



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 759**

51 Int. Cl.:
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06705836 .2**
96 Fecha de presentación : **23.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1844333**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.10.2007**

54 Título: **Procedimiento para la detección y eliminación de endotoxinas.**

30 Prioridad: **21.01.2005 DE 10 2005 002 969**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.04.2011

73 Titular/es: **HYGLOS INVEST GmbH**
Am Neuland 1
82347 Bernried, DE

72 Inventor/es: **Miller, Stefan;**
Meyer, Roman;
Grassl, Renate;
Biebl, Manfred y
Grallert, Holger

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 759 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

La presente invención se refiere a proteínas de cola de bacteriófago que pueden unirse a endotoxinas tanto en presencia como en ausencia de iones positivos divalentes, particularmente Ca^{2+} o Mg^{2+} . La presente invención se refiere además a procedimientos para el empobrecimiento de endotoxinas en disoluciones y muestras mediante las proteínas de cola de bacteriófago según la invención, así como a un procedimiento de detección de endotoxinas.

Los bacteriófagos reconocen estructuras (proteínas de membrana, moléculas de azúcar, etc.) sobre la superficie de sus bacterias hospedadoras mediante las correspondientes proteínas que los bacteriófagos portan sobre su superficie. Varios bacteriófagos poseen solo un tipo de proteína de reconocimiento como, por ejemplo, el fago P22 de *Salmonella*, otros al menos dos o más. Las proteínas de reconocimiento pueden poseer actividad enzimática, como en el fago P22 (Seckler, *J. Struct. Biol.* 1998; 122(1-2): 216-222), o también no ser enzimáticamente activas. Actividad enzimática significa que estas proteínas como, por ejemplo, la proteína de punta de cola de P22, pueden hidrolizar la molécula receptora que reconocen, es decir en P22 el antígeno O de *Salmonella*. El bacteriófago más conocido que posee dos proteínas de reconocimiento es el fago T4 específico de *E. coli*. Este fago posee fibras de cola largas y cortas. Las fibras de cola largas sirven para el reconocimiento específico de su bacteria hospedadora *E. coli* mediante la proteína de membrana OmpC o mediante el lipopolisacárido en *E. coli* B. Mientras que las fibras de cola largas de los fagos T4, T2 y K3 se unen específicamente a OmpC o lipopolisacárido de *E. coli* B (T4), OmpF (T2; Hantke K., *Mol. Gen. Genet.* 1978; 164 (2):131-135) y OmpA (K3; Hancock RE, Reeves P, *J. Bacteriol.* 1975; 121(3): 983-993; Riede I, Eschbach ML, Henning U., *Mol. Gen. Genet.* 1984; 195 (1-2): 144-152), las fibras de cola cortas se encuentran en el lado inferior de la placa basal del fago y no participan en la especificidad de hospedador, sino que son intercambiables entre los fagos T4, T2 y K3 (Riede, *Mol. Gen. Genet.* 1987; 206(1): 110-115). Solo después de haberse unido al menos tres fibras de cola largas, se despliegan las fibras de cola cortas de la placa basal y son responsables de la unión irreversible del fago T4 a las bacterias hospedadoras *E. coli* (Leiman y col., *Cell. Mol. Life Sci.* 2003; 60(11): 2356-2370). Estas proteínas de fibra de cola corta se unen, como se muestra para el fago T4 (documento WO 2004/001418), en la región central del lipopolisacárido y son por tanto adecuadas para el reconocimiento y unión de endotoxina.

Endotoxina (ET) designa una familia de lipopolisacáridos que, junto con proteínas y fosfolípidos, forman la membrana celular externa de bacterias gramnegativas. Las endotoxinas aparecen exclusivamente en este grupo de bacterias y desempeñan un papel importante en la organización, estabilidad y función de barrera de la membrana externa. Numerosos bacteriófagos hacen uso de endotoxinas o lipopolisacáridos en general para el reconocimiento específico de sus bacterias hospedadoras.

Las endotoxinas son biomoléculas que se encuentran en prácticamente todas las disoluciones acuosas sin las correspondientes medidas de protección. Las endotoxinas actúan en hombre y animales de forma fuertemente pirogénica, causan así reacciones febriles y pueden conducir a sepsis, una fuerte reacción anómala del sistema inmunitario que está acompañada por una alta tasa de mortalidad. Por tanto, por ejemplo, en la preparación de proteínas para uso médico o farmacéutico, han de detectarse exactamente las impurezas de endotoxina y eliminarse completamente a continuación. La endotoxina representa un problema en medicamentos preparados por ingeniería genética, productos de terapia génica o sustancias que se inyectan en personas o animales (por ejemplo, tratamiento de medicina veterinaria o en ensayos en animales). No solo en aplicaciones médicas, sino también de investigación como en experimentos de transfección de células de mamífero, puede observarse una inhibición o una reducción de la eficacia de transfección por endotoxina.

Todas las variantes de endotoxina están compuestas por un heteropolisacárido que está unido covalentemente a lípido A (Holst, O., 1999, en: "Endotoxin in health and disease" (Brade, H. y col.; eds.), Marcel Dekker Inc. Nueva York)). El lípido A ancla la endotoxina en la membrana bacteriana externa. El heteropolisacárido, que está compuesto por un oligosacárido central y el antígeno O, se muestra en la disolución circundante y determina la identidad serológica de la bacteria. El antígeno O está compuesto por unidades repetidas de oligosacárido cuya composición es específica de cepa (véase para ello Holst y col., supra). Los componentes característicos del oligosacárido central son ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico (KDO) y L-glicero-D-manoheptosa (Hep).

La parte más conservada de endotoxinas de distintos géneros es el lípido A. Igualmente conservada que el lípido A está la región central interna, mientras que la región central externa presenta ya una mayor variación. La región central interna, KDO y lípido A portan en sí varios grupos fosfato como sustituyentes y son así responsables de la carga negativa de la endotoxina. Además, los grupos fosfato pueden estar sustituidos variablemente en el lípido A y la región central con arabinosa, etanolamina y fosfato. Los componentes sacáridos individuales del antígeno O están acetilados, sializados o glucosilados. El antígeno O varía además respecto al número de unidades repetidas, por lo que la población de endotoxinas de cada bacteria presenta una cierta heterogeneidad (Palva E.T. y Makela P.H., *Eur. J. Biochem.* 1980; 107(1): 137-43; Goldman R.C. y Leive L., *Eur. J. Biochem.* 1980; 107(1): 145-53).

Para poder utilizar proteínas en el ámbito de los estudios clínicos, las farmacopeas europea y estadounidense demandan que las proteínas estén por debajo de determinados valores límite de carga de endotoxina (por ejemplo, globulina de inmuosuero $\leq 0,91$ UE/ml, esto corresponde a ≤ 5 UE/kg de peso corporal y hora (dosis = UE/kg x h); UE=

5 unidad de endotoxina; "FDA (Food and Drug Administration): Guideline on Validation of LAL as End Product"). En caso de un medicamento o proteínas contenidas en el mismo que presenten una carga de endotoxina demasiado alta, esto puede conducir a la muerte del paciente. Una defensa inmunitaria mal dirigida daña a los pacientes por una
 10 sobrerreacción. Esto puede conducir a inflamaciones de tejidos, caída de la presión sanguínea, taquicardias, trombosis hasta choque séptico con fallo multiorgánico. Ya una exposición sostenida largo tiempo a endotoxina en cantidades de picogramos puede conducir a efectos secundarios crónicos como, por ejemplo, inmunodeficiencia, síntomas sépticos, etc. En el ámbito de la preparación de sustancias, particularmente en procesos en condiciones de "Buenas prácticas de fabricación" (BPF), se intenta por tanto reducir o eliminar lo más posible las endotoxinas. Sin embargo, la eliminación de
 15 endotoxinas de proteínas, polisacáridos y ADN es problemática. Precisamente en proteínas, hay grandes problemas por sus propiedades intrínsecas como estado de carga o hidrofobicidad, que pueden casi impedir la eliminación de endotoxinas o conducir a grandes pérdidas de producto en el procedimiento de eliminación.

Además, la detección así como eliminación de endotoxinas están influidas por el entorno, ya que factores como, por ejemplo, la composición iónica, el pH, la temperatura o la presencia de otras sustancias pueden cambiar
 20 decisivamente la interacción de un ligando con la endotoxina. A este respecto, ha de considerarse que la interacción de ligandos puede realizarse con distintas partes estructurales de las endotoxinas, como el lípido A hidrófobo o la parte polisacárida hidrófila. Estas interacciones se basan correspondientemente en general en fuerzas iónicas o hidrófobas que están influidas diferentemente por la composición de la disolución.

La estructura polisacárida de las endotoxinas se estabiliza mediante iones divalentes cargados positivamente, como calcio o magnesio (Galanos C. y Lüderitz O., Eur. J. Biochem. 1975; 54: 603-610). Estos iones pueden mediar
 25 también la interacción con ligandos ("efecto puente").

Para el empobrecimiento o eliminación de endotoxinas en disoluciones biológicas, hay en general una serie de procedimientos. Particularmente en proteínas, no hay sin embargo hasta ahora procedimientos estándar aplicables en general. Los procedimientos usados respectivamente están adaptados a las propiedades específicas de la proteína respectiva y al correspondiente proceso de producción de la proteína. Hay distintas posibilidades para el
 30 empobrecimiento de endotoxinas, presentando cada uno de estos procedimientos ventajas y desventajas específicas.

La ultrafiltración (Petsch, D. y Anspach, F.B., 2000, J. Biotechnol. 76, 97-119 y referencias en el mismo) se usa para empobrecimientos de endotoxina en agua y disoluciones con componentes de bajo peso molecular como sales, azúcares y antibióticos, pero no es adecuada para proteínas de alto peso molecular o ADN.

La extracción bifásica (por ejemplo, documento WO 01/66718, Merck) debe separar proteínas hidrosolubles y
 35 ADN de endotoxinas, pero causa restos de detergente en el producto purificado. El procedimiento es además laborioso por las múltiples repeticiones del procedimiento de purificación.

Se usa igualmente para el empobrecimiento de endotoxinas en ADN y proteínas ácidas un procedimiento de intercambiador aniónico (DEAE) (por ejemplo, documentos US 5.990.301, Qiagen; WO 94/14837, Enzon; EP 0592989 A2, Braun Melsungen), que supone sin embargo una baja fuerza iónica (<NaCl 50 mM) y conduce a una coadsorción de proteína en proteínas ácidas. Para proteínas básicas, se utilizan intercambiadores catiónicos que se combinan en parte con detergentes (por ejemplo, documento US 2002/0147315 A1).

Se usan péptidos catiónicos para la eliminación de endotoxinas en el documento EP 1232754 B1 (Commonwealth Biotechnologies).

Se utilizan también matrices hidrófilas como una combinación de dextrano y *N',N'*-metilénbisacrilamida (documento US 5.917.022).

Se utilizan procedimientos cromatográficos hidrófobos en el documento WO 94/14837 (Enzon).

Es un procedimiento adicional para el empobrecimiento de endotoxinas en ADN y proteínas (por ejemplo, BSA, mioglobina, gammaglobulina, citocromo C) la adsorción por afinidad (por ejemplo, polimixina B, histamina, histidina, poli-L-lisina, polietilenimina), por ejemplo, documentos GB 2.192.633 (Hammersmith Hospital), US 2002/0130082 A1 (Tokodoro), US 5.510.242 o WO 95/025117 (GMBF), pero en el caso de la polimixina B es tóxica y puede conducir a la
 45 coadsorción de proteínas a bajas fuerzas iónicas.

Los siguientes procedimientos describen la eliminación de endotoxinas con ayuda de cromatografía por afinidad de metal (documentos US 6.365.147; US 6.942.802; WO 02/083710, American Cyanide).

Se utilizan igualmente proteínas de unión a LPS o péptidos o derivados de las mismas para la unión específica de endotoxinas (documentos US 6.376.462, Xoma Corp.; US 6.384.188, Dana Faber Cancer Institute; WO 95/005393, Morphosys; WO 95/008560, Centocor; WO 95/025117, Scripps).

Se utiliza además la cromatografía por inmutafinidad, en la que puede conseguirse la especificidad por

determinadas endotoxinas solo mediante costosos anticuerpos (documentos US 5.179.018, Centocor; WO 00/08463, Bioserv; EP 0074240 A2, Gaffin) contra oligosacárido Hera.

5 Además, se usa el péptido S3delta (documento WO 01/27289) del factor C (un componente del ensayo LAL) (documento WO 99/15676, ambos de la National University of Singapur) en proteínas (por ejemplo, BSA, quimotripsinógeno), poseyendo sin embargo este procedimiento una baja eficacia a altas fuerzas iónicas y alcanzando altos costes de preparación (producción en cultivo de células de insectos).

10 Además, se usa la proteína neutralizante de endotoxina (ENP) de *Limulus polyphemus*, que se une igualmente con especificidad a endotoxina, para el empobrecimiento de endotoxinas (por ejemplo, documentos US 5.747.455; US 5.627.266) o la proteína de unión a LPS de cangrejo de herradura (documento US 5.760.177). La obtención de esta proteína de cangrejo de herradura o de forma recombinante a partir de *Saccharomyces* es igualmente laboriosa y costosa.

15 Se describe un procedimiento adicional para la eliminación de endotoxinas de una muestra en el documento WO 2004/001418. Las endotoxinas se unen de este modo a una proteína de cola de bacteriófago inmovilizada sobre un portador y se separan así de la muestra. Para una separación eficaz, son necesarios sin embargo iones divalentes, con lo que el procedimiento no puede usarse con tampones industrialmente relevantes como, por ejemplo, tampones fosfato o citrato, ni tampoco en presencia de quelantes como EDTA o EGTA.

En la aplicación en la industria farmacéutica, se encuentran para disoluciones proteicas, adaptadas a las propiedades de las proteínas diana, esencialmente tres procedimientos:

- Cromatografía de intercambio aniónico.
- 20 • Cromatografía en fase inversa; Esta tiene la desventaja de que no es igualmente adecuada para todas las proteínas, particularmente es problemática en proteínas hidrófobas. Además, este procedimiento es muy laborioso y las proteínas se desnaturalizan normalmente en las condiciones de cromatografía en fase inversa, así que deben renaturalizarse después de modo costoso y a menudo ligado a una gran pérdida de material.
- 25 • RemTox (compañía Millipore): Este procedimiento tiene la desventaja de que, además de un periodo de incubación muy largo, la proporción de unión inespecífica es alta, y la recuperación de proteína a menudo no es suficiente.

30 Es posible en muchos casos un empobrecimiento bruto de endotoxinas en proteínas a un valor de hasta 10 UE/ml con los procedimientos establecidos. La concentración de endotoxina restante sigue siendo tóxica sin embargo. Es necesario por tanto un empobrecimiento adicional (es decir, purificación fina) o dependiente de la dosis de proteína en la aplicación médica. La Farmacopea Europea, la USP (United States Pharmacopeial Convention) y la FDA (Food and Drug Administration) estipulan los valores límite obligatorios para aplicaciones médicas (por ejemplo, 5 UE/kg de peso corporal y hora en aplicaciones intravenosas). No obstante, a menudo esta purificación fina no está suficientemente garantizada con los procedimientos existentes. Los procedimientos comercializables presentan aquí desventajas considerables y frecuentemente no son aplicables a determinadas proteínas, o solo con pérdidas considerables de la proteína diana.

35 Con respecto a las aplicaciones industriales, ha de considerarse además que por razones financieras se emplean solo sustancias tampón lo más económicas posibles como, por ejemplo, fosfato, citrato, borato, carbonato o acetato. La interacción de ligandos con endotoxinas debería por tanto perjudicarse lo menos posible por estos tampones. Para reacciones de unión que requieren calcio, son particularmente problemáticos los tampones o aditivos que complejan calcio, como EDTA, EGTA o citrato. Además, son tampones problemáticos aquellos que forman precipitados insolubles o débilmente solubles de sus sales con calcio. El fosfato de calcio, por ejemplo, precipita, por lo que en tampones fosfato solo están presentes bajas concentraciones de calcio libre.

40 Además del empobrecimiento o eliminación de endotoxinas, la detección de endotoxinas en muestras, disoluciones o preparados farmacéuticos desempeña un papel esencial. Actualmente, se han descrito 6 procedimientos para la detección de endotoxinas en disoluciones biológicas, en los que solo los dos primeros procedimientos están admitidos por la FDA. El EAA está admitido por el TPD (Therapeutic Product Directorate of Canada) y en determinadas condiciones (alto riesgo de sepsis en pacientes en cuidados intensivos) también por la FDA. 1. "Ensayo de pirógeno en conejo": Un procedimiento en el que se inyecta en un conejo vivo una disolución de endotoxina y se desencadena por tanto una reacción inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria causada por endotoxina se detecta mediante el desarrollo de fiebre. 2. Mucho más estandarizable es el ensayo de "lisado de amebocito de *Limulus* (LAL)", que actualmente es el ensayo más frecuentemente usado (Cambrex-BioWhittaker, Inc., Charles River, Inc., Associates of Cape Cod, Inc., todos los EE.UU.). En este procedimiento, se desencadena una cascada enzimática después de contacto con endotoxina en la sangre de cangrejo de herradura (*Limulus polyphemus*). La presencia de endotoxina puede medirse entonces con cuatro procedimientos distintos (ensayo de gel-coágulo, turbidimétrico, colorimétrico y cromogénico). 3. El

5 ensayo de pirógeno *in vitro* está basado en la detección de interleucina 1 β en sangre humana, que participa en la inducción de fiebre. El ensayo consiste en una etapa de incubación de sangre humana con la disolución a analizar y la posterior detección de la interleucina mediante anticuerpos. 4. Es un procedimiento similar la detección de la inducción de prostaglandina (PGE2) en sangre de conejo después de contacto con endotoxina (Ochiai y col., Microbiol. Immunol., 2003, 47, 585-590). 5. Es otra posibilidad el empleo de un sistema de cultivo celular especial (Sterogene Inc., EE.UU.) con el que se sigue la activación de monocitos mediante la generación de determinadas citocinas. 6. El EAA (ensayo de actividad de endotoxina) de la compañía Spectral Diagnostics, Inc., Canadá, es igualmente un ensayo sanguíneo. La endotoxina reacciona con anticuerpos, en los que la señal se refuerza después de activación de complemento en los neutrófilos endógenos del paciente con la ayuda de un zimosano, y se detecta como quimioluminiscencia. Los dos procedimientos citados en primer lugar son sin embargo muy caros y cuestionables, no solo por razones de protección de animales, por la gran necesidad de animales de ensayo o de sangre del muy raro cangrejo de herradura. El ensayo LAL puede ciertamente miniaturizarse y automatizarse, pero tiene grandes desventajas en la aplicación. Es trabajoso, requiere personal especialmente formado, tiempos de incubación relativamente largos, volúmenes de muestra relativamente grandes y reactivos caros. Una vez iniciada una disolución de LAL, debe seguir procesándose y aplicándose directamente, ya que los componentes se agregan al cabo de pocas horas debido a su baja estabilidad. En la práctica del ensayo, deben estar presentes igualmente iones divalentes, el intervalo de pH es relativamente limitado (pH 6-7,5) y los glucanos frecuentemente presentes perjudican el ensayo. La endotoxina está a menudo enmascarada, es decir, no se reconoce, por ejemplo, cuando se presenta unida a proteínas. El ensayo de pirógeno *in vitro* requiere sangre humana lo más fresca posible y es relativamente laborioso, ya que la producción de interleucina requiere 10-24 horas. La ventaja principal de este procedimiento reside en que además de endotoxinas reconoce también otros pirógenos. Este ensayo se pretende principalmente como sustitutivo del “ensayo de pirógeno de conejo”. Para todos los procedimientos de ensayo, es necesario personal formado y los procedimientos son muy sensibles a interferencias porque, por ejemplo, el sistema inmunitario de los conejos puede reaccionar a la misma dosis de endotoxina de forma completamente distinta. El procedimiento de cultivo celular de la compañía Sterogene es, como todos los procedimientos de cultivo celular, igualmente muy costoso y presente problemas en la estandarización. Si se comparan los distintos procedimientos para la detección de endotoxinas, los resultados no coinciden a menudo, es decir, distintas endotoxinas no se reconocen de igual modo por los distintos componentes de ensayo. En conjunto, puede constatar que no hay procedimientos económicos fácilmente manejables para la detección de endotoxinas y que los procedimientos utilizados actualmente presentan una serie de desventajas.

30 Por tanto, la invención se basa en el objetivo de poner a disposición agentes y procedimientos con los que puedan eliminarse y detectarse endotoxinas de y en dichas disoluciones independientemente del contenido de iones positivos divalentes.

El objetivo se consigue mediante el objeto definido en las reivindicaciones.

Las siguientes figuras ilustran la invención.

35 La Figura 1 muestra el resultado de la eliminación de endotoxina con la ayuda de T4p 12-Sepharose (A), N-Strep-Miro2p12-Sepharose (B) und N-Strep-Aehlp12-Sepharose (C) de tampones “que contienen calcio” (con calcio) y “exentos de calcio” (sin calcio). Las barras negras muestran respectivamente la cantidad de endotoxina aplicada y las barras rayadas la cantidad de endotoxina después del recorrido de la disolución por la correspondiente Sepharose. Las cantidades de endotoxina se midieron con el ensayo LAL (ensayo LAL cinético-cromogénico, Cambrex) y se dan en unidades de endotoxina (UE). Se inmovilizaron proteínas de cola de bacteriófago en primer lugar sobre Sepharose activada con NHS (Amersham Biosciences) y a continuación se rellenaron columnas de cromatografía con este material de Sepharose acoplado. Se rellenaron las columnas con volúmenes de 1 ml (T4p12, N-Strep-Miro2p12) y 200 μ l (N-Strep-Aehlp12). Como cuerpos de columna, se usaron 1 ml de cuerpo de columna de polipropileno (Qiagen) y columnas Handee Mini-Spin (200 μ l, Pierce). Se equilibraron las columnas en primer lugar con el tampón de desarrollo (6 veces el volumen de columna), se aplicaron las muestras y a continuación se lavaron con 3 veces el volumen de columna. Se representan respectivamente lado a lado las cantidades de endotoxina en la aplicación (barras negras) y en la circulación (barras rayadas). Se llevaron a cabo los ensayos con tampón “que contiene calcio” y “exento de calcio”. El tampón “que contiene calcio” estaba compuesto por Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,5; y el tampón “exento de calcio” por Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5. Con T4p12-Sepharose, pudo eliminarse endotoxina de la disolución solo en el tampón “que contiene calcio”, mientras que con N-Strep-Miro2p12- y N-Strep-Aehlp12-Sepharose, el calcio no tenía influencia sobre la eliminación de endotoxina.

