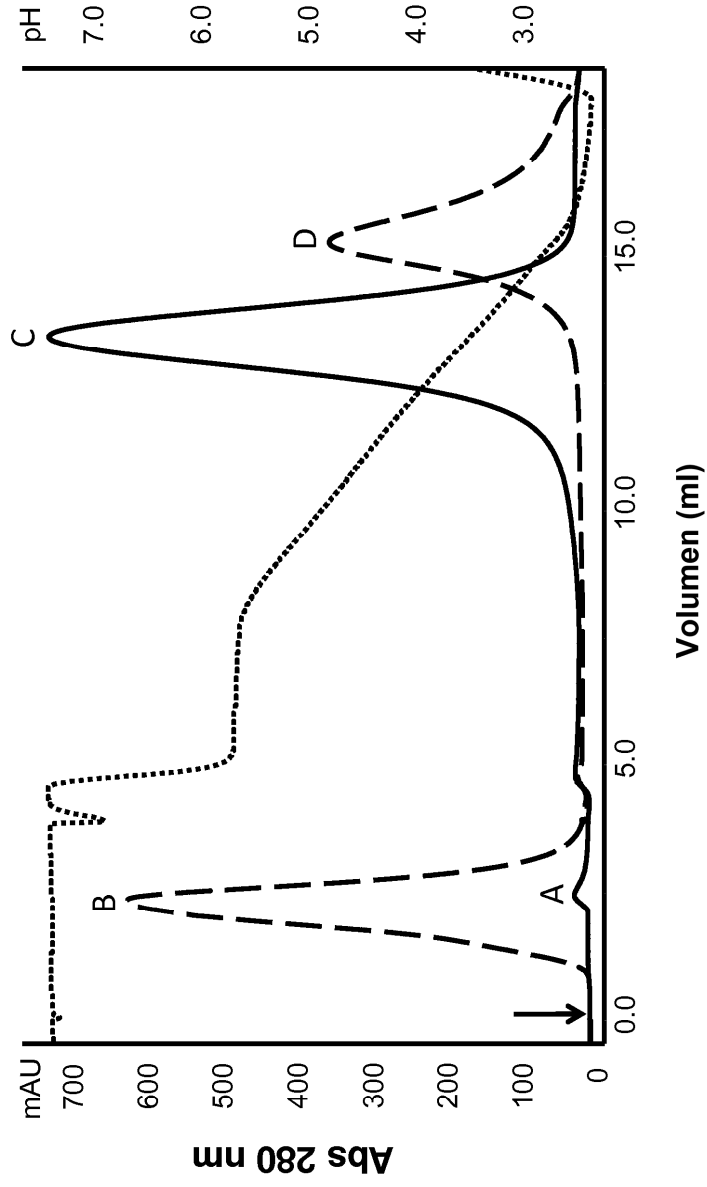


FIGURA 6

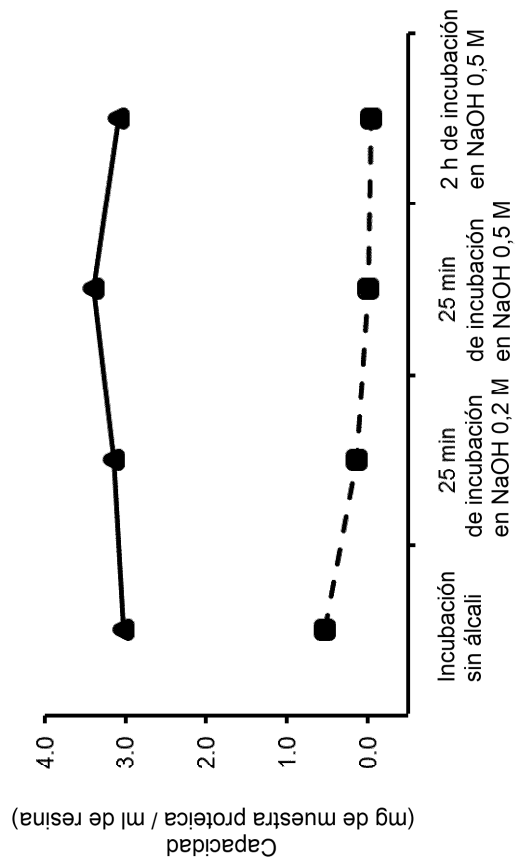


FIGURA 7

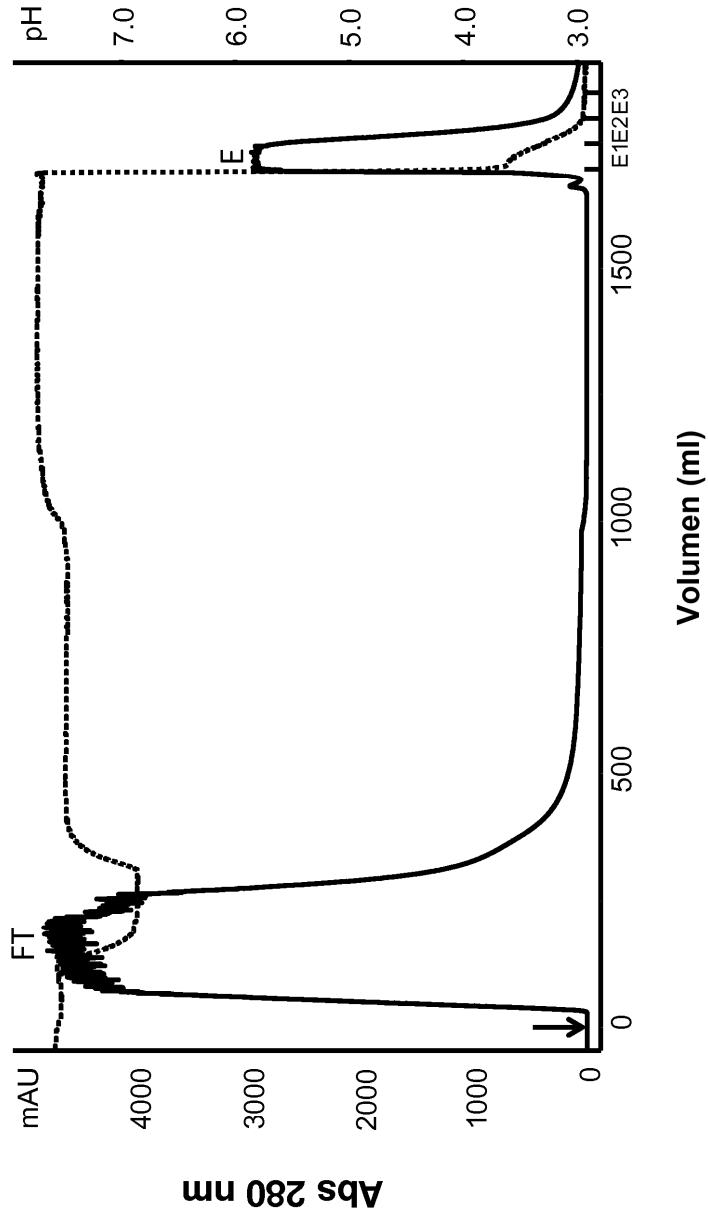