55 La Figura 2A-C muestra el resultado de la eliminación de endotoxina de una disolución de BSA mediante columnas de cromatografía con Miro2p12 inmovilizada en comparación con columnas de polimixina y T4p12. El tampón de desarrollo (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5) contenía EDTA 2 mM y por tanto solo una muy baja concentración de calcio libre (< 1 μ M; Donald Bers, Chris Patton, Richard Nuccitelli, “Methods in Cell Biology”, vol. 40; “A practical guide to the study of Ca in living cells”; capítulo 1 “A practical guide to the preparation of Ca Buffers”, Academic Press, 1/94.). Las columnas de cromatografía contenían respectivamente 2 ml de material de columna. Antes de la aplicación de la muestra (fracción F0), se reunió 1 ml de circulación del tampón de desarrollo (F1). A continuación, se

aplicaron respectivamente 1 ml de una disolución de BSA (1,2 mg/ml), que se había enriquecido con aproximadamente 2000 UE/ml, sobre cada columna y se recogieron otras dos fracciones de 4 ml y 3 ml (F2 y F3). En la Fig. 2(A), se representan las cantidades de endotoxina y en la Fig. 2(B) las cantidades de BSA en la aplicación y las fracciones F1-F3 de columna de polimixina B (barras moteadas), de columna de T4p12 (barras rayadas) y de columna de Miro2p12 (barras oscuras). En la Fig. 2(C), se muestra la eliminación porcentual de endotoxina (barras oscuras) y la recuperación de proteína (barras rayadas), calculada para la segunda fracción: con T4p12 no pudo eliminarse endotoxina en estas condiciones de tampón, mientras que con la columna de polimixina B pudo eliminarse un 96% y con la columna de Miro2p12 un 99,6% de endotoxina. La recuperación de proteína ascendía para polimixina B a un 67% y para Miro2p12 a un 92%. La separación porcentual de endotoxina muestra cuánta endotoxina presente en la muestra al inicio del experimento se eliminaba mediante el tratamiento con Miro2p12 u otras proteínas. La recuperación de proteína da información además de cuánta de la proteína utilizada está presente todavía en la muestra después de la eliminación de endotoxina o de la que se eliminó inespecíficamente por la eliminación de endotoxina.

La Figura 3A-C muestra el resultado de la eliminación de endotoxina de una disolución de BSA mediante columnas cromatográficas con Miro2p12 inmovilizada en comparación con columnas de polimixina B y T4p12. Como tampón de desarrollo, se usó en este experimento el tampón PBS fisiológicamente importante (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4). Las columnas de cromatografía contenían respectivamente 2 ml de material de columna. Antes de la aplicación de la muestra (fracción F0), se reunió 1 ml de circulación del tampón de desarrollo (F1). A continuación, se aplicó respectivamente 1 ml de una disolución de BSA (1,2 mg/ml), que se había enriquecido con aproximadamente 1800 UE/ml, sobre cada columna, y se recogieron dos fracciones adicionales de 4 ml y 3 ml (F2 y F3). En la Fig. 3(A), se representan las cantidades de endotoxina y en la Fig. 3(B) las cantidades de BSA en la aplicación y en las fracciones F1-F3 de la columna de polimixina B (barras moteadas), de la columna de T4p12 (barras rayadas) y de la columna de Miro2p12 (barras oscuras). En la Fig. 3(C), se representa la eliminación porcentual de endotoxina (barras oscuras) y la recuperación de proteína (barras rayadas) calculada para la segunda fracción. Con polimixina B, pudieron eliminarse un 97%, con T4p12 un 74% y con Miro2p12 un 99,7% de endotoxina. La recuperación de proteína ascendía para polimixina B a un 61%, para T4p12 a un 99,4% y para Miro2p12 a un 99,8%.

La Figura 4 A-C muestra el resultado de la eliminación de endotoxina de una disolución de BSA mediante columnas cromatográficas con Mim2p12 inmovilizada en comparación con columnas de polimixina B y T4p12. Se usó un tampón citrato (citrato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0) que puede unirse a iones de calcio. Las columnas cromatográficas contenían respectivamente 1,5 ml de material de columna. Antes de la aplicación de la muestra (fracción F0), se reunió 1 ml de paso del tampón de desarrollo (F1). A continuación, se aplicaron respectivamente 1 ml de una disolución de BSA (0,96 mg/ml), que se había enriquecido con aproximadamente 750 UE/ml, sobre cada columna y se recogieron dos fracciones adicionales de 4 ml y 3 ml (F2 y F3). En la Fig. 4(A), se representan las cantidades de endotoxina y en la Fig. 4(B) las cantidades de BSA en la aplicación y en las fracciones F1-F3 de la columna de polimixina B (barras moteadas), de la columna de T4p12 (barras rayadas) y de la columna de Miro2p12 (barras oscuras). En la Fig. 4(C), se representa la eliminación porcentual de endotoxina (barras oscuras) y la recuperación de proteína (barras rayadas), calculada para la segunda fracción. Con polimixina B, pudieron eliminarse un 96,2%, con T4p12 un 0% y con Miro2p12 un 99,5% de endotoxina. La recuperación de proteína ascendió para polimixina B a un 78,3%, para T4p12 a un 97,8% y para Miro2p12 a un 95,4%.

La Figura 5 muestra el resultado de la detección de endotoxina mediante la unión de T4p12 a endotoxina inmovilizada (sándwich de Miro2p12-endotoxina-T4p12). Se inmovilizó covalentemente en el material de columna (0,5 ml) la proteína de cola de bacteriófago Miro2p12 (3,4 mg de proteína/ml de material de columna). Se añadió una muestra que contenía endotoxina de *E. coli* 055:B5 (10^6 UE/ml) sobre la columna y se unió a Miro2p12 (+LPS, barras negras). Se equilibró una columna de control con la muestra sin endotoxina (-LPS, barras estriadas). Se representó la cantidad de proteína de cola de bacteriófago p12 frente a las fracciones del recorrido de cromatografía. Cada barra muestra el valor medio que se estableció a partir de dos recorridos cromatográficos paralelos. El primer par de barras (F0) muestra la cantidad de T4p12 aplicada y el segundo la fracción 1 (F1), una fracción de control antes de la aplicación de T4p12 sobre la columna. La flecha marca la aplicación de p12 sobre la columna. Se reunieron las fracciones F2-F5 después de la aplicación. Se estableció la cantidad de p12 (dada en mg) mediante medida de la absorción a 280 nm. El volumen de fracción para las fracciones F1-F4 era de 1 ml y para la fracción F5 de 2 ml. Se realizó la liberación de la proteína T4p12 unida en la fracción F5 mediante la adición de EDTA 2 mM al tampón de desarrollo (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 0,1 mM, pH 7,5). Se retuvo la proteína de cola de bacteriófago T4p12 en las columnas que anteriormente se habían cargado con endotoxina, mientras que por las columnas que no contenían endotoxina eluyó sin retardo.

La Figura 6 muestra el resultado de la unión de Miro2p12 con endotoxina mediada por T4p12. Se empleó un chip CM-5 de la compañía Biacore con T4p12 inmovilizada covalentemente (acoplamiento de EDC/NHS). En primer lugar, se inyectó endotoxina (de *E. coli* 055:B5; 1 mg/ml), que se muestra como el aumento de la señal de resonancia, que se une a T4p12. A continuación, se inyectó Miro2p12 (0,02 mg/ml), que se une igualmente, que se muestra como el aumento de la señal de resonancia. Mediante la adición de EDTA, se volvió a separar la unión de endotoxina-T4p12 al final del experimento. Las fases de inyección se caracterizan por las barras. Como tampón de desarrollo, se usó Hepes

20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,1 mM. La segunda celda no cargada del chip sirvió como celda de referencia. La curva muestra la diferencia de la celda de medida y de referencia. UR significa unidades de resonancia, s significa segundos.

La Figura 7 muestra el resultado de la eliminación de endotoxina de suero humano con la ayuda de N-Strep-Miro2p12 inmovilizada sobre Sepharose. Sobre dos columnas de N-Strep-Miro2p12-Sepharose (volumen de columna: 1 ml, columna 1= barras negras, columna 2= barras estriadas), se aplicaron respectivamente 1 ml de suero humano enriquecido con endotoxina de *E. coli* 055:B5 (F0) y se reunieron después de la columna fracciones de 4 o 3 ml (F2, F3). La flecha marca la aplicación de la muestra. Antes de la aplicación, se lavó la columna con 1 ml de tampón de desarrollo (F1) para asegurar que la columna no está contaminada con endotoxina. El tampón de desarrollo estaba compuesto como sigue: Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5. Pudo separarse un 90% de la endotoxina aplicada, es decir, se retuvo en la columna.

La Figura 8 muestra el resultado de la eliminación de endotoxina con la ayuda de Aeh1p12, que se había inmovilizado sobre Sepharose (2,5 mg de Aeh1p12 por 1 ml de Sepharose), en comparación con Sepharose que se había cargado con etanolamina en lugar de Aeh1p12, para saturar los grupos reactivos de la Sepharose activada. El ensayo se llevó a cabo con y sin calcio en el tampón de desarrollo, para analizar la influencia del calcio sobre la eliminación de endotoxina. Los tampones de recorrido estaban compuestos como sigue: barras negras (+ Ca): Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,5. Barras estriadas (- Ca): Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5. Se rellenaron respectivamente con 0,2 ml las columnas y se lavaron estas antes del ensayo con 2 ml de desoxicolato de sodio al 0,5%, 15 ml de agua y 2 ml de tampón de desarrollo. A continuación, se aplicaron 0,2 ml de lipopolisacárido de *E. coli* 055:B5 (aproximadamente 1000 UE/ml), que se habían disuelto en el respectivo tampón de desarrollo. Se incubó esta muestra durante 30 min a temperatura ambiente, se dejó drenar y se lavó con 0,6 ml y 1 ml de tampón de desarrollo. Se analizó el contenido de endotoxina de estas fracciones mediante el ensayo LAL y se calculó la eliminación porcentual de endotoxina mediante las cantidades de endotoxina antes y después de la columna. Con Aeh1p12 (88% y 84%) pudo eliminarse claramente más endotoxina de la disolución que con la columna de control (25% y 39 %) que no contenía proteína. El calcio libre no es necesario para la unión de la endotoxina a Aeh1p12, ya que la eliminación de endotoxina era similar con calcio (88%) y sin calcio (84%) en el tampón.

La Figura 9 muestra el resultado de la eliminación de endotoxina con la ayuda de Effe04p12. La proteína acopló covalentemente con Sepharose y a continuación se incubó esta Sepharose con una disolución de endotoxina, que se separó de nuevo mediante centrifugación de la Sepharose. Se llevó a cabo la eliminación de endotoxina en un tampón exento de calcio (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5). En primer lugar, se lavaron 100 µl de Effe04p12-Sepharose con 1 ml de tampón exento de endotoxina (F1) y a continuación se aplicaron 100 µl de disolución de endotoxina (lipopolisacárido de *E. coli* O55:B5) sobre la Effe04p12-Sepharose. Se incubó la Sepharose durante 30 min con la disolución de endotoxina y se mezcló a este respecto varias veces con agitación. A continuación, se separó la disolución de la Sepharose mediante una columna Mini-Spin y se lavó con 200 µl de tampón (F2). Para terminar, se lavó dos veces más con 200 µl respectivamente (F3 y F4). Se determinó el contenido de endotoxina en la aplicación (F0) y en las fracciones mediante un ensayo de LAL y se calculó así una eliminación porcentual de endotoxina de un 92,5%.

La Figura 10 muestra las estructuras centrales de azúcar de mutantes de *E. coli* que se han usado para análisis de unión con NStrep-Miro2p12. Hep = heptosa, Kdo = 2-ceto-3-desoxioctulosonato, Glc = glucosa, Gal = galactosa, GlcNAc = *N*-acetilglucosamina.

La Figura 11 muestra una comparación de secuencia a nivel de aminoácidos entre distintas proteínas de cola de bacteriófago. La comparación de secuencia se llevó a cabo con Clustal V (1.81) con los siguientes ajustes, alineándose las secuencias de T4p12, T2p12 y K3p12 en primer lugar con el "modo de alineamiento múltiple":
Parámetros de alineamiento:

Parámetros emparejados:

Alineamiento emparejado: lento-exacto

Abertura de hueco [0-100]: 10

Extensión de hueco [0-100]: 0,1

Matriz de peso de proteína: Gonnet 250

Parámetros múltiples:

Abertura de hueco [0-100]: 10

Extensión de hueco [0-100] 0,2

Secuencias divergentes con retardo (%): 30

Matriz de peso de proteína: serie Gonnet

Parámetros de hueco de proteína

Penalizaciones específicas de residuo: Activadas

Penalizaciones hidrófilas: Activadas

5 Residuos hidrófilos: GPSNDQEKR

Distancia de separación de hueco [0-100]: 4

Separación de hueco final: desactivada

Calidad- Parámetros de puntuación de columna:

Escala de representación de la puntuación: 5

10 Corte de excepción de residuo: 5

Matriz de peso de proteína: Gonnet PAM 250

15 Las secuencias de fago para el alineamiento pueden encontrarse en la base de datos de secuencias de proteínas del NCBI o son proteínas nuevas aisladas por los inventores y sus secuencias 44RR2.8t, N° ref.: AAQ81466; RB49, n° ref.: AAQ15392; T2, n° ref.: CAA39905; T4, n° ref.: AAD42417; PP01, n° ref.: BAD20635; RB69, n° ref.: AAP76072; Aeh1, n° ref.: AAQ17871; KVP40, n° ref.: AAQ64417; AR1, n° ref.: AAN03609. Las correspondientes proteínas de los fagos PHG31 y RB43 se encuentran en <http://phage.bioc.tulane.edu/>; la proteína del fago K3 se describe en Burda M.R., Hindenach I., Miller S., Biol. Chem. (2000) 381, 225-258.

20 La Figura 12 muestra el resultado de la detección de endotoxina mediante la formación de un sándwich de Miro2p12-endotoxina-Miro2p12 en un procedimiento de cromatografía en columna. Se usaron 4 columnas (1 ml de volumen) en las que se acoplaron covalentemente Miro2p12 con Sepharose (5 mg de proteína/ml de material de columna), como se describe en el ejemplo 5. Dos de ellas se cargaron con LPS de *E. coli* O55:B5 (10^6 UE en 1 ml de tampón PLS, fosfato de sodio 10 mM, NaCl 70 mM, pH 7,4) (+ ET, barras negras) y dos sirvieron como controles (-ET, barras blancas). Como tampón de desarrollo sirvió fosfato de sodio 10 mM, NaCl 80 mM, pH 7,4. Se aplicó sobre todas las columnas Miro2p12 (cada vez 600 μ l de una solución con proteína 0,1 mg/ml). Se determinó la cantidad de Miro2p12 aplicada o eluída mediante la absorción a 280 nm. Se representó la cantidad de proteína de cola de bacteriófago Miro2p12 frente a las fracciones del recorrido cromatográfico. La fracción 3 (F3) muestra el paso de Miro2p12 después de la aplicación (F0), o sea toda la proteína de cola de bacteriófago que no se había retenido en la columna, la fracción 4 (F4) es una fracción de lavado. Después del lavado, se añadió tampón de regeneración RB (fosfato de sodio 10 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4) (véase la marca de la flecha) o se volvió a retirar de la columna la Miro2p12 unida a endotoxina. A continuación, se reunieron las fracciones 5 y 6. La fracción F3 tiene un volumen de 0,6 ml, todas las demás fracciones tienen un volumen de 1 ml. Como control, se representa la aplicación sobre la columna (F0) con la cantidad total de Miro2p12. Se observa que, en las columnas sobre las que se inmovilizó previamente endotoxina, se retuvo Miro2p12, mientras que sobre las columnas de control sin endotoxina se unió inespecíficamente solo una pequeña cantidad de Miro2p12.

35 La Figura 13 muestra el resultado de la detección directa de endotoxina inmovilizada con la ayuda de Miro2p12 marcada con biotina. Se inmovilizó LPS de *E. coli* O55:B5 (3 μ g/ml) en placas de PolySorp (Nunc) mediante adsorción (18 h a temperatura ambiente en tampón PBS, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4). Seguidamente, se bloquearon las placas de microvaloración con caseína (0,05% en PBS, 1,5 h a TA) y se lavaron una vez con tampón PBS. No se incubaron las placas de control con endotoxina, sino que solo se bloquearon con caseína. Se añadieron respectivamente 200 μ l de Miro2p12 marcada con biotina (Miro2p12-bio) en Tris 50 mM, pH 8, 0,05% de caseína, 0,05% de Tween 20 a concentraciones crecientes (barras blancas: placas sin ET, barras negras: placas con ET, concentraciones de proteína como se han dado). La detección de Miro2p12 marcada con biotina unida a endotoxina se realizó mediante la medida de absorción a 405 nm después de la unión de un conjugado de estreptavidina con fosfatasa alcalina (Amersham Biosciences) con adición de pNPP (fosfato de para-nitrofenilo) a una concentración de 0,8 g/ml como sustrato cromogénico. La Miro2p12 marcada con biotina se une de forma dependiente de la concentración a las placas de microvaloración que se recubrieron previamente con endotoxina.

50 La Figura 14 muestra el resultado de la unión de endotoxina marcada con FITC sobre una superficie que se recubrió previamente con Miro2p12. La detección de endotoxina unida a proteína de cola de bacteriófago se realiza en un ELISA específico de FITC. Se adsorbió Miro2p12 (cada vez 200 μ l con 5 μ g/ml de proteína) en una placa MaxiSorp (Nunc) (16 h a TA en PBS, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4). Seguidamente, se bloquearon las placas de microvaloración con caseína (0,05% de caseína en PBS, 1,5 h a TA, cada vez 200 μ l por

pocillo) y se lavaron una vez con tampón PBS. Las placas de control no se incubaron con Miro2p12, sino que solo se bloquearon con caseína. Se añadieron respectivamente 100 µl de LPS marcado con FITC de *E. coli* O55:B5 (Sigma) en PBS a concentración creciente (barras blancas: placas sin Miro2p12, barras negras: placas con Miro2p12). La detección del LPS marcado con fluorescencia unido a Miro2p12 se realizó mediante la unión de un anticuerpo específico de FITC (0,5 µg/ml, Zymed) en una primera etapa y un anticuerpo secundario que se conjugó con fosfatasa alcalina (1 µg/ml, Pierce). La cuantificación se realizó mediante medida de fluorescencia de los productos de reacción de un sustrato de fosfatasa alcalina fluorescente (umbeliferilfosfato de metilo; Sigma) con 0,1 mg/ml de umbeliferilfosfato de metilo en Tris 50 mM, pH 8 (excitación a 375 nm, emisión a 465 nm). La endotoxina marcada fluorescentemente se une de forma dependiente de la concentración a placas de microvaloración que se recubrieron previamente con Miro2p12.

El término “empobrecimiento de endotoxina” o “eliminación de endotoxina” como se usan aquí significa la eliminación completa o parcial de endotoxina del material de muestra.

El término “material de muestra” o “muestra” como se usa aquí comprende las disoluciones completas en las que deben detectarse endotoxinas o de las que deben eliminarse endotoxinas. Es un ejemplo de muestras la siguiente enumeración: agua, disoluciones acuosas y mezclas de agua y disolventes orgánicos, sangre, productos sanguíneos, plasma, suero, orina, medios, disoluciones proteicas, mezclas de agua-etanol y alimentos. Comprende además también disoluciones en las que se han disuelto sustancias sólidas no acuosas para analizar o para aislar, por ejemplo, proteínas, ADN, ARN, azúcares, sales, medicamentos, vacunas, alimentos, productos químicos orgánicos e inorgánicos (por ejemplo, NaCl, MgCl₂, purinas, pirimidinas y demás).

El término “endotoxina” como se usa aquí designa lipopolisacárido (LPS) bacteriano que es un componente de la membrana externa de bacterias gramnegativas.

El término “proteína de cola de bacteriófago independiente del calcio” como se usa aquí designa aquellas proteínas que aparecen en bacteriófagos y que pueden unirse a endotoxinas independientemente de la presencia de iones positivos divalentes como Ca²⁺ o Mg²⁺. Habitualmente, estas proteínas se localizan en la cola de bacteriófagos, pero pueden localizarse también en la cabeza de bacteriófagos o en bacteriófagos sin cola en la cubierta de bacteriófago normal. El término proteína de cola de bacteriófago comprende tanto proteínas de cola de bacteriófago cortas como largas. Así, los bacteriófagos con una placa basal (por ejemplo *Myoviridae*, como fagos similares a T4) pueden presentar distintas proteínas de cola de bacteriófago, las denominadas proteínas de cola de bacteriófago largas o cortas, que poseen también distinta especificidad por estructuras de membranas bacterianas. Por tanto, están comprendidas en el término “proteína de cola de bacteriófago” no solo las proteínas de cola de bacteriófago con unión a endotoxina, sino también las proteínas de cabeza de bacteriófago y las proteínas de cubierta de bacteriófago con unión a endotoxina. En consecuencia, son proteínas de cola de bacteriófago dependientes de calcio aquellas que pueden unirse a endotoxinas solo en presencia de iones positivos divalentes como Ca²⁺ o Mg²⁺.

El término “inmovilización inespecífica” o “inmovilización no dirigida” como se usa aquí significa que el acoplamiento de una proteína con una matriz se realiza mediante restos proteicos (por ejemplo, aminas primarias) que están distribuidos por toda la superficie de proteína. La selección de los grupos usados para el acoplamiento de la molécula de proteína individual es aleatoria.

El término “inmovilización dirigida” como se usa aquí significa que el acoplamiento se realiza mediante restos de aminoácidos u otros restos (por ejemplo, glicosilaciones de proteína) cuya posición en la proteína (por ejemplo, N- o C-terminal) es conocida. La selección de estos grupos para acoplamiento se realiza mediante la selección de la pareja de reacción/conector adecuado, que reacciona preferiblemente con estos restos (por ejemplo, acoplamiento de restos sulfhidrilo con restos acetato de yodo; el acetato de yodo reacciona miles de veces más rápido con los restos sulfhidrilo que con los restos amino).

El término “superficie” o “portador” como se usa aquí comprende todos los materiales en que es posible un acoplamiento o adhesión de una molécula de proteína como, por ejemplo, superficies de vidrio, materiales cromatográficos, por ejemplo agarosa o Sepharose, superficies de plástico, por ejemplo poliestireno o polipropileno, o materiales de filtro, por ejemplo celulosa.

La presente invención se refiere a proteínas de cola de bacteriófago que pueden unirse a endotoxinas tanto en presencia como en ausencia de iones positivos divalentes, particularmente en ausencia de iones positivos divalentes, particularmente Ca²⁺ o Mg²⁺.

A diferencia de las denominadas proteínas de cola de bacteriófago dependientes de calcio, o sea aquellas que pueden unirse a endotoxina solo en presencia de iones positivos divalentes, particularmente Ca²⁺ y/o Mg²⁺, las denominadas proteínas de cola de bacteriófago independientes de calcio permiten la detección de endotoxina y la eliminación de endotoxina en muestras que no contienen iones positivos divalentes, particularmente Ca²⁺ y/o Mg²⁺.

Las proteínas de cola de bacteriófago según la invención se designan en adelante como “proteínas de cola de

5

bacteriófago independientes de calcio". Se prefieren proteínas de cola cortas. Además, se prefieren proteínas de cola de bacteriófago de la familia de los *Myoviridae*, particularmente del grupo de fagos de la serie pseudo-T-par, esquizo-T-par o T-par. Se prefieren además proteínas de cola de bacteriófago que se unen al ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico (Kdo) de las endotoxinas. Se prefieren además proteínas de cola de bacteriófago que se presentan como trímeros y son resistentes frente a dodecilsulfato de sodio (SDS).