FIGURA 8A

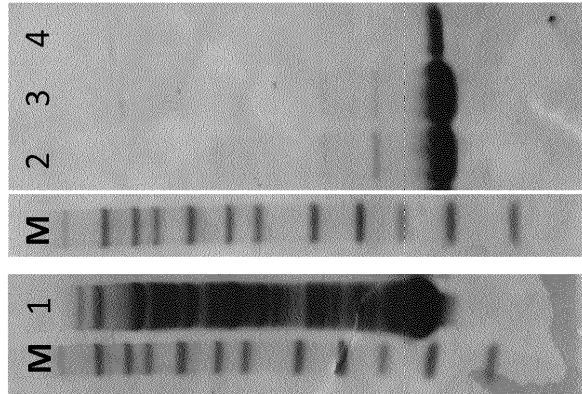


FIGURA 8B

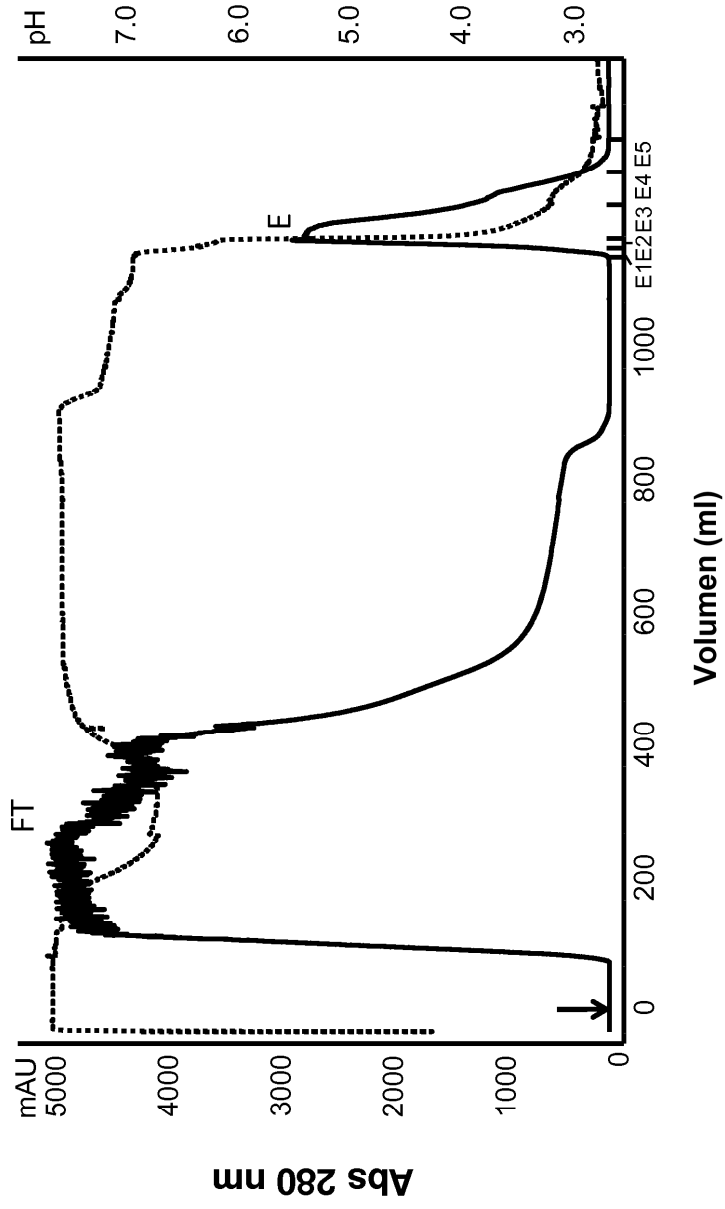