10

15

20

La presente invención se refiere a proteínas de cola de bacteriófago según la SEC ID N° (Miro1p12), SEC ID N° 4 (Miro2p12) y SEC ID N° 6 (Effe04p12), así como a las secuencias de ADN según la SEC ID N° 1 (Miro1p12), SEC ID N° 3 (Miro2p12) y SEC ID N° 5 (Effe04p12) que codifican las proteínas de cola de bacteriófago según la invención. La presente invención se refiere además a proteínas de cola de bacteriófago modificadas y a las secuencias de ADN que codifican las proteínas de cola de bacteriófago modificadas según la invención. Las proteínas de cola de bacteriófago modificadas presentan un marcador His o marcador Strep para un aislamiento facilitado de proteínas después de preparación recombinante en bacterias. Las proteínas de cola de bacteriófago según la invención con un marcador Strep son las de SEC ID N° 8 (N-Strep Miro1p12), SEC ID N° 10 (N-Strep Miro2p12), SEC ID N° 12 (N-Strep Effe04p12) y SEC ID N° 14 (N-Strep Aehlp12), así como las secuencias de ADN codificantes de SEC ID N° 7 (N-Strep Miro1p12), SEC ID N° 9 (N-Strep Miro2p12), SEC ID N° 11 (N-Strep Effe04p12) y SEC ID N° 13 (N-Strep Aehlp12). Además, pueden usarse fragmentos de proteínas de cola de bacteriófago y las secuencias de ADN que codifican los fragmentos de proteínas de cola de bacteriófago. Ya que el extremo N de estas proteínas de fago a menudo es el responsable de la unión a los fagos y el extremo C de la unión al receptor bacteriano, como se ha mostrado para el fago T4 (Makhov AM, y col., *Virology*, mayo de 1993; 194(1): 117-127), se prefieren particularmente fragmentos C-terminales. Pueden obtenerse derivados o fragmentos, por ejemplo, mediante proteólisis limitada (van Raaij MJ, y col., *Biol. Chem.* julio de 2001; 382(7): 1049-1055) o prepararse aleatoriamente por ingeniería genética. Los fragmentos pueden contener la región de unión al receptor bacteriano.

25

30

Las proteínas de cola de bacteriófago según la invención pueden usarse para el procedimiento descrito a continuación para la eliminación y detección de endotoxinas. Las proteínas de cola de bacteriófago según la invención se unen a endotoxina y son esencialmente independientes de la concentración de iones positivos divalentes, por ejemplo, Ca^{2+} y/o Mg^{2+} . Las endotoxinas pueden presentarse por tanto en disoluciones o muestras que contienen iones positivos divalentes o que no los contienen. Esencialmente independiente significa además que la disolución o muestra no presenta iones positivos divalentes libres ni unidos. La disolución o muestra puede estar por un lado totalmente exenta de iones positivos divalentes. Pero, por otro lado, los iones positivos divalentes pueden estar presentes en la disolución o muestra unidos a sustancias de unión a iones positivos divalentes, por ejemplo, EDTA, HEDTA, EGTA, citrato y similares.

35

En las proteínas de cola de bacteriófago hay dos grupos, que pueden diferenciarse por la dependencia en su unión de iones positivos divalentes, como calcio. Las proteínas de cola de bacteriófago P12, por ejemplo, los fagos de *Myoviridae* como T4, T2, K3, Ox2, RB32-33, AR1, PP01 o RB69 requieren calcio para la unión a endotoxina, mientras que las proteínas de cola de bacteriófago según la invención de los fagos Miro1, Miro2 y Effe04, así como proteínas estructuralmente similares a estas proteínas de cola de bacteriófago, por ejemplo, RB43p12, RB49p12, 44RR2p12, PHG31p12, Aehlp12 y KVP40p12, pueden unirse también a endotoxina sin calcio u otros iones positivos divalentes.

40

45

El mecanismo de unión de la proteína de cola de bacteriófago independiente de calcio Miro2p12 a endotoxina se diferencia de aquel de la proteína de cola de bacteriófago dependiente de calcio T4p12. La T4p12, una proteína de cola de bacteriófago dependiente de calcio, requiere para la unión a endotoxina la región heptosa-Kdo en la región central interna de la endotoxina. La Miro2p12, una proteína de cola de bacteriófago independiente de calcio, no requiere en cambio para la unión las heptosas en la región central interna, de hecho, la Miro2p12 puede unirse también a mutantes de la región central que poseen solo el ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico (Kdo), véase la Tabla 1. Esto se prueba también en los experimentos descritos en la Figura 5 y la Figura 6, en los que Miro2p12 y T4p12 se unen simultáneamente y por tanto a distintos sitios de unión de la endotoxina.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para la eliminación de endotoxina de una muestra que comprende las etapas de:

50

a) incubación o puesta en contacto de una muestra con proteínas de cola de bacteriófago que están inmovilizadas en un portador sólido de forma inespecífica o dirigida, siendo capaces las proteínas de cola de bacteriófago de unirse a endotoxina independientemente de la concentración de iones positivos divalentes, y a continuación

b) separación del complejo de proteína de cola de bacteriófago-endotoxina de la muestra.

55

Para el procedimiento de empobrecimiento según la invención, se acoplan las proteínas de cola de bacteriófago según la invención con portadores sólidos. Los portadores sólidos pueden ser materiales de relleno para columnas de cromatografía (por ejemplo, materiales de Sepharose), celulosa, medios de filtración, partículas de vidrio, partículas magnéticas, materiales de centrifugación o sedimentación (por ejemplo, partículas de agarosa).

Es importante a este respecto un acoplamiento funcional, es decir, las proteínas de cola de bacteriófago, a pesar de la unión al material portador, disponen de estructuras accesibles a la endotoxina. El acoplamiento de las proteínas de cola de bacteriófago puede realizarse de forma inespecífica pero también preferiblemente de forma dirigida, por ejemplo, mediante una biotilación selectiva, o acoplarse mediante un espaciador o conector.

5 Por ello, las proteínas de cola de bacteriófago según la invención pueden ligarse con sustancias de bajo peso molecular, por ejemplo biotina, para unirse mediante estas sustancias de bajo peso molecular a polipéptidos, por ejemplo, estreptavidina, que a su vez se han inmovilizado sobre el portador. En lugar de biotina, puede usarse además el denominado marcador Strep (Skerra, A. y Schmidt, T. G. M., *Biomolecular Engineering*, 16 (1999), 79-86), que es una secuencia aminoacídica corta y que se une a estreptavidina. Además, puede usarse el marcador His, que puede unirse a materiales quelantes mediante iones divalentes (cinc o níquel) como níquel-triacetato de nitrilo (Ni-NTA, Qiagen, GmbH, Hilden; no tolera EDTA) o níquel-Sepharose (General Electric HealthcareBio-Sciences/Amersham Biosciences Europe GmbH, Friburgo; tolera bajas concentraciones de EDTA) o a un anticuerpo específico del mismo (Qiagen GmbH, Hilden) en un material portador. El marcador Strep así como el marcador His se unen preferiblemente mediante tecnología de ADN recombinante a las proteínas de bacteriófago. Este acoplamiento puede realizarse de forma dirigida, por ejemplo, al extremo N o C, o no dirigida. El acoplamiento dirigido se realiza mediante un aminoácido reactivo adecuado no expuesto en superficie frecuentemente en la naturaleza en proteínas de fago como la cisteína, que se ha introducido selectivamente en sitios adecuados. Ya que las proteínas de cola de bacteriófago se sintetizan en el citoplasma, no hay que contar con puentes disulfuro. Preferiblemente, puede acoplarse también mediante otros aminoácidos directamente, o como también en cisteína indirectamente mediante un “espaciador” o “reticulante” (monofuncional o bifuncional).

En el acoplamiento de cisteína, son posibles todos los reticulantes bifuncionales con grupos reactivos NH y SH, con y sin espaciador, por ejemplo, sulfo-NHS del ácido 11-maleimidoundecanoico o 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxi-[6-amido]caproato de succinimidilo. En caso que no esté presente espaciador, pueden insertarse espaciadores de 8-12 átomos de C con grupo NH terminal. Preferiblemente, el acoplamiento de cisteína se realiza mediante una biotilación específica de la cisteína, por ejemplo, mediante biotina activada con EZ-Link-PEO (Pierce).

Además, el acoplamiento puede realizarse mediante reacciones de acoplamiento conocidas con restos proteicos como, por ejemplo, restos carboxilo, amino, hidroxilo o sulfhidrilo.

La concentración de iones positivos divalentes libres no unidos asciende preferiblemente a menos de 0,1 μM .

La separación de endotoxinas puede realizarse en un procedimiento cromatográfico o el denominado procedimiento “en lotes”. En el procedimiento “en lotes”, se mezcla la muestra cargada con endotoxina con material portador en el que se acoplan covalentemente las proteínas de cola de bacteriófago de la presente invención, y se incuban conjuntamente.

La separación se realiza después de incubar la muestra con material portador acoplado con las correspondientes proteínas de cola de bacteriófago durante aproximadamente 5-60 min o aproximadamente 30-180 min o, en caso necesario, también durante la noche. La duración de la incubación debe adaptarse a la muestra respectiva y puede variar entre 1 min y 24 h. Para ello, por ejemplo, se eluye o se filtra la muestra de la columna de cromatografía o se centrifugan o sedimentan las correspondientes partículas o se separan magnéticamente mediante la aplicación de un campo magnético. La separación en el procedimiento en lotes aquí descrito, es decir, con preincubación de la muestra y con materiales portadores acoplados con las correspondientes proteínas de cola de bacteriófago, puede ser razonable particularmente a muy bajas concentraciones de endotoxina.

El empobrecimiento de endotoxinas mediante columnas de cromatografía puede realizarse también sin embargo en procedimientos de paso puro. Para ello, se rellena en primer lugar con el material portador cargado con proteína de cola de bacteriófago según la invención una columna de cromatografía. La muestra puede aplicarse para ello a la columna que contiene un material portador con las proteínas de cola de bacteriófago acopladas al mismo. Se aplica la muestra cargada con endotoxina sobre esta columna y fluye a través de ésta, uniéndose la endotoxina a las proteínas de cola de bacteriófago y quedando en la columna. La propia muestra no presenta idealmente ninguna interacción con el material cromatográfico y se encuentra en el flujo. El caudal depende del volumen y la geometría de la columna. El caudal depende además del volumen y contenido de endotoxina de la muestra, para conseguir un empobrecimiento eficaz mediante un tiempo de contacto lo más largo posible entre columna y endotoxina también a bajas concentraciones de endotoxina. El tiempo de contacto es a este respecto el tiempo que requiere la muestra desde la aplicación a la columna hasta la salida de flujo. La endotoxina unida a la columna puede volver a eliminarse de la columna mediante lavado con tampones adecuados, de modo que las columnas pueden aprovecharse varias veces.

Las proteínas de cola de bacteriófago usadas para el procedimiento de eliminación de endotoxinas según la invención pueden ser todas las proteínas de cola de bacteriófago descritas anteriormente según la invención según las SEC ID N° 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a procedimientos para la detección de endotoxina. La detección de endotoxina se realiza mediante la detección directa de proteínas de cola de bacteriófago unidas a endotoxina o indirectamente mediante la detección de las proteínas de cola de bacteriófago no unidas en exceso en el sobrenadante o la circulación.

5 La detección directa de endotoxina comprende las siguientes etapas:

- a) puesta en contacto de una muestra que contiene endotoxina con una superficie, a continuación dado el caso
- b) eliminación de la muestra de la superficie, a continuación
- 10 c) incubación de las proteínas de cola de bacteriófago con las endotoxinas inmovilizadas sobre la superficie, siendo capaces las proteínas de cola de bacteriófago de unirse a endotoxina independientemente de la concentración de iones positivos divalentes, y a continuación dado el caso
- d) eliminación de las proteínas de cola de bacteriófago no unidas y a continuación
- e) detección de las proteínas de cola de bacteriófago unidas a endotoxina.

15 En la primera etapa, se realiza la unión de endotoxina a una superficie. La superficie puede estar recubierta mediante adsorción o acoplamiento covalente con un ligando de unión a endotoxina. Como superficies, se prefieren distintos plásticos, por ejemplo, poliestireno, polipropileno, polietileno, policarbonato, PMMA, celulosa, por ejemplo, celulosa acetato, nitrocelulosa, vidrio, silicio o agarosa. La inmovilización covalente de ligandos de unión a endotoxina como, por ejemplo, polimixina B, histidina, histamina, poli-L-lisina, DEAE, polietilenimina, ácido desoxicólico, poli- γ -aminometil-L-glutamina, poli(alcohol vinílico), poli-*N,N*-dimetilaminopropilacrilamida, dextrano, quitosano o proteínas de cola de bacteriófago independientes de calcio se realiza mediante reacciones de acoplamiento conocidas. Como alternativa, pueden unirse a la superficie estos ligandos también mediante acoplamiento de biotina-estreptavidina.

20 Las proteínas de cola de bacteriófago independientes de calcio pueden utilizarse a este respecto para la unión de endotoxinas a la superficie así como usarse para la detección de las endotoxinas unidas. Ya que las endotoxinas se presentan en general no monoméricas, sino como agregados en disolución (Mueller M, y col., *J. Biol. Chem.* 18 de junio de 2004; 279(25): 26307-26313), es también posible conseguir la unión de endotoxinas mediante una proteína de cola de fago independiente de calcio y emplear la misma proteína de cola de fago independiente de calcio para la detección de endotoxina.

25 Es igualmente posible usar una combinación de proteínas de cola de bacteriófago dependientes de calcio e independientes de calcio, en la que una de ellas sirve para la inmovilización de la endotoxina sobre una superficie y la segunda para la detección de la endotoxina unida.

Un procedimiento adicional para la detección de endotoxina comprende por tanto las siguientes etapas:

- a) puesta en contacto de una muestra que contiene endotoxinas con una superficie en la que se han inmovilizado primero proteínas de cola de bacteriófago que son capaces de unirse a endotoxina independientemente de la concentración de iones positivos divalentes, y a continuación dado el caso
- 35 b) eliminación de la muestra de la superficie, a continuación
- c) incubación de las segundas proteínas de cola de bacteriófago con las endotoxinas unidas a las primeras proteínas de cola de bacteriófago, uniéndose las segundas proteínas de cola de bacteriófago a endotoxina solo en presencia de iones positivos divalentes, y a continuación dado el caso
- 40 d) eliminación de las segundas proteínas de cola de bacteriófago no unidas y a continuación detección de las segundas proteínas de cola de bacteriófago unidas a endotoxina.

El procedimiento puede llevarse a cabo igualmente siendo la primera proteína de cola de bacteriófago una proteína de cola de bacteriófago dependiente de calcio y la segunda independiente de calcio.

Las proteínas de cola de bacteriófago que deben utilizarse para la detección según la invención deben estar dotadas únicamente de un marcador mediante el que se realiza la detección de la proteína a continuación.

45 La detección de endotoxina en o de una muestra se realiza mediante la unión de proteínas de cola de bacteriófago a endotoxina. Esta unión puede detectarse, por ejemplo, por medida directa mediante procedimientos espectroscópicos, por ejemplo, mediante emisión de fluorescencia, polarización de fluorescencia, absorción o dicroísmo circular. Además, la unión puede hacerse visible mediante señales eléctricas, por ejemplo, una medida de la capacidad. Para la detección fluorométrica, se sustituyen las proteínas de cola de fago por marcadores fluorescentes como, por

ejemplo, fluoresceína, Alexa448 o similares. Como alternativa, se realiza la detección con un procedimiento similar a ELISA, en el que los anticuerpos específicos se unen en primer lugar a las proteínas de cola de bacteriófago. La detección de estos anticuerpos sucede con la ayuda de enzimas que se fusionan directamente con los anticuerpos o que se fusionan con el denominado segundo anticuerpo, que se une al primer anticuerpo. Se tienen en cuenta como enzimas sobre todo la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano picante, pero también otras. Estas proteínas marcadoras enzimáticas pueden acoplarse también directamente con la proteína de cola de fago. Esto puede realizarse por un lado mediante la preparación de proteínas de fusión o por otro lado mediante el acoplamiento químico de ambas proteínas. Como alternativa, las proteínas de cola de bacteriófago pueden marcarse con biotina, que se detecta mediante una enzima acoplada con estreptavidina, como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante.

5

10

Un procedimiento adicional para la detección directa de endotoxina comprende las siguientes etapas:

a) puesta en contacto de una muestra que contiene endotoxina con una superficie en la que se inmovilizan proteínas de cola de bacteriófago que son capaces de unirse a la endotoxina independientemente de la concentración de iones positivos divalentes, y a continuación dado el caso

b) eliminación de la muestra de la superficie, a continuación

15

c) detección de las endotoxinas unidas en la etapa a).

La detección de endotoxina que se ha unido a una proteína de cola de bacteriófago independiente de calcio puede realizarse mediante un ELISA específico de endotoxina, o también mediante reacciones de detección química o enzimática de endotoxinas o de componentes de endotoxina escindidos.

La detección indirecta comprende las siguientes etapas:

20

a) puesta en contacto de una muestra que contiene endotoxina con una superficie, a continuación dado el caso

b) eliminación de la muestra de la superficie, a continuación

25

c) incubación de las proteínas de cola de bacteriófago con la endotoxina inmovilizada sobre la superficie, siendo capaces las proteínas de cola de bacteriófago de unirse a la endotoxina independientemente de la concentración de iones positivos divalentes, y a continuación dado el caso

d) eliminación de las proteínas de cola de bacteriófago no unidas, y a continuación

e) detección de las proteínas de cola de bacteriófago no unidas obtenidas en la etapa d).

En caso de que las endotoxinas se unan a proteínas de cola de bacteriófago independientes de calcio que se inmovilizan de nuevo sobre la superficie, el procedimiento comprende las siguientes etapas:

30

a) puesta en contacto de una muestra que contiene endotoxina con una superficie sobre la que se inmovilizan las primeras proteínas de cola de bacteriófago que son capaces de unirse a la endotoxina independientemente de la concentración de iones positivos divalentes, y a continuación dado el caso

b) eliminación de la muestra de la superficie, a continuación

35

c) incubación de las segundas proteínas de cola de bacteriófago con las endotoxinas unidas a las primeras proteínas de cola de bacteriófago, uniéndose las segundas proteínas de cola de bacteriófago a las endotoxinas solo en presencia de iones positivos divalentes, y a continuación dado el caso

d) eliminación de las segundas proteínas de cola de bacteriófago no unidas, y a continuación

e) detección de las segundas proteínas de cola de bacteriófago no unidas obtenidas en la etapa d).

40

La unión de endotoxinas se realiza mediante proteínas de cola de bacteriófago independientes de calcio que se inmovilizan sobre la superficie como se describe anteriormente, o mediante otras superficies de unión a endotoxina. La detección de las endotoxinas unidas se realiza mediante proteínas de cola de bacteriófago independientes de calcio o dependientes de calcio que se añaden después de la unión de las endotoxinas a la superficie y que están dotadas adicionalmente de un marcador mediante el que se detectan. Estas se añaden en cantidad conocida sobre la superficie con las endotoxinas, se incuban y a continuación se vuelven a retirar o lavar las proteínas de cola de bacteriófago marcadas no unidas. Mediante la retirada de las proteínas de cola de bacteriófago marcadas en el sobrenadante o flujopasante, se determina la cantidad de endotoxina que se ha unido a la superficie.

45

Además, puede detectarse endotoxina mediante un ensayo competitivo, en el que compiten endotoxinas

5 marcadas o componentes de endotoxina marcados con la endotoxina contenida en una muestra por los sitios de unión a las proteínas de fago independientes de calcio. La detección de endotoxinas se realiza igualmente en este ensayo indirectamente mediante la determinación de las endotoxinas marcadas unidas a proteínas de cola de bacteriófago independientes de calcio o mediante endotoxinas marcadas que debido a la inhibición competitiva no se han unido a las proteínas de cola de bacteriófago independientes de calcio.

La detección competitiva comprende las siguientes etapas:

- a) 10 mezclado de la muestra con endotoxinas que están acopladas con un marcador, a continuación
- b) 10 aplicación de la mezcla de la etapa a) sobre una superficie con proteínas de cola de bacteriófago inmovilizadas, siendo capaces las proteínas de cola de bacteriófago de unirse a endotoxina independientemente de la concentración de iones positivos divalentes, a continuación
- c) 10 retirada de la mezcla de la superficie, a continuación
- d) 10 lavado de la superficie, y a continuación
- e) 15 detección de la endotoxina marcada sobre la superficie y/o de la endotoxina marcada libre de las muestras combinadas después de la etapa c) y d).

15 Las endotoxinas necesarias para esta detección se obtienen mediante procedimientos conocidos para la purificación de endotoxinas (Galanos C., y col., (1969), Eur. J. Biochem. 9, 245-249; Westphal O., Jann K. (1965) en R.L. Whistler (ed.) "Methods in carbohydrate chemistry", vol. 5, 83-91) y están dotadas de marcadores. Se usan los mismos marcadores que para el marcaje de las proteínas de cola de bacteriófago según la invención como marcadores de fluorescencia, biotina, digoxigenina, anticuerpos, marcadores enzimáticos u otros marcadores, y por tanto también los correspondientes procedimientos de detección. Únicamente el acoplamiento que se realiza en endotoxinas mediante 20 restos de azúcar es distinto y se realiza correspondientemente a procedimientos conocidos para el marcaje de azúcares (Toelstra A. y col. (1997) J. Leukoc. Biol. 61, 170-178; Triantafyllou K. y col. (2000), Cytometry 41, 316-320). La cuantificación se realiza mediante una serie de concentraciones con una endotoxina estándar.

25 Las proteínas de cola de bacteriófago independientes de calcio usadas para la detección según la invención pueden ser las proteínas de cola de bacteriófago según la invención descritas anteriormente que pueden usarse igualmente para la eliminación de endotoxina.

30 Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no han de considerarse como limitantes. A menos que se indique otra cosa, se usaron procedimientos estándar de biología molecular como se describen, por ejemplo, en Sambrook y col., 1989, "Molecular cloning: A Laboratory Manual" 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Ejemplo 1: Influencia del calcio sobre la unión a endotoxina de T4p12, N-Strep-Miro2p12 und N-Strep-Aeh1p12

35 Se inmovilizaron las proteínas de fibra de cola cortas T4p12, N-Strep-Miro2p12 y N-Strep-Aeh1p12 sobre Sepharose 4 Fast Flow activada con NHS (Amersham Biosciences) correspondientemente a las instrucciones del fabricante, y a continuación se analizó la unión de endotoxina a estas Sepharose. Para ello, se rellenaron columnas, se aplicó a estas columnas una disolución de endotoxina y se recogió el flujopasante. Se determinó el contenido de endotoxina en la aplicación y la circulación mediante el ensayo LAL (ensayo LAL cinético-cromogénico, Cambrex). Las columnas tenían volúmenes de 1 ml para T4p12 y N-Strep-Miro2p12 y de 0,2 ml para N-Strep-Aeh1p12. Sobre las columnas de T4p12 y N-Strep-Miro2p12, se aplicaron respectivamente 1 ml de una disolución de BSA (1 mg/ml) y sobre la columna de N-Strep-Aeh1p12 0,2 ml de una disolución tampón. Las disoluciones aplicadas se habían enriquecido 40 todas con endotoxina de *E. coli* O55:B5 (aproximadamente 1000 UE/ml). Para observar la influencia del calcio sobre la eliminación de endotoxina y por tanto la unión de endotoxina, se llevó a cabo el ensayo con un tampón "que contiene calcio" y con un tampón "exento de calcio". El tampón "que contiene calcio" está compuesto por Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,5 y el tampón "exento de calcio" por Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5. La concentración de iones de calcio libres asciende en el tampón "que contiene calcio" a 0,1 mM y en el tampón "exento de calcio" con el quelante EDTA a menos de 1 µM (Bers D. y col., en "Methods in Cell Biology, A practical guide to the study of Ca²⁺ in living cells", Capítulo 1: A practical guide to the preparation of Ca²⁺ Buffers", Academic Press, 1/94).

50 Como se muestra en la Figura 1, pudo eliminarse de la disolución endotoxina con T4p12 solo en tampón "que contiene calcio" (99,9% de eliminación de endotoxina), mientras que en tampón "exento de calcio" no se eliminó prácticamente nada de endotoxina de la disolución (3,2% de eliminación de endotoxina). La eliminación de endotoxina mediante N-Strep-Miro2p12 Sepharose era en cambio independiente de la concentración de calcio en el tampón. Tanto con el tampón "que contiene calcio" (99,5% de eliminación de endotoxina) como con el tampón "exento de calcio" (99,9% de eliminación de endotoxina), pudo eliminarse de la disolución más de un 99% de la endotoxina. También con la N-Strep-Aeh1p12 Sepharose, no pudo encontrarse influencia del calcio sobre la eliminación de endotoxina. En el

tampón “que contiene calcio”, se eliminaron de la disolución un 88,5% de endotoxina y en el tampón “exento de calcio” un 84,3% de endotoxina.

Ejemplo 2: 1. Construcción de Miro1, Miro2 y Effe04 con marcador Strep N-terminal

Se introdujo mediante PCR en el extremo 5' del gen de Miro2 la secuencia nucleotídica del marcador Strep (patente de EE.UU. 5.506.121). Para ello, se construyó un cebador para el extremo 5' del gen de Miro2 (5'-GAA GGA ACT AGT CAT ATG GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GGC GCC GCC CAG AAT AAC TAT AAT CAC-3'; SEC ID N° 15), que incluye la secuencia nucleotídica del marcador Strep en su extremo 5' (en cursiva en la secuencia) y que posee un sitio de corte de restricción (NdeI, subrayado en la secuencia) de modo que el gen puede utilizarse en un marco de lectura correcto en el plásmido de expresión. Para el extremo 3' del gen de Miro2p12, se construyó un cebador que introdujo detrás del gen de Miro2p12-Gen un sitio de corte de restricción BamHI (subrayado en la secuencia) (5'-CG GGA TCC TCC TTA CGG TCT ATT TGT ACA-3'; SEC ID N° 16). Se llevó a cabo la PCR con 35 ciclos (15 s 94°C, 15 s 51°C, 1 min 74°C). Se escindió la preparación de PCR con NdeI y BamHI y se utilizó el fragmento deseado, después de fraccionamiento en bruto mediante gel de agarosa y elución del gel, en el sitio NdeI y BamHI del plásmido de expresión pET21a. Se comprobó la corrección de la secuencia del gen de Miro2p12 mediante secuenciación de ADN. Se transformó entonces el plásmido pNS-Miro2 en la cepa de expresión BL21 (DE3). Se realizó la clonación de Miro1p12 análogamente a la clonación anteriormente descrita de Miro2p12. Se usaron los mismos cebadores y enzimas de restricción. Se realizó la construcción y clonación de N-Strep-Effe04p12 análogamente al procedimiento descrito para N-Strep-Miro2p12 anteriormente. Para el extremo 5' del gen de N-Strep-Effe04p12, se usó un cebador de secuencia 5'-GAA GGA ACT AGT GCT AGC GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GGC GCC AGT AAC AAT ACA ATC AAC CAC G-3' (SEC ID N° 17) que contiene un sitio de corte por restricción para NdeI (subrayado en la secuencia) y la secuencia nucleotídica del marcador Strep (en cursiva). Para el extremo 3', se usó un cebador de secuencia 5'-CG GGA TCC CCT CTG TTA TAA TAC GCG-3' (SEC ID N° 18) que contiene un sitio de corte por restricción para BamHI (subrayado en la secuencia). Se escindió la preparación de PCR con NdeI y BamHI, se introdujo en el plásmido de expresión pET21a y se transformó en la cepa de expresión BL21(DE3).

Ejemplo 3. Purificación de la proteína N-Strep-Miro2

Se cultivó *E. coli* cepa BL21(DE3) con el plásmido pNS-Miro2 en 21 cultivos agitados (medio LB con ampicilina, 100 µg/ml) hasta una DO₆₀₀ de 0,5-0,7 a 37°C y se indujo la expresión de la proteína N-Strep-Miro2 mediante la adición de IPTG 1 mM (β-tiogalactopiranosido de isopropilo). Después de incubar a 37°C durante 4 h, se recogieron las células. Se suspendieron las células recogidas de 10 l de cultivo en 50 ml de fosfato de sodio 10 mM, pH 8,0, MgCl₂ 2 mM, NaCl 150 mM, se trituraron mediante tres tratamientos con prensa francesa (138 MPa) y a continuación se centrifugó durante 30 min a 15.000 rpm (SS34). Después de dos lavados con el mismo tampón, se extrajo la proteína N-Strep-Miro2 del sedimento mediante agitación durante 30 min en Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, urea 1 M, se centrifugó la preparación durante 30 min a 15.000 rpm (SS34) y se almacenó la N-Strep-Miro2 liberada en el sobrenadante a 4°C. Se repitió la extracción dos veces. Se aplicaron los sobrenadantes combinados sobre una columna de afinidad de estreptactina (15 ml) equilibrada con tampón “W” (Tris-HCl 100 mM, pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM) (IBA GmbH, Göttingen). Después de lavar con 5 volúmenes de columna de tampón “W”, se eluyó con 3 volúmenes de tampón “W” con destiobiotina 2,5 mM en tampón “W”. Después de varias diálisis frente a tampón “W” y concentración, se establecieron la concentración y pureza de N-Strep-Miro2 mediante PAGE-SDS y espectroscopia UV. A partir de 10 l de cultivo, se purificaron aprox. 100 mg de N-Strep-Miro2.

Ejemplo 4: Detección de la unión de variantes de endotoxina de distinta longitud a N-Strep-Miro2p12 mediante espectroscopia de resonancia de plasmón de superficie

Este experimento sirve para obtener información sobre la estructura conocida de Miro2p12 en la región central (núcleo) de la endotoxina. Se acopló N-Strep-Miro2p12 covalentemente a la superficie de una celda de un chip CM-5 de la compañía Biacore. Para ello, se activó la superficie en primer lugar con EDC/NHS, a continuación se unió N-Strep-Miro2p12 mediante restos amino primario y después se saturaron los grupos de acoplamiento no consumidos con etanolamina (véase el manual Biacore). Se aisló la endotoxina de cepas de *E. coli* que poseen azúcares centrales de distinta longitud (véase la Figura 9, bib.: Boman H.G., Jonsson S., Monner D., Normark S., Bloom G.D., “Cell-Surface alterations, in *Escherichia coli* K-12 with chromosomal mutations changing ampicillin resistance”. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1971; 182: 342-357; Prehm P. Stirn S., Jann B., Jann K., Bomann H.G., Cell-wall lipopolysaccharides of ampicillin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12”. *Eur. J. Biochem.* 1976; 66(2): 369-377; Eriksson-Grennberg K.R., Nordstrom K., Englund P., “Resistance of *Escherichia coli* to penicillins. IX. Genetics and physiology of class II ampicillin-resistant mutants that are galactose negative or sensitive to bacteriophage C21, or both”. *J. Bacteriol.* 1971; 108(3): 1210-1223; Boman H.G., Monner D.A., “Characterization of lipopolysaccharides from *Escherichia coli* K-12 mutants”. *J. Bacteriol.* 1975; 121(2): 355-464). Para ello, se cultivaron las bacterias durante una noche en medio LB a 37°C, se recogieron mediante centrifugación, se lavaron con PBS y a continuación se suspendió el sedimento en Tris 100 mM, EDTA 50 mM, pH 8, y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Se disolvió en este tampón una parte de la endotoxina y puede separarse de las células. Se precipitó la endotoxina soluble a continuación con 4 volúmenes de acetona y se

5 secó. Para la medida, se suspendió la endotoxina en tampón de desarrollo (tampón de desarrollo: Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, 0,005% de Tween 20, pH 7,5) y se aclaró por la superficie cargada con N-Strep-Miro2p12. Como control sirvió una segunda celda no cargada del chip Biacore. Se añadió la disolución de endotoxina durante la medida a ambas celdas y se calculó la señal resultante de la diferencia de señal de la celda 1 y la celda 2. Se interpretó el aumento de
 10 señal en la curva resultante como la unión de endotoxina a N-Strep-Miro2p12. Como se muestra en la Tabla 1, pudo encontrarse también unión con endotoxina de *E. coli* cepa D21f2. Esta cepa contiene solo Kdo-azúcar central y por tanto la forma más corta de endotoxina, que es absolutamente necesaria para la supervivencia de las células. Con T4p12, no pudo encontrarse unión de estas bacterias. A este respecto, la adición de R significa que estas bacterias pertenecen al denominado tipo "rugoso", cuya endotoxina no posee antígeno O y las letras minúsculas caracterizan la longitud decreciente de a a e del azúcar central de la endotoxina. Se esquematizan los correspondientes azúcares centrales en la Figura 9.

Tabla 1		
Cepa bacteriana	Unión a T4p12	Unión a N-Strep-Miro2p12
<i>E. coli</i> D21, Ra	+	+
<i>E. coli</i> D21e7, Rb	+	n.d.
<i>E. coli</i> D21e8, Rc	+	n.d.
<i>E. coli</i> D21f1, Rd	+	+
<i>E. coli</i> D21f2, Re	-	+
n.d.: no determinado		

Ejemplo 5: Eliminación de endotoxina mediante la proteína de cola de bacteriófago Miro2

15 Se centrifugaron 5 ml de Sepharose 4 Fast Flow activada con NHS (Amersham Biosciences), se retiró el isopropanol del sobrenadante y se mezcló con 870 ml de tampón citrato (citrato 25 mM, EDTA 2 mM, pH 7,0). A continuación, se añadieron 217 ml de proteína de cola de bacteriófago Miro2 (0,46 mg/ml en formiato 50 mM, pH 3,5) y se agitó para acoplamiento de la proteína de cola de bacteriófago con la Sepharose durante 2 horas a 37°C. Se retiró el sobrenadante, se lavó la Sepharose 3 veces con fosfato de sodio 10 mM, pH 10, y se dializaron alícuotas de 1 ml del sobrenadante y fracciones de lavado frente a fosfato de sodio 10 mM, pH 10. Se determinó la concentración de la
 20 proteína de cola de bacteriófago en estas alícuotas mediante medida de la absorción a 280 nm y se calculó la cantidad de proteína de cola de bacteriófago que se había unido a la Sepharose. Se unieron 12,2 mg de proteína de cola de bacteriófago Miro2 por ml de Sepharose.

25 Se rellenaron columnas con un volumen de 1,5 ml. Además, se rellenaron las columnas con el mismo volumen de material de T4p12 y polimixina B-Sepharose. Se equilibró respectivamente una de estas columnas con el tampón de desarrollo (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5) y a continuación se analizó la eliminación de endotoxina de una disolución de BSA (1,2 mg/ml), que se había enriquecido con lipopolisacárido de *E. coli* O55:B5 (aproximadamente 1000 UE/ml). Para ello, se reunió antes de la aplicación de la muestra de cada columna (Miro2p12, T4p12, polimixina B) en primer lugar 1 ml de tampón de desarrollo, a continuación se aplicaron respectivamente 1 ml de disolución de BSA y se lavó con tampón de desarrollo. Se fraccionó la circulación y se analizaron en las fracciones proteína (BSA) y endotoxina. Se representan los resultados en la Figura 2. Con T4p12, que requiere calcio libre para la
 30 unión de endotoxina, no pudo eliminarse endotoxina de la disolución. Con polimixina B, se redujo el contenido de endotoxina un 96%, pero se recuperó solo un 67% de la BSA aplicada. Con Miro2p12, pudo eliminarse más de un 99% de endotoxina y la tasa de recuperación de BSA ascendió a un 92%, y era por tanto claramente mayor que para polimixina B.

35 Se llevaron a cabo ensayos similares con PBS (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4) y citrato (citrato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0) como tampón de desarrollo. También en estos tampones se reduce fuertemente la eliminación de endotoxina con T4p12, ya que el calcio precipita (tampón fosfato) o se compleja (citrato). Se representan los resultados en las Figuras 3 y 4 y muestran que T4p12, como se esperaba, proporciona una baja (PBS) o nula (citrato) eliminación de endotoxina. Con polimixina B, pudo eliminarse respectivamente más de un
 40 96% de la endotoxina, pero la recuperación de BSA se encontraba solo a un 60-80%. Con Miro2p12, se eliminó más de un 99% de endotoxina y la recuperación de BSA era mayor de un 90%. Además, se analizó la idoneidad de N-Strep-Miro2p12 para la eliminación de endotoxina de suero. Para ello, se enriqueció suero humano con lipopolisacárido de *E. coli* O55:B5 y se aplicó sobre columnas de N-Strep-Miro2p12 Sepharose (véase la Figura 7). Pudo eliminarse del suero humano aproximadamente un 90% de la endotoxina aplicada.

Ejemplo 6: Detección de LPS mediante la unión de T4p12 a LPS inmovilizado.

Se inmovilizó la proteína de bacteriófago Miro2p12 sobre NHS-Sepharose (Amersham Pharmacia) (3,4 mg de proteína por ml de Sepharose) y se rellenaron con ella 4 columnas cada vez con un volumen de 0,5 ml. Se lavaron las columnas cada vez con 3 ml de tampón fosfato de sodio (fosfato de sodio 20 mM, pH 12,0) y cada vez con 3 ml de tampón de regeneración (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5). A continuación se aplicó sobre dos de estas columnas cada vez 1 ml de LPS de *E. coli* 055:B5 (0,1 mg/ml en tampón Hepes, 10⁶ UE/ml). Se aclararon las dos otras columnas cada vez con 1 ml de tampón de regeneración. Después, se lavaron todas las columnas cada vez con 3 ml de tampón de equilibrado (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,5) y a continuación se aplicó otra vez 1 ml de este tampón y se recogió como fracción 1. A continuación, se aplicaron 0,5 ml de una disolución de la proteína de cola de bacteriófago T4p12 (0,844 mg/ml en Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,1 mM) sobre las columnas y se lavaron con 2,5 ml de tampón de equilibrado y 2 ml de tampón de regeneración. Se recogió la circulación en fracciones de tres veces 1 ml y una vez 2 ml y se determinó la concentración de la proteína de cola de bacteriófago T4p12 en estas fracciones mediante medida de la absorción a 280 nm (Figura 5). La proteína de cola de bacteriófago T4p12 se unía en gran medida a las columnas que se habían tratado previamente con LPS, y pudo liberarse de estas columnas mediante la adición de tampón de regeneración. En contraposición, circuló sin retardo por las columnas que no se habían tratado con LPS.

Ejemplo 7: 1. Construcción de Aeh1 con marcador Strep N-terminal (N-Strep-Aeh1p12):

Mediante PCR, se introdujo en el extremo 5' del gen de Aeh1p12 (nº de ref. NCBI AAQ17871) la secuencia nucleotídica del marcador Strep (patente de EE.UU. 5.506.121). Para ello, se construyó un cebador para el extremo 5' del gen de Aeh1 (5'-GAA GGA ACT AGT CAT ATG GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GGC GCC AGA ACA AAT AAT ATC ACA CAG 3'; SEC ID Nº 19), que incluía la secuencia nucleotídica del marcador Strep en su extremo 5' (en cursiva en la secuencia) y poseía un sitio de corte por restricción (NdeI, subrayado en la secuencia), de modo que el gen puede utilizarse en el marco de lectura correcto del plásmido de expresión. Para el extremo 3' del gen de Miro2p12, se construyó un cebador que introdujo detrás del gen de Aeh1p12 un sitio de corte por restricción BamHI (subrayado en la secuencia) (5'-GAA GGA ACT AGT CAT ATG AGA ACA AAT AAT ATC ACA CAG 3'; SEC ID Nº 20). Se llevó a cabo la PCR con 35 ciclos (15 s 94°C, 15 s, 51°C, 1 min 74°C). Se escindió la preparación de PCR con NdeI y BamHI y se utilizó el fragmento deseado, después de fraccionamiento bruto sobre gel de agarosa y elución del gel, en el sitio de NdeI y BamHI del plásmido de expresión pE121a. Se comprobó la corrección de la secuencia del gen de Aeh1p12 mediante la secuenciación de ADN. Se transformó entonces el plásmido pNS-Aeh1 en la cepa de expresión HMS174 (DE 3).

2. Purificación de la proteína N-Strep-Aeh1:

Se cultivó *E. coli* cepa HMS174 (DE 3) con el plásmido pNS-Aeh1p12 en 21 cultivos agitados (medio LB con ampicilina 100 µg/ml, kanamicina 25 µg/ml, rifampicina 10 µg/ml) hasta una DO₆₀₀ de 0,5-0,7 a 37°C y se indujo la expresión de la proteína N-Strep-Aeh1p12 mediante la adición de IPTG 1 mM (β-tiogalactopiranosido de isopropilo). Después de incubar a 37°C durante 4 h, se recogieron las células. Se suspendieron las células recogidas de 10 l de cultivo en 50 ml de fosfato de sodio 10 mM, pH 8,0, MgCl₂ 2 mM, NaCl 150 mM, se trituraron en un Microfluidizer (Microfluidics, M110L) y a continuación se centrifugaron durante 30 min a 15.000 rpm (SS34). Después de un doble lavado con el mismo tampón, se extrajo la proteína N-Strep-Aeh1p12 del sedimento mediante agitación durante 30 min en fosfato de sodio 50 mM pH 12 y se centrifugó la preparación durante 30 min a 15.000 rpm (SS34). Se repitió una vez la extracción y se dializaron los sobrenadantes combinados con N-Strep-Aeh1p12 liberada frente a Tris 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0. Se volvió a purificar la proteína a continuación mediante una columna de afinidad de estreptactina (5 ml, IBA GmbH, Göttingen). Para ello, se equilibró la columna de afinidad de estreptactina con tampón "W" (Tris-HCl 100 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM) y se aplicó Aeh1p12. Después de lavar con 5 volúmenes de columna de tampón "W", se eluyó con 3 volúmenes de tampón "W" con destiobiotina 2,5 mM en tampón "W". Después de varias diálisis frente a borato 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8, se establecieron la concentración y pureza de N-Strep-Aeh1p12 mediante PAGE-SDS y espectroscopia UV. A partir de 4 l de cultivo, se purificaron así aproximadamente 20 mg de N-Strep-Aeh1p12.

3. Acoplamiento de Aeh1p12 con Sepharose activada con NHS.

Se mezclaron 22 ml de N-Strep-Aeh1p12 (0,9 mg/ml en borato 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8) con 200 µl de Sepharose activada con NHS y se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente sobre un rodillo. Después, se centrifugó la Sepharose (15 min, 3000 g) y se lavó 3 veces respectivamente con 20 ml de Tris 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8. A continuación, se dializaron alícuotas de 0,5 ml de las fracciones de lavado frente a Tris 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8 para eliminar la NHS separada, y se determinó en estas alícuotas la concentración de N-Strep-Aeh1p12 mediante medida de la absorción a 280 nm. A partir de la cantidad de proteína inicial y las cantidades de proteína en las fracciones de lavado, se calculó la densidad de ocupación. Pudieron acoplarse 2,5 mg de N-Strep-Aeh1p12 por 1 ml de Sepharose.

4. Eliminación de endotoxina con Aeh1p12-Sepharose

Se rellenaron una columna con Aeh1p12-Sepharose y una columna de control, ambas con un volumen de 200 µl respectivamente. La columna de control estaba compuesta por NHS-Sepharose que se había saturado con etanolamina. Se lavaron ambas columnas a continuación con 2 ml de desoxicolato de sodio al 0,5%, 15 ml de agua exenta de pirógenos y 2 ml de tampón de desarrollo. Se aplicaron respectivamente como muestra 200 µl de lipopolisacárido de *E. coli* O55:B5, que se había disuelto en el tampón de desarrollo respectivo. Después de aplicar la muestra, se mezcló esta con la Sepharose y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, antes de eluir la disolución de la columna. Se lavaron en primer lugar las columnas con 0,6 ml y después otras dos veces con 1 ml de tampón de desarrollo. Se fraccionó la circulación y se determinaron las concentraciones de endotoxina en la aplicación y las fracciones mediante ensayo LAL (ensayo LAL cinético-cromográfico, Cambrex). Se llevó a cabo este ensayo con dos tampones de recorrido distintos, para analizar la influencia del calcio sobre la eliminación de endotoxina. Los tampones recorrido estaban compuestos como sigue: tampón 1: Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,5. Tampón 2: Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5. Como se muestra en la Figura 8, se elimina claramente más endotoxina mediante la columna de Aeh1p12-Sepharose (88% y 84%) que mediante la columna de control no cargada (25% y 39%). El calcio no desempeña ningún papel en la unión de endotoxina a Ach1p12, ya que la eliminación de endotoxina en presencia de calcio (88%) era similar que en un tampón con un quelante de calcio (84%).

Ejemplo 8: 1. Purificación de N-Strep-Effe04p12

Se cultivó *E. coli* cepa HMS174 (DE 3) con el plásmido pNS-Effe04p12 en 21 cultivos agitados (medio LB con ampicilina 100 µg/ml, rifampicina 10 µg/ml) hasta una DO₆₀₀ de 0,5-0,7 a 37°C y se indujo la expresión de proteína N-Strep-Effe04p12 mediante la adición de IPTG 1 mM (β-tiogalactopiranosido de isopropilo). Después de incubar a 37°C durante 4 h, se recogieron las células. Se suspendieron las células recogidas de 6 l de cultivo en 50 ml de Tris 100 mM, EDTA 25 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0, se trituraron en un Microfluidizer (Microfluidics, M110L) y a continuación se centrifugaron durante 30 min a 15.000 rpm (SS34). A continuación, se extrajo la proteína N-Strep-Effe04p12 del sedimento mediante agitación durante 2 h a 37°C en Tris 100 mM, clorhidrato de guanidinio 1,5 mM, pH 8,0, y se centrifugó la preparación durante 30 min a 13.000 rpm (SS34). Se repitió una vez la extracción. Se dializaron los sobrenadantes combinados con la N-Strep-Effe04p12 liberada frente a Tris 100 mM, pH 8,0. Se volvió a purificar la proteína a continuación mediante una columna de afinidad de estreptactina (5 ml, IBA GmbH, Göttingen). Para ello, se equilibró la columna de afinidad con tampón "W" (Tris-HCl 100 mM, pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM) y se aplicó N-Strep-Effe04p12. Después de lavar con 5 volúmenes de columna de tampón "W", se eluyó con 3 volúmenes de tampón "W" con destiotiotina 2,5 mM en tampón "W". Después de varias diálisis frente a borato 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8, se establecieron la concentración y pureza de N-Strep-Effe04p12 mediante PAGE-SDS y espectroscopia UV. A partir de 6 l de cultivo, se purificaron así aprox. 2 mg de N-Strep-Effe04p12.