FIGURA 9A

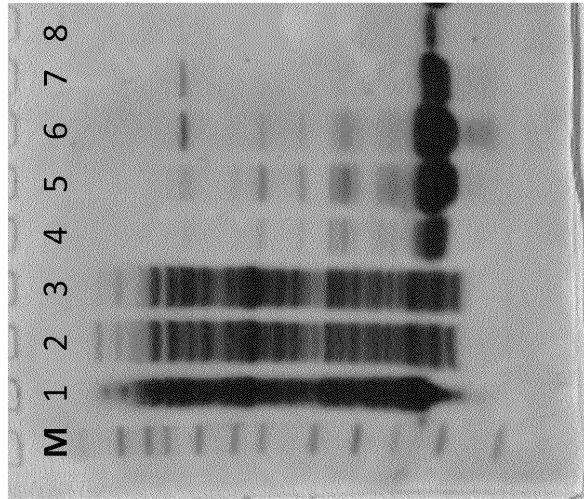


FIGURA 9B

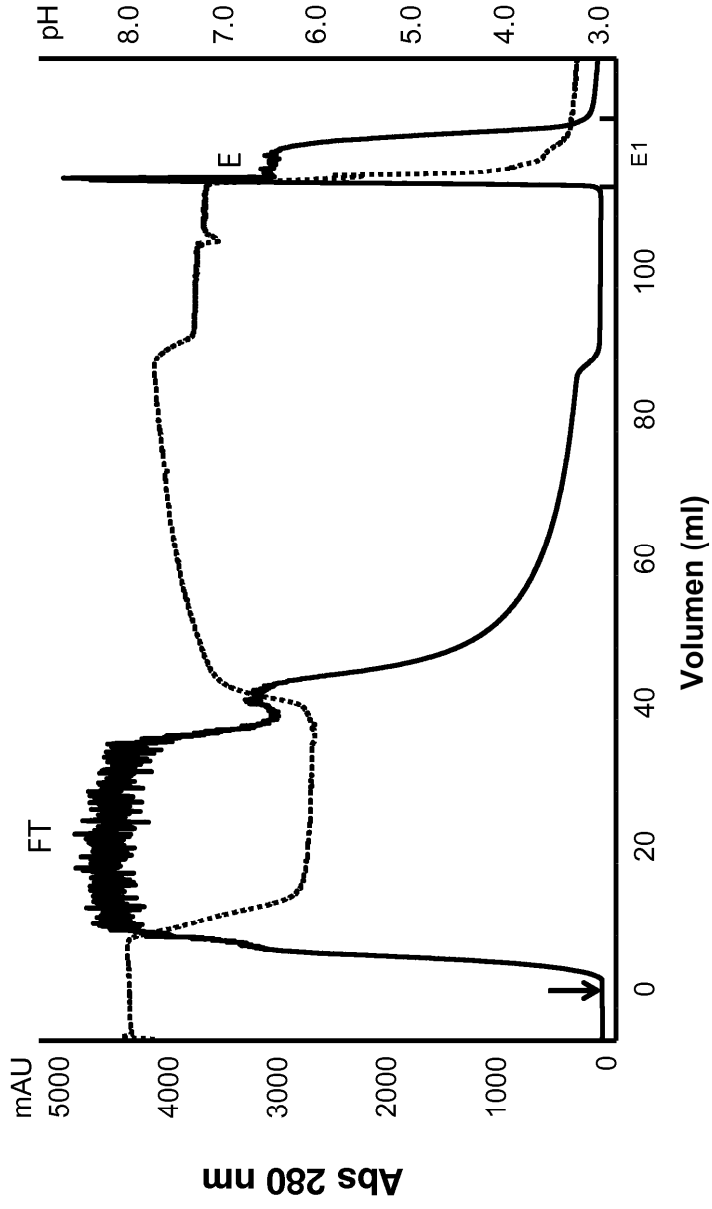


FIGURA 10A

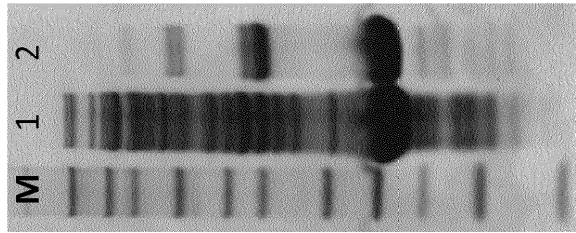


FIGURA 10B

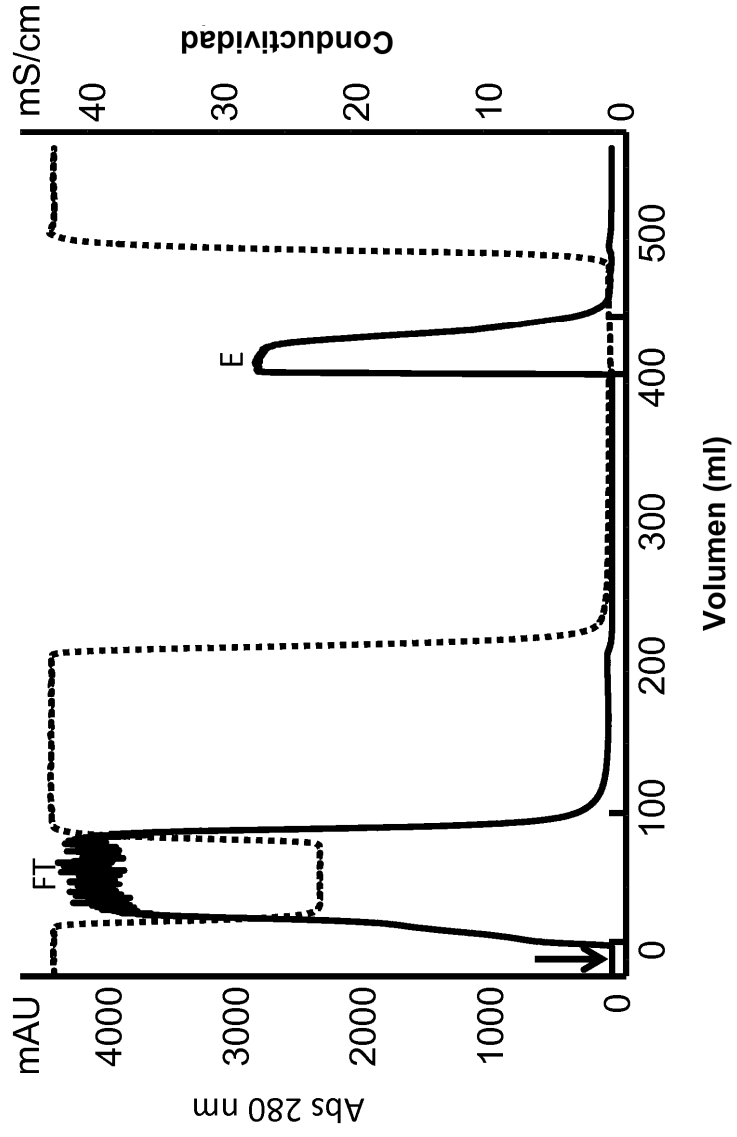


FIGURA 11A