2. Acoplamiento de N-Strep-Effe04p12 con Sepharose activada con NHS

Se mezclaron 4 ml de N-Strep-Effe04p12 (0,2 mg/ml en borato 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8) con 100 µl de Sepharose activada con NHS y se incubó durante 3 h a temperatura ambiente sobre un rodillo. Después, se centrifugó la Sepharose (15 min, 3000 g) y se lavó 3 veces respectivamente con 20 ml de Tris 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8. A continuación, se dializaron 0,5 ml de alícuotas de las fracciones de lavado frente a Tris 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8. A continuación, se dializaron alícuotas de 0,5 ml de las fracciones de lavado frente a Tris 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8, para eliminar la NHS separada, y se determinó en estas alícuotas la concentración de N-Strep-Effe 04p12 mediante medida de la absorción a 280 nm. A partir de la cantidad de proteína inicial y las cantidades de proteína en las fracciones de lavado, se calculó la densidad de ocupación. Pudieron acoplarse 3,6 mg de N-Strep-Effe04p12 por 1 ml de Sepharose.

3. Eliminación de endotoxina con N-Strep-Effe04p12-Sepharose

Se añadieron 100 µl de N-Strep-Effe04p12-Sepharose a una columna Mini-Spin (Handee Mini-Spin, Pierce) y se lavó en primer lugar 3 veces con 1 ml de tampón de desarrollo exento de endotoxina (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM). Se separó a este respecto la disolución de la Sepharose mediante centrifugación corta (400 g, 5s). A continuación, se incubaron 100 µl de disolución de endotoxina (lipopolisacárido de *E. coli* O55:B5 en tampón de desarrollo) durante 30 min con la Sepharose antes de centrifugar la disolución y lavar la Sepharose otras dos veces con 200 µl de tampón de desarrollo. Se determinaron las cantidades de endotoxina en la aplicación (F0) así como las fracciones después de la Sepharose mediante ensayo LAL (ensayo LAL cinético-cromogénico, Cambrex). Como se observa en la Figura 9, se elimina de la disolución la mayor parte de la endotoxina aplicada (eliminación de endotoxina: 92%). Ya que en el tampón de desarrollo estaba contenido EDTA, el calcio no desempeña ningún papel para la unión de endotoxina a N-Strep-Effe04p12.

Ejemplo 9: Detección de endotoxina mediante la unión de Miro2p12 a LPS inmovilizado

Se inmovilizó proteína de bacteriófago Miro2p12 sobre NHS-Sepharose (Amersham Pharmacia) (5 mg de

5 proteína por 1 ml de Sepharose) y se rellenó con la misma 4 columnas cada vez con 1 ml de volumen. Dos de ellas se
 cargaron con LPS de *E. coli* O55:B5 (10^6 UE en 1 ml de tampón PLS, fosfato de sodio 10 mM, NaCl 70 mM, pH 7,4) (+
 ET, barras negras, Fig. 12) y dos sirvieron como controles (- ET, barras blancas, Fig. 12). Como tampón de desarrollo
 sirvió fosfato de sodio 10 mM, NaCl 80 mM, pH 7,4. Se aplicó a todas las columnas Miro2p12 (cada vez 600 μ l de una
 10 disolución con 0,1 mg/ml de proteína). Se determinó la cantidad de Miro2p12 aplicada o eluída mediante absorción a
 280 nm. Se representó la cantidad de proteína de cola de bacteriófago Miro2p12 frente a las fracciones del recorrido
 cromatográfico como se reproduce en la Figura 12. La fracción 3 (F3) muestra la circulación de Miro2p12 después de la
 aplicación (F0), o sea toda la proteína de cola de bacteriófago que no se había retenido por la columna, la fracción 4
 (F4) es una fracción de lavado. Después de lavar, se añadió tampón de regeneración RB (fosfato de sodio 10 mM, NaCl
 500 mM, pH 7,4) (véase la marca de la flecha) que vuelve a liberar de la columna la Miro2p12 unida a endotoxina. A
 continuación, se reunieron las fracciones 5 y 6. La fracción F3 tiene un volumen de 0,6 ml, todas las demás fracciones
 tienen un volumen de 1 ml. Como control, se representa la aplicación en la columna (F0) con la cantidad total de
 Miro2p12. Se observa que, en las columnas sobre las que se ha inmovilizado antes endotoxina, se retenía la Miro2p12,
 15 mientras que en las columnas de control sin endotoxina se unía inespecíficamente solo una pequeña cantidad de
 Miro2p12.

Ejemplo 10: Detección de endotoxina adsorbida en una placa de microvaloración PolySorp mediante la unión de Miro2p12 marcada con biotina.

20 Preparación de Miro2p12 marcada con biotina. Se mezclan 2 ml de una disolución de Miro2p12 a una
 concentración de 2 mg/ml en un tampón con borato de sodio 50 mM, cloruro de guanidinio 1,75 M, pH 8,0 con 250 μ l de
 una disolución de Sulfo-NHS-LCLC-biotina en agua 10 mM (Pierce) y se incuban durante 30 min a temperatura
 ambiente. A continuación, se dializa la disolución de reacción frente a tampón con borato de sodio 50 mM, cloruro de
 guanidinio 1,75 M, pH 8,0. La Miro2p12-bio así obtenida se utilizó para la siguiente detección de endotoxina que se
 reproduce en la Figura 13. Se inmovilizó LPS de *E. coli* O55:B5 (3 μ g/ml) en placas PolySorp (Nunc) mediante adsorción
 25 (18 h a temperatura ambiente en tampón PBS, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4).
 A continuación, se bloquearon las placas de microvaloración con caseína (0,05% en PBS, 1,5 h a TA) y se lavó una vez
 con tampón PBS. No se incubaron las placas de control con endotoxina, sino que se solo se bloquearon con caseína. Se
 añadieron respectivamente 200 μ l de Miro2p12 marcada con biotina (Miro2p12-bio) en Tris 50 mM, pH 8, 0,05% de
 caseína, 0,05% de Tween 20 a concentración creciente (barras blancas: placas sin ET, barras negras: placas con ET,
 30 concentraciones de proteína como se han dado). Después de 5 h de incubación a temperatura ambiente, se lavó 3
 veces cada vez con 200 μ l de PBST (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, 0,05% de Tween,
 pH 7,4). Se realizó la detección de Miro2p12 marcada con biotina unida a endotoxina mediante un ELISA específico de
 biotina. Se diluye un conjugado de estreptavidina con fosfatasa alcalina (Amersham Biosciences) 1:5000 en PBST y se
 incuban cada vez 200 μ l del mismo durante 1,5 h a temperatura ambiente con Miro2p12-bio unida. Después, se lava tres
 35 veces cada vez con 200 μ l de Tris-T (50 mM, 0,05% de Tween, pH 8,0). Se realiza la detección colorimétrica mediante
 medida de absorción a 405 nm después de añadir pNPP (fosfato de para-nitrofenilo) a una concentración de 0,8 mg/ml
 como sustrato cromogénico. La Miro2p12 marcada con biotina se une de forma dependiente de la concentración a las
 placas de microvaloración que se habían recubierto anteriormente con endotoxina.

Ejemplo 11: Detección de endotoxina marcada con FITC unida a Miro2p12 inmovilizada

40 Se adsorbió Miro2p12 (cada vez 200 μ l con 5 μ g/ml de proteína) en una placa MaxiSorp (Nunc) (16 h a TA en
 PBS, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4). A continuación, se bloquearon las placas
 de microvaloración con caseína (0,05% de caseína en PBS, 1,5 h a TA, cada vez 200 μ l por pocillo) y se lavaron una
 vez con tampón PBS. Las placas de control no se incubaron con Miro2p12, sino que solo se bloquearon con caseína. Se
 añadieron respectivamente 100 μ l de LPS marcado con FITC de *E. coli* O55:B5 (Sigma) en PBS a concentración
 45 creciente (barras blancas: placas sin Miro2p12, barras negras: placas con Miro2p12). Se lavó tres veces cada vez con
 200 μ l de PBST (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, 0,05% de Tween, pH 7,4). Se
 representa el ensayo en la Figura 14. La detección de endotoxina unida a proteína de cola de bacteriófago se realiza en
 un ELISA específico de FITC. Se diluye anticuerpo anti-FITC (0,5 μ g/ml; Zymed) 1:500 en PBST y a continuación se
 incuban cada vez 200 μ l durante 1 h a temperatura ambiente con la endotoxina marcada con FITC unida. A
 50 continuación, se lava 3 veces cada vez con 200 μ l de PBST. Se usa como anticuerpo secundario un conjugado de IgG
 anti-conejo-fosfatasa alcalina (1 μ g/ml, Pierce). Se utiliza diluido 1:5000 y se incuba durante 1,5 h a temperatura
 ambiente. A continuación, se lava 3 veces cada vez con 200 μ l de PBST. Se realizó la cuantificación mediante medida
 de la fluorescencia del producto de reacción de un sustrato fluorescente de fosfatasa alcalina (fosfato de
 metilumbeliferilo; Sigma) con 0,1 mg/ml de fosfato de metilumbeliferilo en Tris 50 mM, pH 8,0. La endotoxina marcada
 con fluorescencia se une de forma dependiente de la concentración a las placas de microvaloración que se habían
 55 recubierto previamente con Miro2p12.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> PROFOS AG
- <120> Procedimiento para la detección y para la eliminación de endotoxina
- <130> PRO-017 PCT
- 5 <140> desconocido
- <141> 23-01-2006
- <150> DE 10 2005 002 969.8
- <151> 21-01-2005
- <160> 20
- 10 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 54
- <212> ADN
- <213> bacteriófago Mirol
- 15 <400> 1

acgcgcaaag ctgtgcgacg gatcctatca ttctttacc ttaattatgt agtt 54

- <210> 2
- <211> 457
- <212> PRT
- 20 <213> bacteriófago Mirol
- <400> 2

```

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

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

Thr Gln Trp Pro Val Ala Ile Lys Asp Val Gln Ser Ala Leu Glu Leu
          35           40           45

Ile Gly Ser Trp Ala Arg Thr Asp Thr Gly Leu Pro Val Ala Ser Pro
 50           55           60

Thr Val Ala Gly Val Ile Arg Thr Ala Thr Gln Ala Glu Val Asp Ala
65           70           75           80

Gly Thr Ile Gly Asn Ala Ala Val Thr Pro Ala Thr Leu Lys Ser Thr
          85           90           95

Val Thr Arg Pro Glu Ala Thr Thr Ala Val Leu Gly Leu Thr Arg Tyr
          100          105          110

Ala Thr Asn Thr Glu Ala Ala Ala Leu Thr Ala Gly Asn Arg Thr Ile
          115          120          125

Thr Ala Ala Ala Leu Gly His Val Phe Lys Thr Val Lys Ala Gln Glu
130          135          140
    
```

Asn Val Asp Gly Thr Val Arg Leu Thr Thr Ala Ala Gln Ala Gln Ala
 145 150 155 160
 Gly Thr Asp Glu Thr Ala Val Thr Pro Lys Arg Val Val Glu Met Ile
 165 170 175
 Gly Lys Phe Ser Val Ser Pro Pro Ser Tyr Thr Ser Ala Thr Glu Ser
 180 185 190
 Asn Leu Gly Leu Val Arg Val Ala Thr Gln Ala Gln Val Ala Ala Gly
 195 200 205
 Ala Val His Asp Gly Tyr Ala Val Thr Pro Lys Thr Phe Met Ala Ser
 210 215 220
 Lys Ala Ser Asp Ser Val Phe Gly Ile Val Lys Phe Ala Lys Asp Ser
 225 230 235 240
 Asp Val Ala Ser Ala Thr Ser Asn Asn Leu Ala Val Thr Pro Lys Ser
 245 250 255
 Leu Gln Ala Leu Lys Ser Thr Lys Asp Lys Tyr Gly Leu Thr Arg Leu
 260 265 270
 Ser Gly Ser Pro Thr Thr Asp Ala Ser Leu Ala Ala Ala Thr Asp
 275 280 285
 Ala Val Phe Lys Thr Arg Lys Ile Asn Gly Lys Thr Leu Asp Asn Asp
 290 295 300
 Ile Thr Ile Thr Asn Asn Asp Ile Asn Cys Tyr Thr Arg Gln Glu Ser
 305 310 315 320
 Asp Gly Arg Tyr Met Pro Ala Gly Thr Arg Val Gly Asn Val Thr Trp
 325 330 335
 Val Glu Gly Gln Ser Trp Ile Ser Arg Gly Ala Thr Phe Thr Cys Asn
 340 345 350
 Ala Pro Trp Glu Ala Ser Ser Arg Leu Ala Leu Asn Val Asn Val Lys
 355 360 365
 Phe Glu Arg Asn Asn Asp Gly Tyr Asp Asn Arg Ile Phe Arg Phe Val
 370 375 380
 Val Ile Val Asn Gly Ser Gln Trp Gly Gly Glu Leu Thr Leu Asn Ile
 385 390 395 400
 Glu Asn Thr Lys Gly Gly Arg Asn Gly His Ser Trp Arg Phe Glu Ala
 405 410 415
 Tyr Ala Ser Ser Asn Phe Phe Phe Asn Asn Ile Pro Pro Asn Ala Thr
 420 425 430
 Val Gln Ile Arg Pro Thr Glu Asp Ser Arg Ile Ile Phe Tyr Asp Cys
 435 440 445
 Met Leu Thr Phe Cys Thr Asn Arg Pro
 450 455

<210> 3

<211> 1347

<212> ADN
 <213> bacteriófago Miro2
 <400> 3

```

atggcccaga ataactataa tcactacagt gatttggcca aatatacgat atttgaccca      60
acaatacac aatggcctgt tgctataaaa gacgtccaat cagcgtaga gctgattggt      120
agctgggcaa gaactgatac cggattacct gtageatctc ctacagtagc cggtgtaatt      180
cgcacagcaa cacaggctga agttgatgct ggaactattg gtaatgctgc ggtaactcct      240
gctacattaa aatccacagt taccgctcct gaagcaacta cagcagttct tggcttaaca      300
cggtatgcta ctaatactga agccgcagca ttaaccgcag gaaatagaac tattaccgcg      360
gcggtcctcg gtcatgtgtt taaaactgtg aaagcccaag aaaacgtaga tggaaactgtt      420
aggttaacta ctgcggctca agcacaagca ggaactgacg aaactaccgc agtaactcct      480
aagcgtgttg tagaaatgat tggaaagtcc agtgtcagtc ctcttagtta tacctctgcg      540
acagaaagca acttgggatt agttcgtgtc gcaacccaag cccaggtagc agcaggtgct      600
gttcacgatg gatacgcagt aactcctaaa accttcattg catcaaaagc gtctgacagc      660
gtatttggta tagtaaaatt tgctaaagac tcagatgtgg cttcagctac ttctaacaat      720
ttggctgtta ctccaaaag tcttcaagcg ctaaaatcca ccaaggataa atatggatta      780
accagattat caggttctcc aactactgat gcttcattgg cagcggctgc aacagatgca      840
gtctttaaaa cccgtagaat aaacggaaaa actcttgata atgacataac aattactaat      900
aatgatatta attgttatac aagacaagaa tctgacgggc gttacatgcc agctggaacc      960
agagtaggta atgttacttg gggtgaagga caatcttggg ttagtcgagg tgcaacgttt     1020
acatgtaatg caccatggga agcttctagt agattagctc taaacgtaa tgtaaaattt     1080
gagcgaatac acgacggata tgacaatcgt attttcagat ttgttgtaat agttaacggg     1140
tcccataagg gaggtgaact tactctaac atcgaataa ctaaaggcgg acgaaatggg     1200
cattcatgga gatttgaagc ttacgcatct agcaactttt tcttcaataa cattcctcca     1260
aatgccactg ttcaataaag accaacagaa gacagtcgta ttatatttta tgactgcatg     1320
cttacattct gtacaaatag accgtaa                                     1347
    
```

5 <210> 4
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> bacteriófago Miro2
 <400> 4

```

Met Ala Gln Asn Asn Tyr Asn His Tyr Ser Asp Leu Ala Lys Tyr Thr
 1                               5                               10                               15

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

Gln Ser Ala Leu Glu Leu Ile Gly Ser Trp Ala Arg Thr Asp Thr Gly
                35                               40                               45

Leu Pro Val Ala Ser Pro Thr Val Ala Gly Val Ile Arg Thr Ala Thr
 50                               55                               60

Gln Ala Glu Val Asp Ala Gly Thr Ile Gly Asn Ala Ala Val Thr Pro
 65                               70                               75                               80

Ala Thr Leu Lys Ser Thr Val Thr Arg Pro Glu Ala Thr Thr Ala Val
                85                               90                               95

Leu Gly Leu Thr Arg Tyr Ala Thr Asn Thr Glu Ala Ala Ala Leu Thr
                100                               105                               110

Ala Gly Asn Arg Thr Ile Thr Ala Ala Ala Leu Gly His Val Phe Lys
 115                               120                               125
    
```

Thr Val Lys Ala Gln Glu Asn Val Asp Gly Thr Val Arg Leu Thr Thr
 130 135 140
 Ala Ala Gln Ala Gln Ala Gly Thr Asp Glu Thr Thr Ala Val Thr Pro
 145 150 155 160
 Lys Arg Val Val Glu Met Ile Gly Lys Phe Ser Val Ser Pro Pro Ser
 165 170 175
 Tyr Thr Ser Ala Thr Glu Ser Asn Leu Gly Leu Val Arg Val Ala Thr
 180 185 190
 Gln Ala Gln Val Ala Ala Gly Ala Val His Asp Gly Tyr Ala Val Thr
 195 200 205
 Pro Lys Thr Phe Met Ala Ser Lys Ala Ser Asp Ser Val Phe Gly Ile
 210 215 220
 Val Lys Phe Ala Lys Asp Ser Asp Val Ala Ser Ala Thr Ser Asn Asn
 225 230 235 240
 Leu Ala Val Thr Pro Lys Ser Leu Gln Ala Leu Lys Ser Thr Lys Asp
 245 250 255
 Lys Tyr Gly Leu Thr Arg Leu Ser Gly Ser Pro Thr Thr Asp Ala Ser
 260 265 270
 Leu Ala Ala Ala Ala Thr Asp Ala Val Phe Lys Thr Arg Arg Ile Asn
 275 280 285
 Gly Lys Thr Leu Asp Asn Asp Ile Thr Ile Thr Asn Asn Asp Ile Asn
 290 295 300
 Cys Tyr Thr Arg Gln Glu Ser Asp Gly Arg Tyr Met Pro Ala Gly Thr
 305 310 315 320
 Arg Val Gly Asn Val Thr Trp Val Glu Gly Gln Ser Trp Ile Ser Arg
 325 330 335
 Gly Ala Thr Phe Thr Cys Asn Ala Pro Trp Glu Ala Ser Ser Arg Leu
 340 345 350
 Ala Leu Asn Val Asn Val Lys Phe Glu Arg Asn Asn Asp Gly Tyr Asp
 355 360 365
 Asn Arg Ile Phe Arg Phe Val Val Ile Val Asn Gly Ser Gln Trp Gly
 370 375 380
 Gly Glu Leu Thr Leu Asn Ile Glu Asn Thr Lys Gly Gly Arg Asn Gly
 385 390 395 400
 His Ser Trp Arg Phe Glu Ala Tyr Ala Ser Ser Asn Phe Phe Phe Asn
 405 410 415
 Asn Ile Pro Pro Asn Ala Thr Val Gln Ile Arg Pro Thr Glu Asp Ser
 420 425 430
 Arg Ile Ile Phe Tyr Asp Cys Met Leu Thr Phe Cys Thr Asn Arg Pro
 435 440 445

<210> 5

<211> 1386

<212> ADN
 <213> bacteriófago Effe04
 <400> 5

```

atgagtaaca atacaatcaa ccacgtaagt gataaatcca tttacgtgac atttgaccca      60
acaggtagctg attggcctga taccataaacc aacgtacaag atgcggttga aaaaataggt      120
agttggggcgc gtactgatac tgggcttccct atcgcaacaa cttctgttcg tgggtattget      180
cagatcgcaa ccgaagctga tattaacgct ggcacggata aactaagat tgttactccg      240
aaactggttag cataccgat gcagaaccct aaagcatcac aaaccgatg gggttatagc      300
aagtattcga ctgatgcgga atctacaacc gtaactaacg atgcatcgtc tattactccg      360
cgatcgctga actatgtggt caataaccgc aaaggtacag aatcggtttg gggttcttct      420
aaaatcgcta ccactgcaca ggcggttgct ggtacagata acactgtaac tatgactccg      480
cttaaagtca agcaagcgat cgcgtctctg gttcctgttc agtcaagtgc gaccgaaagc      540
tcgcaaggtc tggtaacaact ggcaacagtt gcacaggttc aggctggtag gatccgtgaa      600
gggtatgcaa tttcacctta tacgtttatt cgtttaactg caactgaaag caacctgggc      660
gttattcgta tcgcatcaca ggcagaagca aacgcaggta ctgatgacac caaagcgatt      720
actgcgaaaa aattaatcaa taccctgca actggttccc agttcgggtg tgtcaaatga      780
gcaacaactg ttggttatgt ggcaaacacc gcactttctt ctaatgctta tgtattgctt      840
agcgatcgta gtgcggtaat taatggttct ctttatgaga atagcgcaat acataacaac      900
aaatatcaga cgtggacaga tcttgattgg catttcccag taggtgctat tgtcatgact      960
ggtttccaga ctgaccacgg tagtttgtat atttgtgatg gacgttctact gaataaaaat     1020
aattaccctg tactgtttga gcgtataggt tatacatttg gtgggtggcgg tgattggttt     1080
aacattccag actgtcgagg cgttgcagta cgtggctatg accgtgggcg tggactaaac     1140
cctaattcgtg ggtatggtac atatgaagga gatatggtgg gatggcacga acaccatta     1200
caacttatct accagaacgg, cggtaacatt ccgaaatggc aagcagttta cgaactgaaa     1260
agcgccgaga agaatgacca aagegetcgc gtatttggatg cttctataac taaagctact     1320
gggtgtgggcg gtgaagaaac ccgcatgaaa aatatcgcat taaactacgt aattcgcgta     1380
ttataa
    
```

5 <210> 6
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> bacteriófago Effe04
 <400> 6

```

Met Ala Ser Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ser
 1                               5                               10                               15

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

Asp Pro Thr Gly Thr Asp Trp Pro Asp Thr Ile Thr Asn Val Gln Asp
                35                               40                               45

Ala Leu Glu Lys Ile Gly Ser Trp Ala Arg Thr Asp Thr Gly Leu Pro
                50                               55                               60

Ile Ala Thr Thr Ser Val Arg Gly Ile Ala Gln Ile Ala Thr Glu Ala
 65                               70                               75                               80

Asp Ile Asn Ala Gly Thr Asp Asn Thr Lys Ile Val Thr Pro Lys Leu
                85                               90                               95

Leu Ala Tyr Arg Met Gln Asn Pro Lys Ala Ser Gln Thr Val Trp Gly
                100                               105                               110

Tyr Thr Lys Tyr Ser Thr Asp Ala Glu Ser Thr Thr Val Thr Asn Asp
                115                               120                               125
    
```