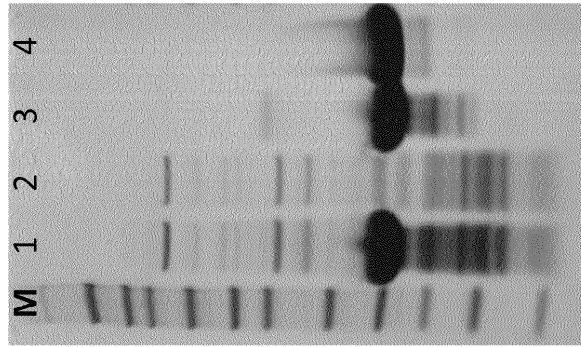


FIGURA 11B

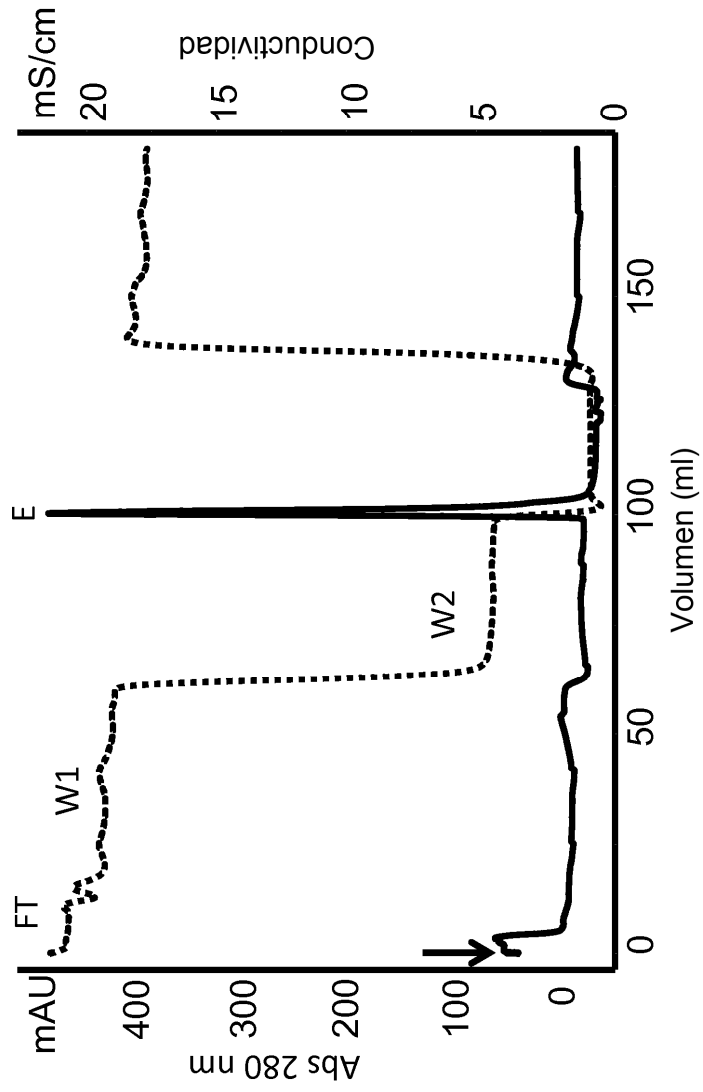


FIGURA 12A

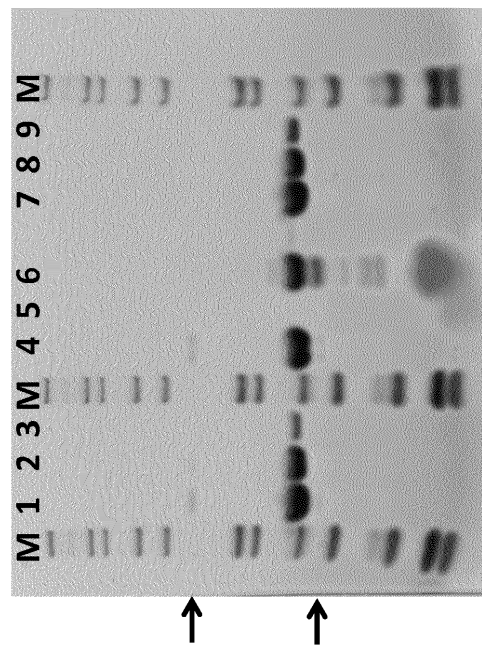


FIGURA 12B

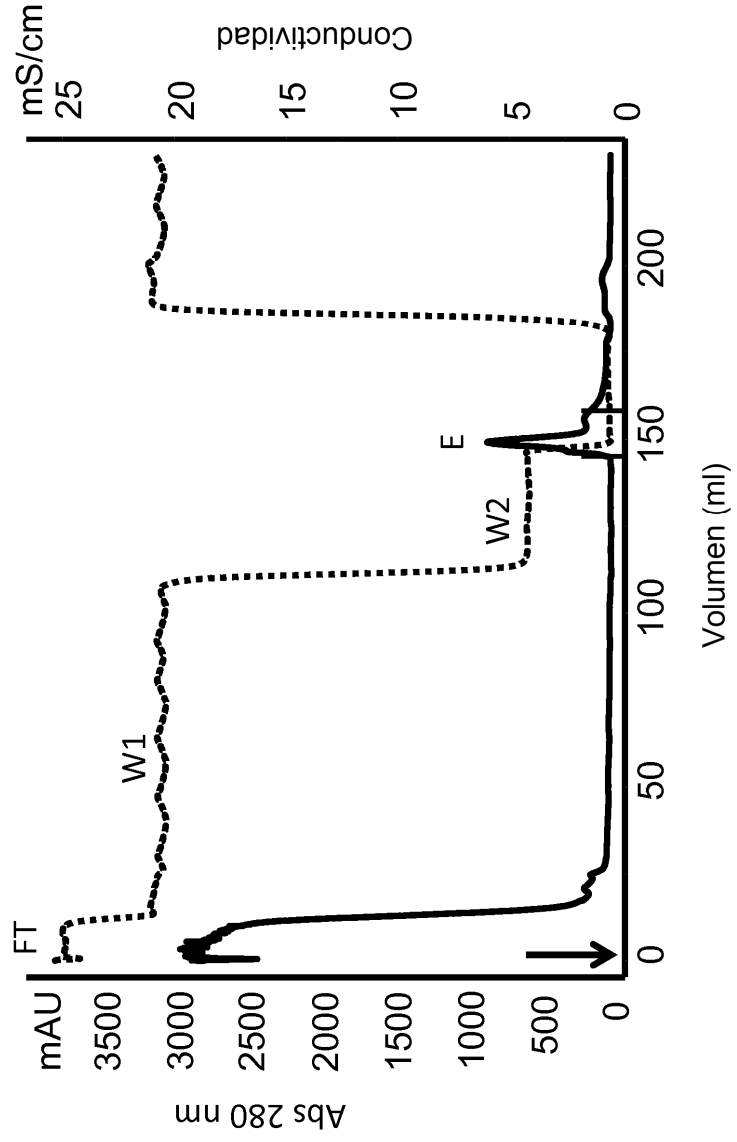


FIGURA 13A

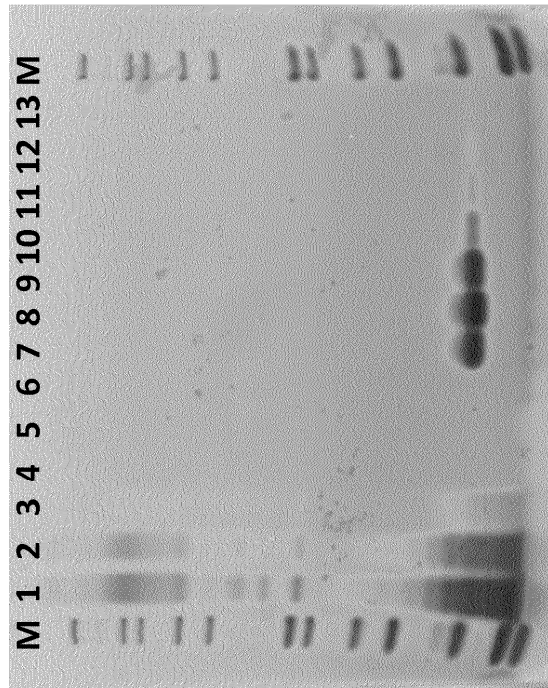


FIGURA 13B