Ala Ser Ser Ile Thr Pro Arg Ser Leu Asn Tyr Val Phe Asn Asn Arg
 130 135 140

Lys Gly Thr Glu Ser Val Trp Gly Ser Ser Lys Ile Ala Thr Thr Ala
 145 150 155 160

Gln Ala Val Ala Gly Thr Asp Asn Thr Val Thr Met Thr Pro Leu Lys
 165 170 175

Val Lys Gln Ala Ile Ala Ser Leu Val Pro Val Gln Ser Ser Ala Thr
 180 185 190

Glu Ser Ser Gln Gly Leu Val Gln Leu Ala Thr Val Ala Gln Val Gln
 195 200 205

Ala Gly Thr Ile Arg Glu Gly Tyr Ala Ile Ser Pro Tyr Thr Phe Ile
 210 215 220

Arg Leu Thr Ala Thr Glu Ser Asn Leu Gly Val Ile Arg Ile Ala Ser
 225 230 235 240

Gln Thr Glu Ala Asn Ala Gly Thr Asp Asp Thr Lys Ala Ile Thr Ala
 245 250 255

Lys Lys Leu Ile Asn Thr Arg Ala Thr Gly Ser Gln Phe Gly Val Val
 260 265 270

Lys Leu Ala Thr Thr Val Gly Tyr Val Ala Asn Thr Ala Leu Ser Ser
 275 280 285

Asn Ala Tyr Val Leu Pro Ser Asp Arg Ser Ala Val Ile Asn Gly Ser
 290 295 300

Leu Tyr Glu Tyr Ser Ala Ile His Asn Asn Lys Tyr Gln Thr Trp Thr
 305 310 315 320

Asp Leu Asp Trp His Phe Pro Val Gly Ala Ile Val Met Thr Gly Phe
 325 330 335

Gln Thr Asp His Gly Ser Leu Tyr Ile Cys Asp Gly Arg Ser Leu Asn
 340 345 350

Lys Asn Asn Tyr Pro Leu Leu Phe Glu Arg Ile Gly Tyr Thr Phe Gly
 355 360 365

Gly Gly Gly Asp Trp Phe Asn Ile Pro Asp Cys Arg Gly Val Ala Val
 370 375 380

Arg Gly His Asp Arg Gly Arg Gly Leu Asn Pro Asn Arg Gly Tyr Gly
 385 390 395 400

Thr Tyr Glu Gly Asp Met Leu Gly Trp His Glu His Pro Leu Gln Leu
 405 410 415

Ile Tyr Gln Asn Gly Gly Asn Ile Pro Lys Trp Gln Ala Val Tyr Glu
 420 425 430

Leu Lys Ser Ala Glu Lys Asn Asp Gln Ser Ala Arg Val Phe Asp Ala
 435 440 445

Ser Ile Thr Lys Ala Thr Gly Val Gly Gly Glu Glu Thr Arg Met Lys
 450 455 460

Asn Ile Ala Leu Asn Tyr Val Ile Arg Val Leu
 465 470 475

<210> 7
 <211> 1383
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> N-Strep Miro1p12
 <400> 7

5

```

atggctagct ggagccaccc gcagttcgaa aaaggcgccg cccagaataa ctataatcac      60
tacagtgatt tggccaaata tacgatattt gacccaacaa atacacaatg gcctgttget      120
ataaaagacg tccaatcagc gttagagctg attggcagct gggcaagaac tgataccgga      180
ttaccgtag  catctcctac agtagccggt gtaattcgca cagcaacaca ggctgaagtt      240
gatgctggaa ctattggtaa tgctgcggtg actcctgcta cattaaaatc cacagttacc      300
cgtcctgaag caactacagc agttcctggc ttaacacggg atgctactaa tactgaagct      360
gcagcattaa ccgcaggaaa tagaactatt accgcggcgg ctctcgggta tgtgtttaa      420
actgtgaaag cccaagaaaa cgtagatgga actgttaggt taactactgc ggctcaagca      480
caagcaggaa ctgacgaaac taccgcagta actcctaagc gtggtgtaga aatgattgga      540
aagttcagcg ttagtcctcc tagttatacc tctgcaacag aaagcaactt gggattagtt      600
cgtgtcgcaa cccaagccca ggtagcagca ggtgccggtc acgacggata cgcagtaact      660
cmetaaacct tcatggcctc aaaagcgtct gacagtgtat ttggtatagt aaaatttget      720
aaagactcag atgtggcttc agctacttct aacaatttgg ctgttactcc metaaagtctt      780
caagcgctaa aatccacca ggataaatat ggattaacca gattatcagg ttctccaact      840
actgatgctt cactggcagc tgcggcaaca gatgctgttt tmetaaacccg metaataaac      900
ggmetaaacct ttgacaatga cataacgatt actaacaatg atattaattg ttatacaagg      960
caagaatctg acgggcgcta catgccagct ggaactagag taggtaatgt tacttggggt      1020
gaaggacaat cttggattag tgcaggtgca acgtttacat gtaatgcacc atgggaagct      1080
tctagtagat tagctctaaa tgttaatgta aaatttgagc gtaacaacga cggatatgac      1140
aatcgtatct tcagatttgt tgtaaatagtt aacggttccc aatggggcgg tgaacttact      1200
cttaacatcg metaaactaa aggcggacga aatggtcatt catggagatt tgaagcttac      1260
gcatctagca actttttctt caataacatt cctccaaatg ccactgttca metaagacca      1320
acagaagaca gtcgtattat attttatgac tgcatgctta cattctgtac metaagaccg      1380
taa
    
```

<210> 8
 <211> 460
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> N-Strep Miro1p12

10

15

<400> 8

```

Met Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ala Gln Asn
1          5          10          15
Asn Tyr Asn His Tyr Ser Asp Leu Ala Lys Tyr Thr Ile Phe Asp Pro
20        25        30
Thr Asn Thr Gln Trp Pro Val Ala Ile Lys Asp Val Gln Ser Ala Leu
35        40        45
Glu Leu Ile Gly Ser Trp Ala Arg Thr Asp Thr Gly Leu Pro Val Ala
50        55        60
Ser Pro Thr Val Ala Gly Val Ile Arg Thr Ala Thr Gln Ala Glu Val
65        70        75        80
    
```

Asp Ala Gly Thr Ile Gly Asn Ala Ala Val Thr Pro Ala Thr Leu Lys
 85 90 95
 Ser Thr Val Thr Arg Pro Glu Ala Thr Thr Ala Val Leu Gly Leu Thr
 100 105 110
 Arg Tyr Ala Thr Asn Thr Glu Ala Ala Ala Leu Thr Ala Gly Asn Arg
 115 120 125
 Thr Ile Thr Ala Ala Ala Leu Gly His Val Phe Lys Thr Val Lys Ala
 130 135 140
 Gln Glu Asn Val Asp Gly Thr Val Arg Leu Thr Thr Ala Ala Gln Ala
 145 150 155 160
 Gln Ala Gly Thr Asp Glu Thr Thr Ala Val Thr Pro Lys Arg Val Val
 165 170 175
 Glu Met Ile Gly Lys Phe Ser Val Ser Pro Pro Ser Tyr Thr Ser Ala
 180 185 190
 Thr Glu Ser Asn Leu Gly Leu Val Arg Val Ala Thr Gln Ala Gln Val
 195 200 205
 Ala Ala Gly Ala Val His Asp Gly Tyr Ala Val Thr Pro Lys Thr Phe
 210 215 220
 Met Ala Ser Lys Ala Ser Asp Ser Val Phe Gly Ile Val Lys Phe Ala
 225 230 235 240
 Lys Asp Ser Asp Val Ala Ser Ala Thr Ser Asn Asn Leu Ala Val Thr
 245 250 255
 Pro Lys Ser Leu Gln Ala Leu Lys Ser Thr Lys Asp Lys Tyr Gly Leu
 260 265 270
 Thr Arg Leu Ser Gly Ser Pro Thr Thr Asp Ala Ser Leu Ala Ala Ala
 275 280 285
 Ala Thr Asp Ala Val Phe Lys Thr Arg Lys Ile Asn Gly Lys Thr Leu
 290 295 300
 Asp Asn Asp Ile Thr Ile Thr Asn Asn Asp Ile Asn Cys Tyr Thr Arg
 305 310 315 320
 Gln Glu Ser Asp Gly Arg Tyr Met Pro Ala Gly Thr Arg Val Gly Asn
 325 330 335
 Val Thr Trp Val Glu Gly Gln Ser Trp Ile Ser Arg Gly Ala Thr Phe
 340 345 350
 Thr Cys Asn Ala Pro Trp Glu Ala Ser Ser Arg Leu Ala Leu Asn Val
 355 360 365
 Asn Val Lys Phe Glu Arg Asn Asn Asp Gly Tyr Asp Asn Arg Ile Phe
 370 375 380
 Arg Phe Val Val Ile Val Asn Gly Ser Gln Trp Gly Gly Glu Leu Thr
 385 390 395 400
 Leu Asn Ile Glu Asn Thr Lys Gly Gly Arg Asn Gly His Ser Trp Arg
 405 410 415

Phe Glu Ala Tyr Ala Ser Ser Asn Phe Phe Phe Asn Asn Ile Pro Pro
 420 425 430
 Asn Ala Thr Val Gln Ile Arg Pro Thr Glu Asp Ser Arg Ile Ile Phe
 435 440 445
 Tyr Asp Cys Met Leu Thr Phe Cys Thr Asn Arg Pro
 450 455 460

<210> 9

<211> 1383

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> N-Strep Miro2p12

<400> 9

```

atggctagct ggagccaccc gcagttcgaa aaaggcgccg cccagaataa ctataatcac      60
tacagtgatt tggccaaata tacgatattt gacccaacaa atacacaatg gcctggtgct      120
ataaaagacg tccaatcage gttagagctg attggtagct gggcaagaac tgataccgga      180
ttacctgtag catctcctac agtagccggt gtaattcgca cagcaacaca ggctgaagtt      240
gatgctggaa ctattggtaa tgctgcggtg actcctgcta cattaaaatc cacagttacc      300
cgtcctgaag caactacagc agttcttggc ttaacacggt atgctactaa tactgaagcc      360
gcagcattaa ccgcaggaaa tagaactatt accgcggcgg ctctcgggta tgtgtttaa      420
actgtgaaag cccaagaaaa cgtagatgga actgttaggt taactactgc ggctcaagca      480
caagcaggaa ctgacgaaac taccgcagta actcctaagc gtggtgtaga aatgattgga      540
aagttcagtg tcagtcctcc tagttatacc tctgcgacag aaagcaactt gggattagtt      600
cgtgtcgcaa cccaagccca ggtagcagca ggtgctgttc acgatggata cgcagtaact      660
ccaaaaacct tcatggcctc aaaagcgtct gacagcgtat ttggtatagt aaaatttgct      720
aaagactcag atgtggcttc agctacttct aacaatttgg ctgttactcc aaaaagtctt      780
caagcgctaa aatccaccaa ggataaatat ggattaacca gattatcagg ttctccaact      840
actgatgctt cattggcagc ggctgcaaca gatgcagtct ttaaaaccgg tagaataaac      900
ggaaaaactc ttgataatga cataacaatt actaataatg atattaattg ttatacaaga      960
caagaatctg acgggcgctt catgccagct ggaaccagag taggtaatgt tacttggggt      1020
gaaggacaat cttggattag tgcaggtgca acgtttacat gtaatgcacc atgggaagct      1080
tctagtagat tagctctaaa cgtaaatgta aaatttgagc gtaacaacga cggatatgac      1140
aatcgtatct tcagatttgt tgtaatagtt aacgggtccc aatggggagg tgaacttact      1200
cttaacatcg aaaatactaa aggcggacga aatggtcatt catggagatt tgaagcttac      1260
gcatctagca actttttctt caataacatt cctccaaatg ccactgttca aataagacca      1320
acagaagaca gtcgtattat attttatgac tgcattgctta cattctgtac aaatagaccg      1380
taa
    
```

10 <210> 10

<211> 460

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> N-Strep Miro2p12

<400> 10

Met Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ala Gln Asn
 1 5 10 15
 Asn Tyr Asn His Tyr Ser Asp Leu Ala Lys Tyr Thr Ile Phe Asp Pro
 20 25 30

Thr Asn Thr Gln Trp Pro Val Ala Ile Lys Asp Val Gln Ser Ala Leu
 35 40 45
 Glu Leu Ile Gly Ser Trp Ala Arg Thr Asp Thr Gly Leu Pro Val Ala
 50 55 60
 Ser Pro Thr Val Ala Gly Val Ile Arg Thr Ala Thr Gln Ala Glu Val
 65 70 75 80
 Asp Ala Gly Thr Ile Gly Asn Ala Ala Val Thr Pro Ala Thr Leu Lys
 85 90 95
 Ser Thr Val Thr Arg Pro Glu Ala Thr Thr Ala Val Leu Gly Leu Thr
 100 105 110
 Arg Tyr Ala Thr Asn Thr Glu Ala Ala Ala Leu Thr Ala Gly Asn Arg
 115 120 125
 Thr Ile Thr Ala Ala Ala Leu Gly His Val Phe Lys Thr Val Lys Ala
 130 135 140
 Gln Glu Asn Val Asp Gly Thr Val Arg Leu Thr Thr Ala Ala Gln Ala
 145 150 155 160
 Gln Ala Gly Thr Asp Glu Thr Thr Ala Val Thr Pro Lys Arg Val Val
 165 170 175
 Glu Met Ile Gly Lys Phe Ser Val Ser Pro Pro Ser Tyr Thr Ser Ala
 180 185 190
 Thr Glu Ser Asn Leu Gly Leu Val Arg Val Ala Thr Gln Ala Gln Val
 195 200 205
 Ala Ala Gly Ala Val His Asp Gly Tyr Ala Val Thr Pro Lys Thr Phe
 210 215 220
 Met Ala Ser Lys Ala Ser Asp Ser Val Phe Gly Ile Val Lys Phe Ala
 225 230 235 240
 Lys Asp Ser Asp Val Ala Ser Ala Thr Ser Asn Asn Leu Ala Val Thr
 245 250 255
 Pro Lys Ser Leu Gln Ala Leu Lys Ser Thr Lys Asp Lys Tyr Gly Leu
 260 265 270
 Thr Arg Leu Ser Gly Ser Pro Thr Thr Asp Ala Ser Leu Ala Ala Ala
 275 280 285
 Ala Thr Asp Ala Val Phe Lys Thr Arg Arg Ile Asn Gly Lys Thr Leu
 290 295 300
 Asp Asn Asp Ile Thr Ile Thr Asn Asn Asp Ile Asn Cys Tyr Thr Arg
 305 310 315 320
 Gln Glu Ser Asp Gly Arg Tyr Met Pro Ala Gly Thr Arg Val Gly Asn
 325 330 335
 Val Thr Trp Val Glu Gly Gln Ser Trp Ile Ser Arg Gly Ala Thr Phe
 340 345 350
 Thr Cys Asn Ala Pro Trp Glu Ala Ser Ser Arg Leu Ala Leu Asn Val
 355 360 365

Asn Val Lys Phe Glu Arg Asn Asn Asp Gly Tyr Asp Asn Arg Ile Phe
 370 375 380

Arg Phe Val Val Ile Val Asn Gly Ser Gln Trp Gly Gly Glu Leu Thr
 385 390 395 400

Leu Asn Ile Glu Asn Thr Lys Gly Gly Arg Asn Gly His Ser Trp Arg
 405 410 415

Phe Glu Ala Tyr Ala Ser Ser Asn Phe Phe Phe Asn Asn Ile Pro Pro
 420 425 430

Asn Ala Thr Val Gln Ile Arg Pro Thr Glu Asp Ser Arg Ile Ile Phe
 435 440 445

Tyr Asp Cys Met Leu Thr Phe Cys Thr Asn Arg Pro
 450 455 460

- <210> 11
- <211> 1428
- <212> ADN
- 5 <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> N-Strep Effe04p12
- <400> 11

```

atggctagcg ctagttggag ccaccgcgag ttcgaaaaag ggcgccagtaa caatacaatc      60
aaccacgtaa gtgataaatc catttacgtg acatttgacc caacagggtac tgattggcct      120
gataccataa ccaacgtaca agatgcgctg gaaaaaatag gtagttgggc gcgtactgat      180
actgggcttc ctatcgcaac aacttctggt cgtggatttg ctcagatcgc aaccgaagct      240
gatattaacg ctggcacgga taacactaag attgttactc cgaactggtt agcataccgt      300
atgcagaacc ctaagcacc acaaaccgta tggggttata cgaagtattc gactgatgcg      360
gaatctacaa cgtactaa cgatgcacg tctattactc cgcgatcgct gaactatgtg      420
ttcaataacc gcaaaggtag agaategggt tgggggttctt ctaaaatcgc taccactgca      480
caggcgggtg ctggtacaga taacactgta actatgactc cgcttaaagt caagcaagcg      540
atcgcgtctc tggttcctgt tcagtcaagt gcgaccgaaa gctcgcaagg tctggtacaa      600
ctggcaacag ttgcacaggt tcaggctggt acgatccgtg aagggtatgc aatttcacct      660
tatacgttta ttcgtttaac tgcaactgaa agcaacctgg gcgttattcg tatcgcatca      720
cagacagaag caaacgcagg tactgatgac accaaagcga ttactgcgaa aaaattaatc      780
aatacccgtg caactgggtc ccagttcggg gttgtcaaat tagcaacaac tgttgggtat      840
gtggcaaaaca cgcactttc ttctaagct gtatagcga atacataaca acaaatatca gactgggaca      900
attaatgggt ctctttatga gtatagcga atacataaca acaaatatca gactgggaca      960
gatcttgatt ggcatttccc agtaggtgct attgtcatga ctggtttcca gactgaccac     1020
ggtagttgt atatttgcga tggacgttca ctgaataaaa ataattacc gttactgttt     1080
gagcgtatag gttatacatt tgggtggtgg ggtgattggt ttaacattcc agactgtcga     1140
ggcgttcgag tacgtggtca tgaccgtggg cgtggactaa accctaactc tgggtatggt     1200
acatatgaag gagatattgt gggatggcac gaacacccat tacaacttat ctaccagaac     1260
ggcggtaaca ttccgaaatg gcaagcagtt tacgaactga aaagcgcgca gaagaatgac     1320
caaagcgctc gcgtatttga tgcttctata actaaagcta ctggtgtggg cgggtgaagaa     1380
accgcgatga aaaatatcgc attaaactac gtaattcgcg tattataa      1428
    
```

- 10 <210> 12
- <211> 475
- <212> PRT

<213> secuencia artificial
 <220>
 <223> N-Strep Effe04p12
 <400> 12

```

Met Ala Ser Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ser
1           5           10           15

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

Asp Pro Thr Gly Thr Asp Trp Pro Asp Thr Ile Thr Asn Val Gln Asp
35           40           45

Ala Leu Glu Lys Ile Gly Ser Trp Ala Arg Thr Asp Thr Gly Leu Pro
50           55           60

Ile Ala Thr Thr Ser Val Arg Gly Ile Ala Gln Ile Ala Thr Glu Ala
65           70           75           80

Asp Ile Asn Ala Gly Thr Asp Asn Thr Lys Ile Val Thr Pro Lys Leu
85           90           95

Leu Ala Tyr Arg Met Gln Asn Pro Lys Ala Ser Gln Thr Val Trp Gly
100          105          110

Tyr Thr Lys Tyr Ser Thr Asp Ala Glu Ser Thr Thr Val Thr Asn Asp
115          120          125

Ala Ser Ser Ile Thr Pro Arg Ser Leu Asn Tyr Val Phe Asn Asn Arg
130          135          140

Lys Gly Thr Glu Ser Val Trp Gly Ser Ser Lys Ile Ala Thr Thr Ala
145          150          155          160

Gln Ala Val Ala Gly Thr Asp Asn Thr Val Thr Met Thr Pro Leu Lys
165          170          175

Val Lys Gln Ala Ile Ala Ser Leu Val Pro Val Gln Ser Ser Ala Thr
180          185          190

Glu Ser Ser Gln Gly Leu Val Gln Leu Ala Thr Val Ala Gln Val Gln
195          200          205

Ala Gly Thr Ile Arg Glu Gly Tyr Ala Ile Ser Pro Tyr Thr Phe Ile
210          215          220

Arg Leu Thr Ala Thr Glu Ser Asn Leu Gly Val Ile Arg Ile Ala Ser
225          230          235          240

Gln Thr Glu Ala Asn Ala Gly Thr Asp Asp Thr Lys Ala Ile Thr Ala
245          250          255

Lys Lys Leu Ile Asn Thr Arg Ala Thr Gly Ser Gln Phe Gly Val Val
260          265          270

Lys Leu Ala Thr Thr Val Gly Tyr Val Ala Asn Thr Ala Leu Ser Ser
275          280          285

Asn Ala Tyr Val Leu Pro Ser Asp Arg Ser Ala Val Ile Asn Gly Ser
290          295          300

Leu Tyr Glu Tyr Ser Ala Ile His Asn Asn Lys Tyr Gln Thr Trp Thr
305          310          315          320

```

Asp Leu Asp Trp His Phe Pro Val Gly Ala Ile Val Met Thr Gly Phe
 325 330 335
 Gln Thr Asp His Gly Ser Leu Tyr Ile Cys Asp Gly Arg Ser Leu Asn
 340 345 350
 Lys Asn Asn Tyr Pro Leu Leu Phe Glu Arg Ile Gly Tyr Thr Phe Gly
 355 360 365
 Gly Gly Gly Asp Trp Phe Asn Ile Pro Asp Cys Arg Gly Val Ala Val
 370 375 380
 Arg Gly His Asp Arg Gly Arg Gly Leu Asn Pro Asn Arg Gly Tyr Gly
 385 390 395 400
 Thr Tyr Glu Gly Asp Met Leu Gly Trp His Glu His Pro Leu Gln Leu
 405 410 415
 Ile Tyr Gln Asn Gly Gly Asn Ile Pro Lys Trp Gln Ala Val Tyr Glu
 420 425 430
 Leu Lys Ser Ala Glu Lys Asn Asp Gln Ser Ala Arg Val Phe Asp Ala
 435 440 445
 Ser Ile Thr Lys Ala Thr Gly Val Gly Gly Glu Glu Thr Arg Met Lys
 450 455 460
 Asn Ile Ala Leu Asn Tyr Val Ile Arg Val Leu
 465 470 475

- <210> 13
- <211> 1347
- <212> ADN
- 5 <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> N-Strep Aehlp12
- <400> 13

```

atggctagct ggagccaccg gcagttcgaa aaaggcgcca gaacaaataa tatcacacag      60
catattagct ctaaagcggg gtcggttgta ttcgaccccg catctgctcc tgcttttgat      120
acgactatca cagatctaca aaagctggga aataaaatcg atgctcatgc aactaaacca      180
ctaccggctc catctgaaac tgtatcgggt attgctgaat tggctaccgt tgatgaagtt      240
ctattgggaa atgataaagt tagattagtc actccttata cacttcaaca aaaatgggcy      300
cgtcctaag cgagcgacac cgtttatggt ctagttagat ataatacagt agcagaacga      360
gaagaagcgg cagcgaaagt tgacgttact gtgaataccg catctttgtg ggacgttggt      420
cgtaataaat cgattgcaac tgagtccaag cgcggatcag tgagtatttc aactctggta      480
gctgccaag ctggcgtaga tgatacaaca gcaatgacac cagcgaaagt taaagcggca      540
atcgacacgt tcgcggtaac ttctgtatct ggtgcaactg aaaccgttac gggcacagtt      600
aagaatagtc cggcattaat cactaacgcc gcgcttcata ccggttatgc agttacacct      660
aaaggtttca ttgaaaccag agccgcacag gctcgcggtg gaacagttcg tatggcaact      720
caagcagaag ctaacgctag aactctggga cagctggcaa tcagtcacgc gacgcttcca      780
atcgcatctg atacacaata tggcatcact gctcttttgc ataacgcgca atccggcgta      840
acaaacaaag cattgagcgc acacggagcg actctgttta tcaacagaaa cggcgactcc      900
atgacgggtg atcttactgt tcataatata tttactgcta acgggcaaaa cggacgtggc      960
gattcgctga ctgaaagga ttacggtgac ggacttttca atcagaaagc gaatatttcg     1020
catacgcacg gaactccaca agaatcatgg aactaattt ggcagggacc gttagatcgc     1080
ggtaatctcg tgactaatca gccatggtgg aacttcgatg cactcgttat tgaaagtccg     1140
cgtgatggtg ctgactgggt taataccatg gagattagtc gttggcagat cgaacgatg     1200
caagcaaaat atccaaactt caacttggtg tcggcacaag aatattattg gtttggttaag     1260
tttagagccg atggtatgta tttcgacacc catacagaga actgctatct gtggagaata     1320
tacggaggtta acaaaaactg gagctaa
    
```

5

- <210> 14
- <211> 448
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> N-Strep Aehlp12
- <400> 14

```

Met Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Arg Thr Asn
1           5           10           15

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

Pro Ala Ser Ala Pro Ala Phe Asp Thr Thr Ile Thr Asp Leu Gln Lys
          35           40           45

Leu Gly Asn Lys Ile Asp Ala His Ala Thr Lys Pro Leu Pro Val Ala
          50           55           60

Ser Glu Thr Val Ser Gly Ile Ala Glu Leu Ala Thr Val Asp Glu Val
65           70           75           80

Leu Leu Gly Asn Asp Lys Val Arg Leu Val Thr Pro Tyr Thr Leu Gln
          85           90           95

Gln Lys Trp Ala Arg Pro Asn Ala Ser Asp Thr Val Tyr Gly Leu Val
          100          105          110

Arg Tyr Asn Thr Val Ala Glu Arg Glu Glu Ala Ala Ala Lys Val Asp
          115          120          125

Val Thr Val Asn Thr Ala Ser Leu Trp Asp Val Val Arg Asn Lys Ser
          130          135          140

Ile Ala Thr Glu Ser Lys Arg Gly Ser Val Ser Ile Ser Thr Leu Val
145          150          155          160

Ala Ala Lys Ala Gly Val Asp Asp Thr Thr Ala Met Thr Pro Ala Lys
          165          170          175

Val Lys Ala Ala Ile Asp Thr Phe Ala Val Thr Ser Val Ser Gly Ala
          180          185          190

Thr Glu Thr Val Thr Gly Thr Val Lys Asn Ser Pro Ala Leu Ile Thr
          195          200          205

Asn Ala Ala Leu His Thr Gly Tyr Ala Val Thr Pro Lys Gly Phe Ile
          210          215          220

Glu Thr Arg Ala Ala Gln Ala Arg Val Gly Thr Val Arg Met Ala Thr
225          230          235          240

Gln Ala Glu Ala Asn Ala Arg Thr Leu Gly Asp Val Ala Ile Ser Pro
          245          250          255

Ala Thr Leu Pro Ile Ala Ser Asp Thr Gln Tyr Gly Ile Thr Ala Leu
          260          265          270
    
```

Leu His Asn Ala Gln Ser Gly Val Thr Asn Lys Ala Leu Ser Ala His
 275 280 285
 Gly Ala Thr Leu Phe Ile Asn Arg Asn Gly Asp Ser Met Thr Gly Asp
 290 295 300
 Leu Thr Val His Asn Ile Phe Thr Ala Asn Gly Gln Asn Gly Arg Gly
 305 310 315 320
 Asp Ser Leu Thr Arg Lys Asp Tyr Val Asp Gly Leu Phe Asn Gln Lys
 325 330 335
 Ala Asn Ile Ser His Thr His Gly Thr Pro Gln Glu Ser Trp Thr Leu
 340 345 350
 Ile Trp Gln Gly Pro Leu Asp Arg Gly Asn Phe Val Thr Asn Gln Pro
 355 360 365
 Trp Trp Asn Phe Asp Ala Leu Val Ile Glu Ser Ser Arg Asp Gly Gly
 370 375 380
 Ser Trp Phe Asn Thr Met Glu Ile Ser Arg Trp Gln Ile Glu Gln Met
 385 390 395 400
 Gln Ala Lys Tyr Pro Asn Phe Asn Leu Val Ser Ala Gln Glu Tyr Tyr
 405 410 415
 Trp Phe Gly Lys Phe Arg Ala Asp Gly Met Tyr Phe Asp Thr His Thr
 420 425 430
 Glu Asn Cys Tyr Leu Trp Arg Ile Tyr Gly Val Asn Lys Thr Trp Ser
 435 440 445

<210> 15

<211> 75

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 15

gaaggaacta gtcatatggc tagctgggagc caccgcgagt tcgaaaaagg cgccgcccag 60
aataactata atcac 75

10 <210> 16

<211> 29

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador

<400> 16

cgggatcctc cttacggtct atttgata 29

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la eliminación de endotoxina de una muestra, que comprende las etapas de:

5 a) incubación o puesta en contacto de una muestra con proteínas de cola de bacteriófago que están inmovilizadas en un portador sólido de forma inespecífica o dirigida, siendo capaces las proteínas de cola de bacteriófago de unirse a endotoxina tanto en presencia como en ausencia de iones positivos divalentes e independientemente de la concentración de iones positivos divalentes, y a continuación

b) separación del complejo de proteína de cola de bacteriófago-endotoxina de la muestra.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las etapas a) y b) se llevan a cabo en un procedimiento de circulación por columnas de cromatografía.

10 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los portadores sólidos son celulosa, medios de filtración, partículas de vidrio, partículas magnéticas, materiales de centrifugación o sedimentación o materiales de carga para columnas cromatográficas.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que las proteínas de cola de bacteriófago están inmovilizadas sobre el portador sólido mediante grupos de acoplamiento.

15 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que las proteínas de cola de bacteriófago están inmovilizadas covalentemente sobre el portador sólido mediante enlaces químicos.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína de cola de bacteriófago presenta un marcador Strep o un marcador His.

20 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína de cola de bacteriófago es una proteína de cola de bacteriófago corta.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína de cola de bacteriófago procede de la familia de los *Myoviridae*.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína de cola de bacteriófago procede del grupo de fagos pseudo-T-par, esquizo-T-par o T-par.

25 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína de cola de bacteriófago es capaz de unirse al ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico en la región central de la endotoxina.

11. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína de cola de bacteriófago se selecciona de las SEC ID N° 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14.

30 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración de iones positivos divalentes libres no unidos es menor de 0,1 μM .

13. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que los iones positivos divalentes son Ca^{2+} y/o Mg^{2+} .

14. Polipéptido según las SEC ID N° 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14.

15. Molécula de ácido nucleico con una secuencia según las SEC ID N° 1, 3, 5, 7, 9, 11 o 13.

35 16. Procedimiento para la detección de endotoxina que comprende las etapas de:

a) puesta en contacto de una muestra que contiene endotoxina con una superficie, a continuación

b) incubación de proteínas de cola de bacteriófago con endotoxinas inmovilizadas sobre la superficie, siendo capaces las proteínas de cola de bacteriófago de unirse tanto en presencia como en ausencia de iones positivos divalentes e independientemente de la concentración de iones positivos divalentes, y a continuación

40 c) detección de las proteínas de cola de bacteriófago unidas a endotoxina.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, que comprende además, después de la etapa a) y antes de la etapa b), la etapa adicional de

a') eliminación de la muestra.

18. Procedimiento según la reivindicación 16 o 17, que comprende además, después de la etapa b) y antes de

la etapa c), la etapa adicional de

b') eliminación de las proteínas de cola de bacteriófago no unidas.

19. Procedimiento para la detección de endotoxina, que comprende las etapas de:

a) puesta en contacto de una muestra que contiene endotoxina con una superficie, a continuación

5 b) incubación de las proteínas de cola de bacteriófago con endotoxinas inmovilizadas sobre la superficie, siendo capaces las proteínas de cola de bacteriófago de unirse tanto en presencia como en ausencia de iones positivos divalentes e independientemente de la concentración de iones positivos divalentes, y a continuación

c) eliminación de las proteínas de cola de bacteriófago no unidas y

10 d) detección de las proteínas de cola de bacteriófago unidas a endotoxina no unidas obtenidas en la etapa c).

20. Procedimiento según la reivindicación 19, que comprende después además, de la etapa a) y antes de la etapa b), la etapa adicional de

a') eliminación de la muestra de la superficie.

15 21. Procedimiento según una de las reivindicaciones 16 a 20, en el que la superficie está recubierta mediante adsorción o acoplamiento covalente con un ligando que se une a endotoxina.

22. Procedimiento según la reivindicación 21, en el que el ligando que se une a endotoxina es una proteína de cola de bacteriófago que es capaz de unirse a endotoxina tanto en presencia como en ausencia de iones positivos divalentes.

23. Procedimiento para la detección de endotoxina, que comprende las siguientes etapas:

20 a) puesta en contacto de una muestra que contiene endotoxina con una superficie sobre la que se han inmovilizado las primeras proteínas de cola de bacteriófago, que son capaces de unirse a endotoxina tanto en presencia como en ausencia de iones positivos divalentes e independientemente de la concentración de iones positivos divalentes, y a continuación dado el caso

b) eliminación de la muestra de la superficie, a continuación

25 c) incubación de las segundas proteínas de cola de bacteriófago con endotoxinas unidas a las primeras proteínas de cola de bacteriófago, uniéndose las segundas proteínas de cola de bacteriófago a endotoxinas solo en presencia de iones positivos divalentes, y a continuación dado el caso

d) eliminación de las segundas proteínas de cola de bacteriófago no unidas, y a continuación

e) detección de las segundas proteínas de cola de bacteriófago unidas a endotoxina.

30 24. Procedimiento para la detección de endotoxina que comprende las siguientes etapas:

a) puesta en contacto de una muestra que contiene endotoxina con una superficie sobre la que se han inmovilizado proteínas de cola de bacteriófago que son capaces de unirse a endotoxina tanto en presencia como en ausencia de iones positivos divalentes e independientemente de la concentración de iones positivos divalentes, y a continuación dado el caso a. eliminación de la muestra de la superficie, a continuación

35 f) detección de las endotoxinas unidas en la etapa a).

25. Procedimiento según una de las reivindicaciones 16 a 24, en el que la detección se lleva a cabo mediante procedimientos espectroscópicos, ELISA, reacción de detección química o enzimática de endotoxinas o componentes de endotoxina escindidos o mediante medida de capacidad.

26. Procedimiento para la detección de endotoxina, que comprende las etapas de:

40 a) mezclado de la muestra con endotoxinas que están acopladas con un marcador, a continuación

b) aplicación de la mezcla de la etapa a) sobre una superficie con proteínas de cola de bacteriófago inmovilizadas, siendo capaces las proteínas de cola de bacteriófago de unirse a endotoxina tanto en presencia como en ausencia de iones positivos divalentes e independientemente de la concentración de iones positivos divalentes, a continuación

c) retirada de la mezcla de la superficie, a continuación

d) lavado de la superficie, y a continuación

e) detección de la endotoxina marcada sobre la superficie y/o de la endotoxina marcada libre de las muestras combinadas después de la etapa c) y d).

5 27. Procedimiento según una de las reivindicaciones 16 a 26, en el que las proteínas de cola de bacteriófago están inmovilizadas en el portador sólido mediante grupos de acoplamiento.

28. Procedimiento según una de las reivindicaciones 16 a 27, en el que las proteínas de cola de bacteriófago están inmovilizadas covalentemente en el portador sólido mediante enlaces químicos.

10 29. Procedimiento según una de las reivindicaciones 16 a 28, en el que la proteína de cola de bacteriófago presenta un marcador Strep o un marcador His.

30. Procedimiento según una de las reivindicaciones 16 a 29, en el que la proteína de cola de bacteriófago es una proteína de cola de bacteriófago corta.

31. Procedimiento según una de las reivindicaciones 16 a 30, en el que la proteína de cola de bacteriófago proviene de la familia *Myoviridae*.

15 32. Procedimiento según una de las reivindicaciones 16 a 31, en el que la proteína de cola de bacteriófago proviene del grupo de fagos pseudo-T-par, esquizo-T-par o T-par.

33. Procedimiento según una de las reivindicaciones 16 a 32, en el que la proteína de cola de bacteriófago es capaz de unirse al ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico en la región central de las endotoxinas.

20 34. Procedimiento según una de las reivindicaciones 16 a 33, en el que la proteína de cola de bacteriófago se selecciona de las SEC ID N° 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14.

Fig. 1

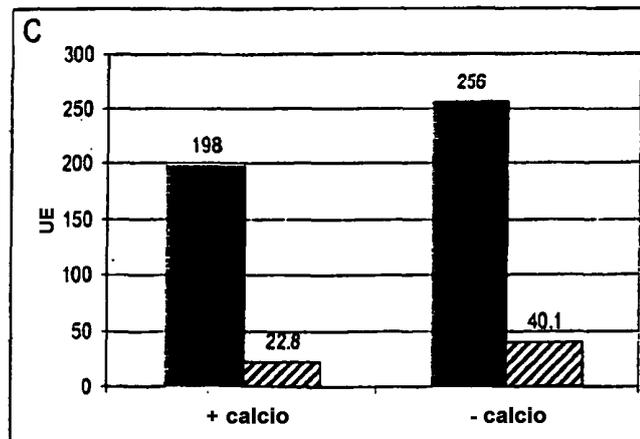
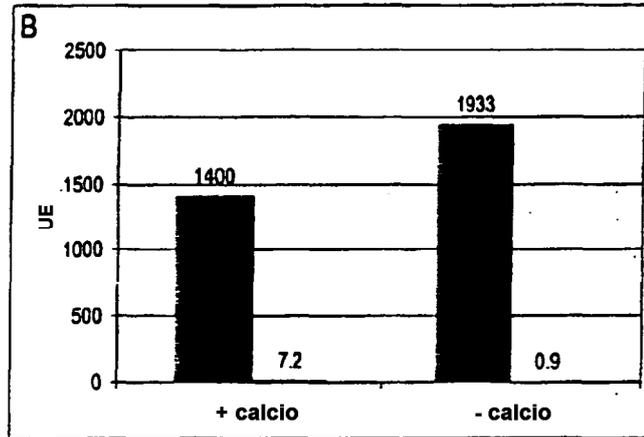
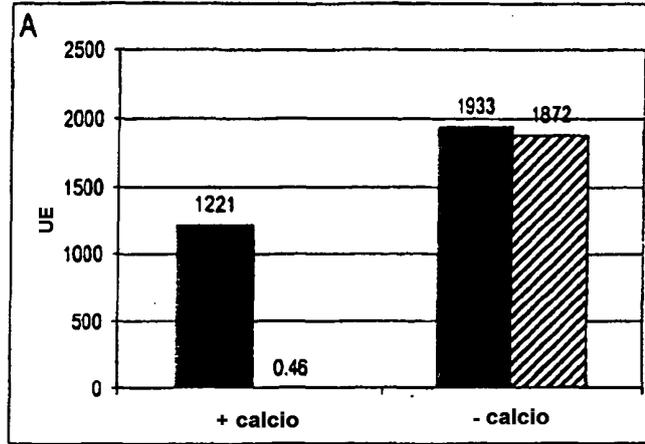


Fig. 2

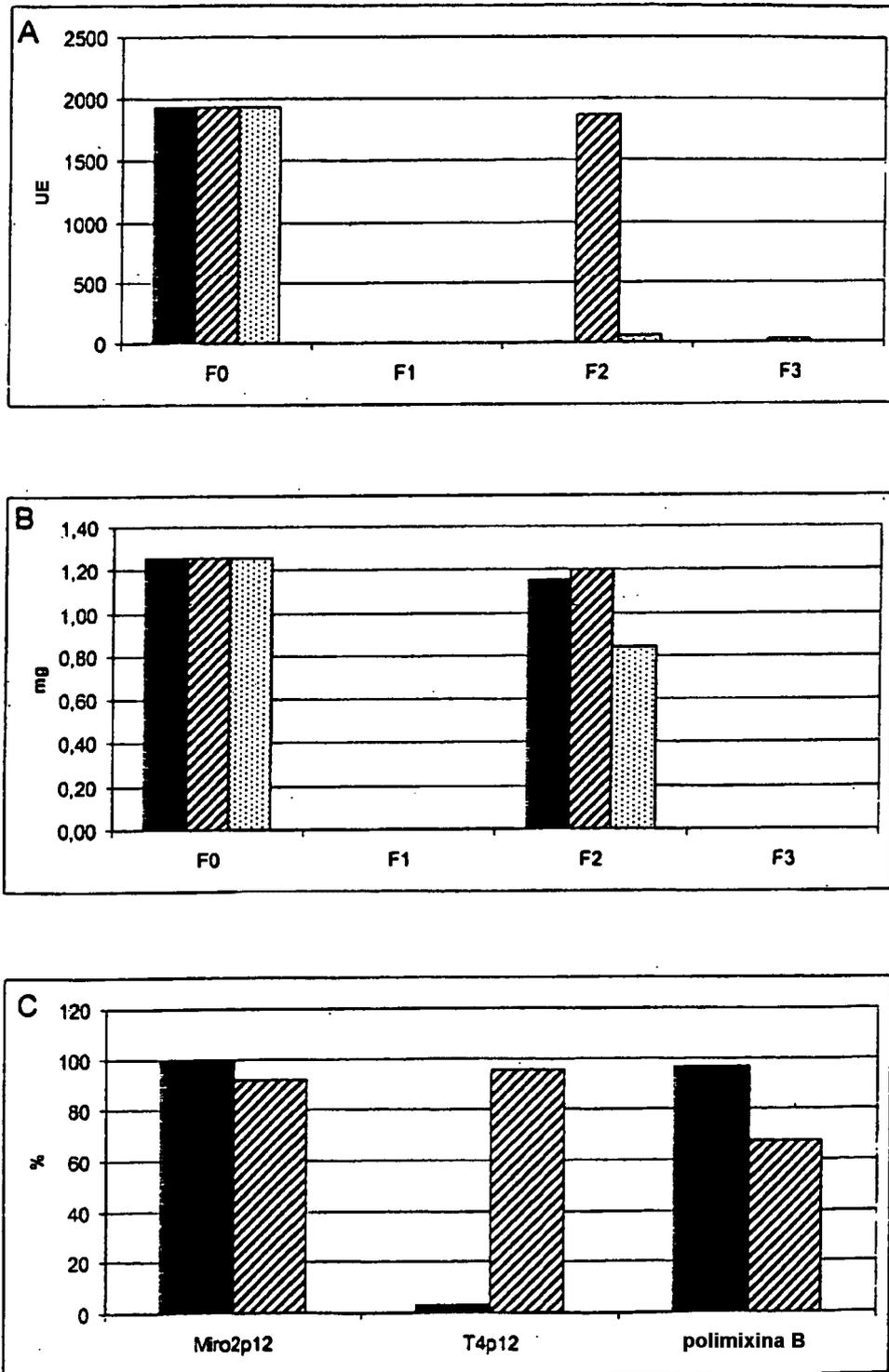


Fig. 3

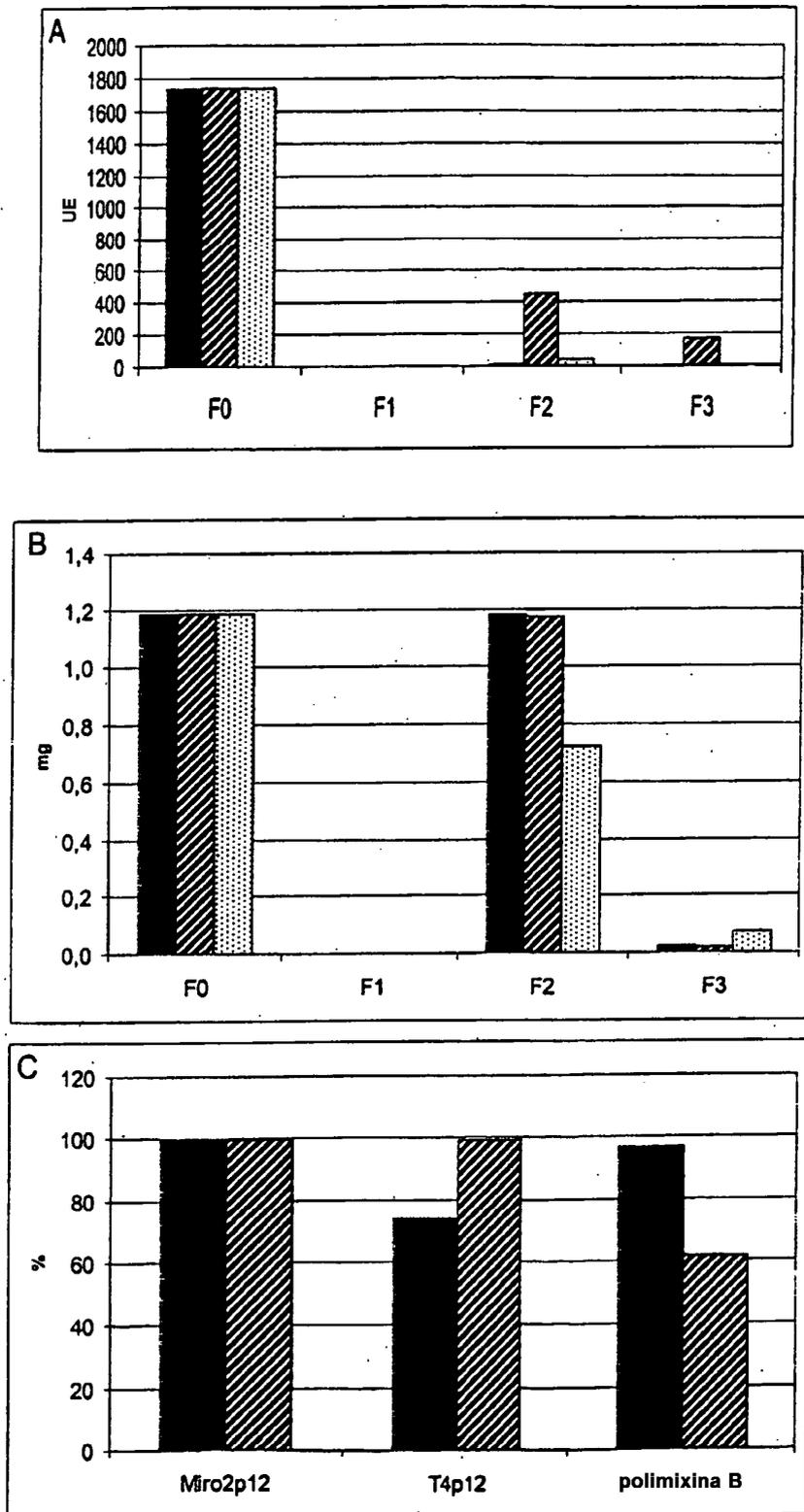


Fig. 4

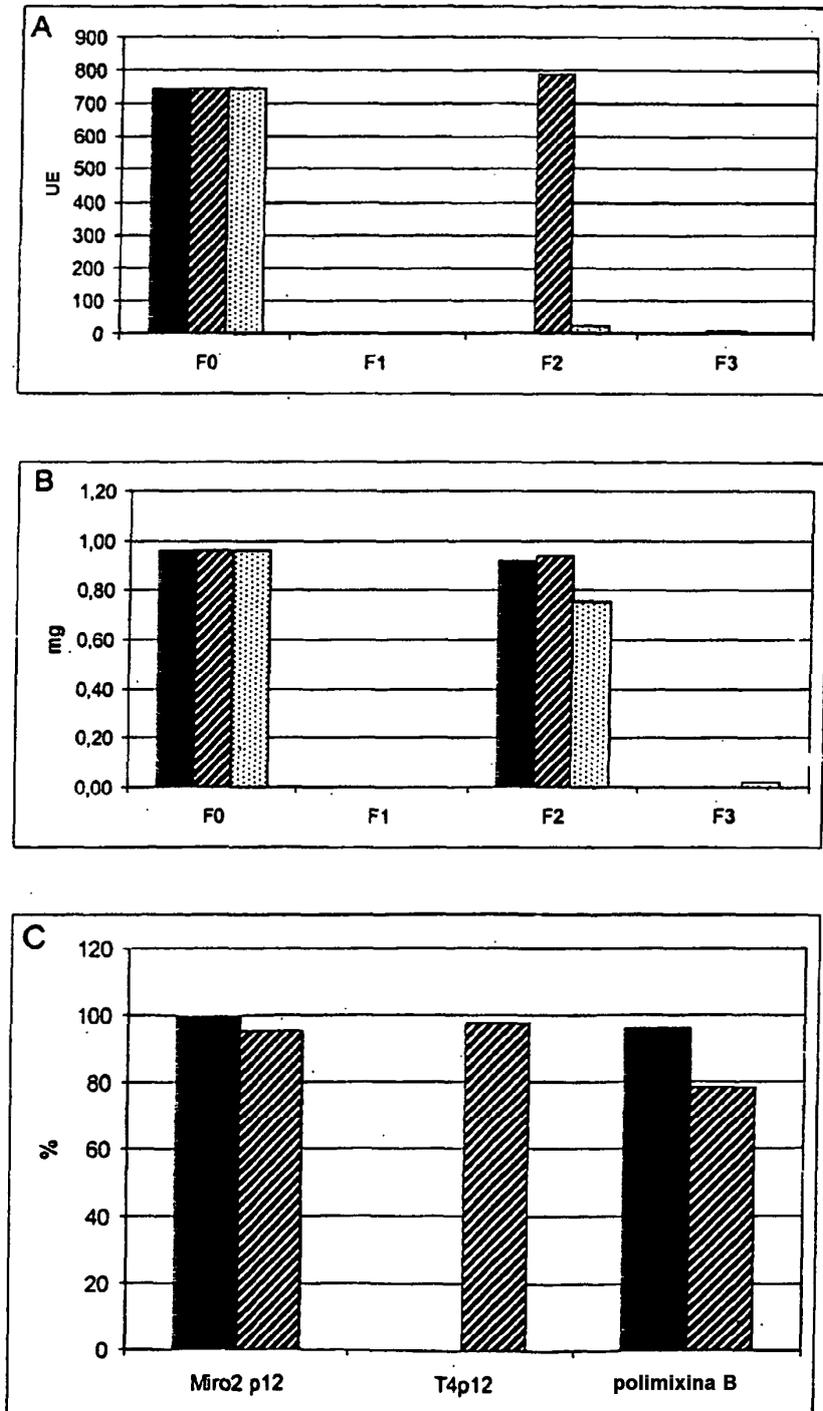


Fig. 5

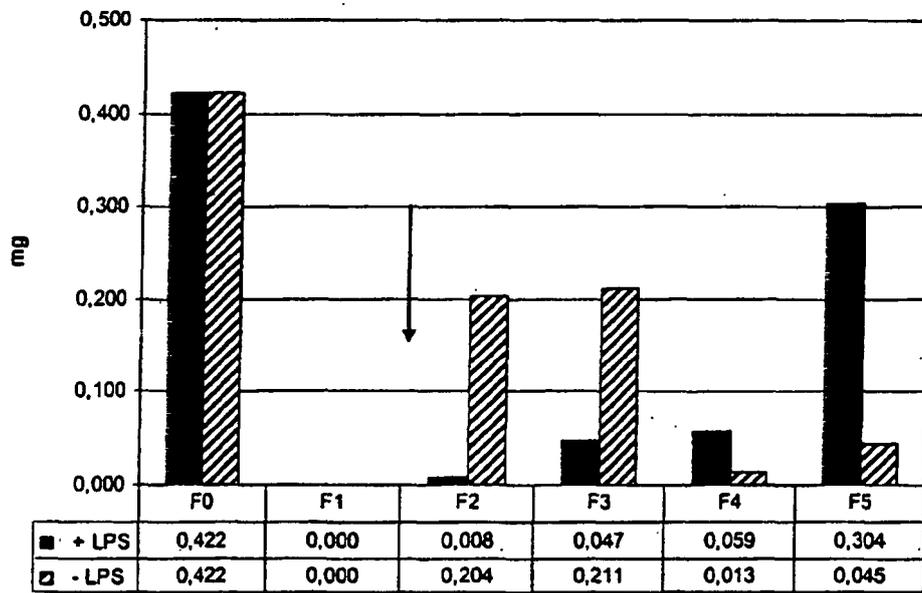


Fig. 6

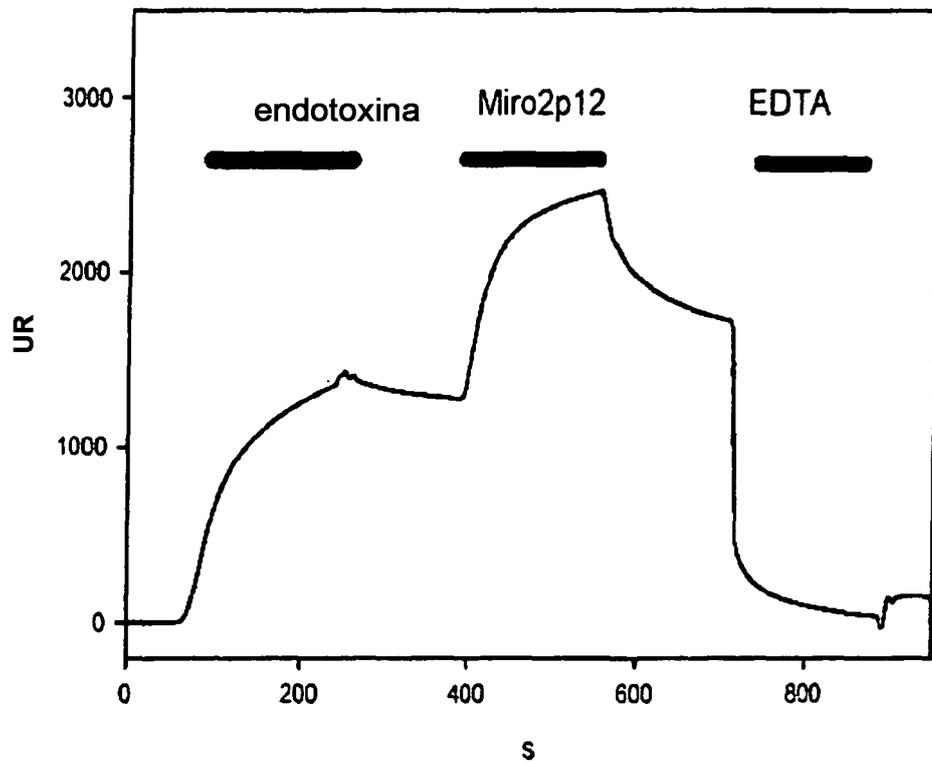


Fig. 7

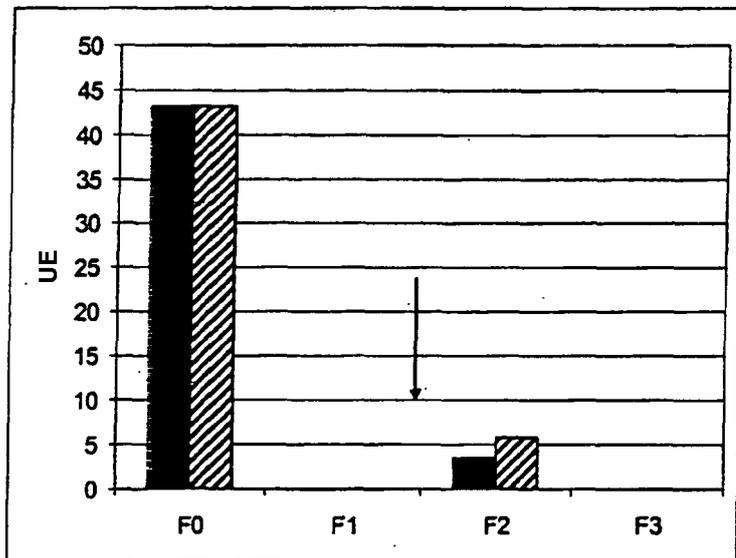


Fig. 8

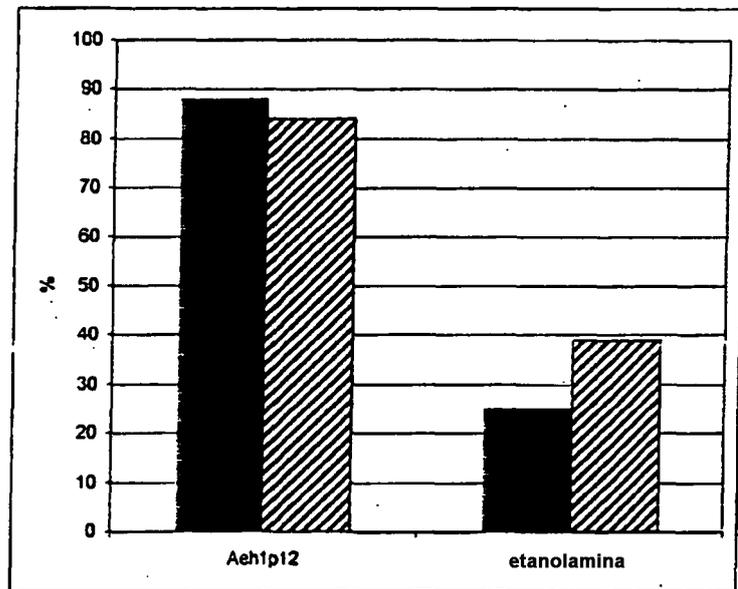


Fig. 9

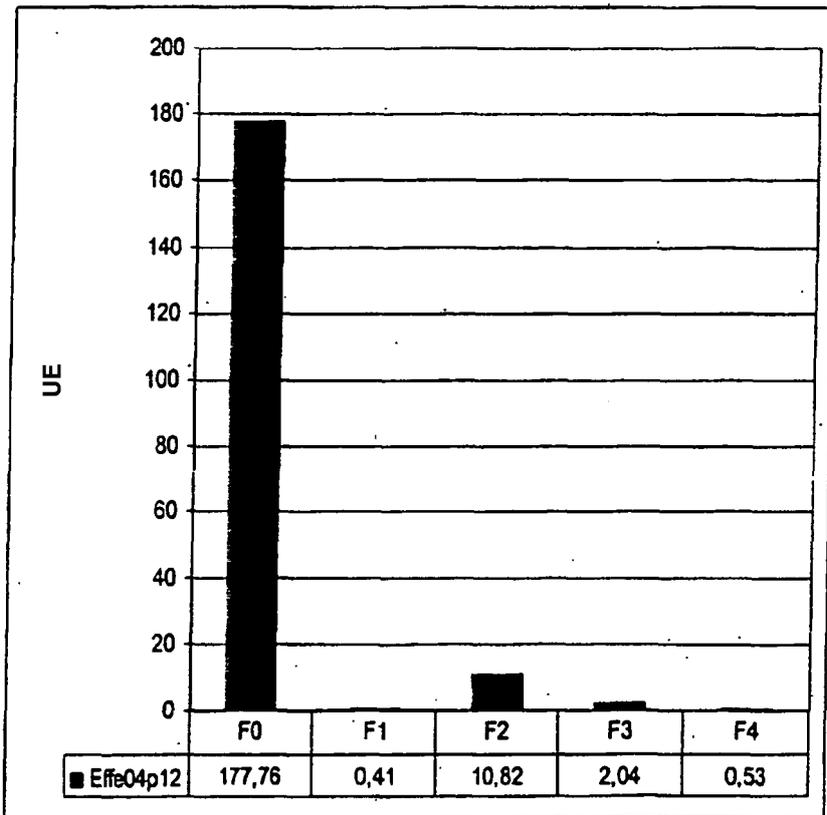


Fig. 10

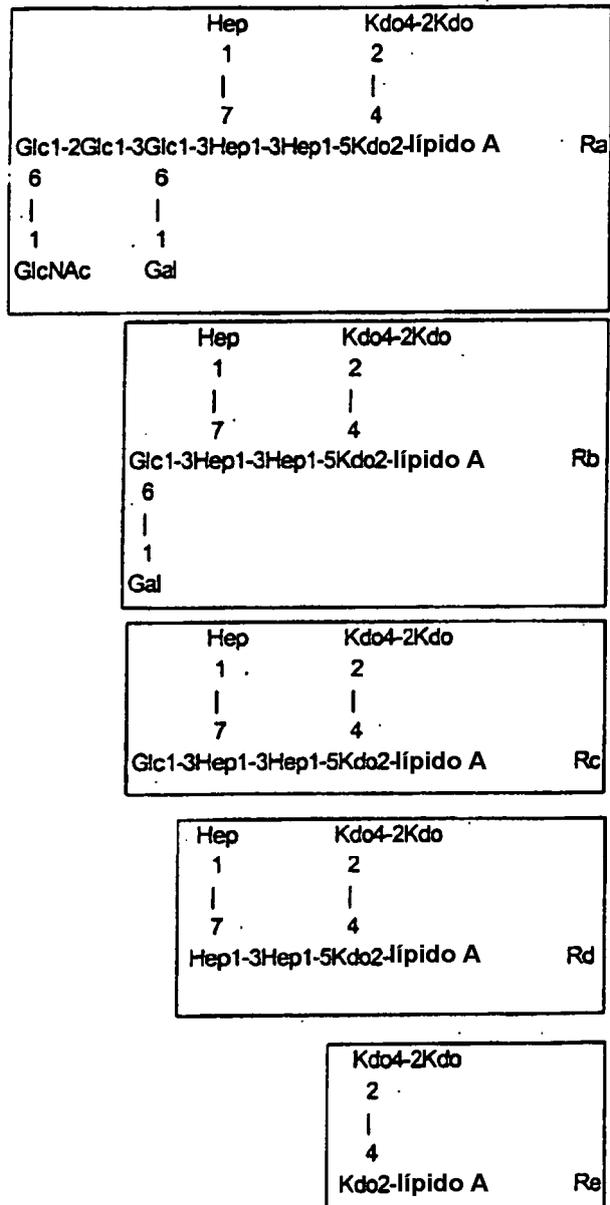


FIG.11 A

K3p12 -----MSNNTYQHVS NESRYVKFDPTD TNFPPEI ---TDVQAAIAAIS PAG
T2p12 -----MSNNTYQHVS NESRYVKFDPTD TNFPPEI ---TDVQAAIAAIS PAG
T4p12 -----MSNNTYQHVS NESRYVKFDPTD TNFPPEI ---TDVHAAIAAIS PAG
RB32-33 -----MSNNTYQHVS NESKYVKFDPVGSNFPDTV ---TTVQSALS KISNIG
AR1p12 -----MSNNTYQHVS NESKYVKFDP TGSNFPDTV ---TTVQSALS KISNIG
PP01p12 -----MSNNTYQHVS NESKYVKFDPVGSNFPDTV ---TTVQSALS KISNIG
RB69 -----MSNNTYQHVS NESVYVEFDPTGSNFDSSI ---TNVQAALAS ISAYG
Eff04_p12 MASASWSHPQFEKGASNNTINHVS DKS IYVTFDPTGTDWPD TI ---TNVQDALEKIGSWA
RB43p12 -----MSNNTINHVS DASVYVTFDPAGTQWPSTF ---VNVQOALAS IGPWA
RB49p12 -----MANNTINHVKDDAQYVKFNPNV-DWPQSI ---TNVQAALAAINGFA
Miro1p12 ---MLEPPAVEKGA AQNNYNHYS DLAKYTI FDPTNTQWPVAI ---KDVQSALELIGSWA
Miro2p12 ---MASWSHPQFEKGAAQNNYNHYS DLAKYTI FDPTNTQWPVAI ---KDVQSALELIGSWA
44RR2 -----MVANNIKNHIS DS AESVNY --TGDNWPAIV ---TTVADALDRVAPWA
PHG31p12 -----MVANNIKNHIS DS AESVNY --TGDTPAIV ---TTVADALDRVAPWA
AehI p12 -----MRTNNI TQHIS S KAGSVV FDPASAPAFDTT -ITDLQKLG NKIDAHA
KVP40p12 -----MSKGTQI FNHVIDDAGT VTEVAGTAFDGTGGNDLQTCLELIQDHA

K3p12 VN--GVP---DASSTTKGILFLATEQEVIDGTNNTKAVTPATLATRLS-YPNATETVYGL
T2p12 VN--GVP---DASSTTKGILFLATEQEVIDGTNNTKAVTPATLATRLS-YPNATEAVYGL
T4p12 VN--GVP---DASSTTKGILFIPTQEVIDGTNNTKAVTPATLATRLS-YPNATETVYGL
RB32-33 VN--GIP---DATMEVKGIAMIASEQEVLDGTNNSKI VTPATLATRLL-YPNATETKYGL
AR1p12 VN--GIP---DATMEVKGIAMIASEQEVLDGTNNSKI VTPATLATRLL-YPNATETKYGL
PP01p12 VN--GIP---DASMEVKGIAMIASEQEVLDGTNNSKI VTPATLATRLL-YPNATETKYGL
RB69 VK--GVP---DASEAEKGV IQLATEQEVL DGFNSTKAVTPATLNARLQ-YPNASETQYGV
Eff04_p12 RTDTGLP---IATTSVRGIAIATEADINAGTDNTKI VTPKLLAYRMO-NPKASQTVWGY
RB43p12 RTDVGLP---NAAPGMRGIAAIAATEAMIDAGTDNETIVTPALLAYRLQ-NPHASQTVWGY
RB49p12 VN--GLP---DATEDTAGIAAIA TQE EVNDGTVDNKI VTPKTLAVKMS-RPDATKEVKGI
Miro1p12 RTDTGLP---VASPTVAGVIRTATQAEVDAGTIGNAAVTPATLKSTVT-RPEATTAVLGL
Miro2p12 RTDTGLP---VASPTVAGVIRTATQAEVDAGTIGNAAVTPATLKSTVT-RPEATTAVLGL
44RR2 I IDNGLP---LATTQIAGI IRIATTAEMQAGTSANTA ITPALLKLAME-TPQASETI VGN
PHG31p12 I IDNGLP---LATTQIAGI IRIATTAEMQAGTSANTA ITPALLKLAME-TPQASETI VGN
AehI p12 TK--PLP---VASET VSGIAELATVDEVLLGNDKVR LVTPYTLQKWA-RPNASDTVYGL
KVP40p12 VQ--PLPDYPVASTTVAGITKLSDEAAVVDPLNTDSAVTPSSLDYWMQNHATATELQYGF

K3p12 TRYSTN---DEAIAGVNNESSITPAKFTVALNNAFETR-VSTESSNGVIKISSLPQALAG
T2p12 TRYSTD---DEAIAGVNNESSITPAKFTVALNNAFETR-VSTESSNGVIKISSLPQALAG
T4p12 TRYSTN---DEAIAGVNNESSITPAKFTVALNNAFETR-VSTESSNGVIKISSLPQALAG
RB32-33 TRYSTN---EETLEGS DMNSSITPQKLYHTDDVFQNR-YSS ESSNGVIKISSTPAALAG
AR1p12 TRYSTN---EETLEGS DMNSSITPQKLYHTDDVFQNR-YSS ESSNGVIKISSTPAALAG
PP01p12 TRYSTN---EETLEGS DMNSSITPQKLYHTDDVFQNR-YSS ESSNGVIKISSTPAALAG
RB69 TKYATQ---EEAIAGTLDTVSITPLKLNQIDNTFSTR-YSTETTNGVIKIATQTAALAG
Eff04_p12 TKYSTD---AESTTVTNDASSITPR----SLNYVFNNR-KGTESVWGSSKIATTAQAVAG
RB43p12 TKYATD---AEAVDVANDLVSLTPR----SINVVFNTR-HASETVWGSSKLSSTTAQATAG
RB49p12 TRFATM---EESLQESNENMAIGPD----TLNHYFTTK-KASESVQGTIKICSLEAAKIG
Miro1p12 TRYATN---TEAAALTAGNRTITAA----ALGHVFKTV-KAQENV DGTVRLTTAAQAQAG
Miro2p12 TRYATN---TEAAALTAGNRTITAA----ALGHVFKTV-KAQENV DGTVRLTTAAQAQAG
44RR2 TRYATN---AEALALTLNTAAITPAN----LGYVFANK-AATESARGTMRISTQAQATSG
PHG31p12 TRYATN---AEALALTLNTAAITPAN----LGYVFANK-AATESARGTMRISTQAQATSG
AehI p12 VRYN-----TVAEREEAAAKVDVTVNTASLWDVVRNKS IATESKRGVSIS TLVAAKAG
KVP40p12 VKLITESTIDTVAPSDPVEAAOKHAFTLKT LNYALNTRFYATESDPGAVRLATNAQATTT

FIG.11 B

K3p12 --ADDTTAMTPLKTQQLAIKLI AQIAPSETTATESDQGVVQLATVAQVRQGTLRREG-YAI
T2p12 --ADDTTAMTPLKTQQLAVKLI AQIAPSKNAATESEQGVIQLATVAQARQGTLRREG-YAI
T4p12 --ADDTTAMTPLKTQQLAIKLI AQIAPSETTATESDQGVVQLATVAQVRQGTLRREG-YAI
RB32-33 --VDDTTAMTPLKTQKLAIKLISQIAPSEDTASESVRGVVQLSTVAQTRQGTLRREG-YAI
AR1p12 --VDDTTAMTPLKTQKLAIKLISQIAPSEDTASESVRGVVQLSTVAQTRQGTLRREG-YAI
PP01p12 --VDDTTAMTPLKTQKLAIKLISQIAPSEDTASESVRGVVQLSTVAQTRQGTLRREG-YAI
RB69 --SDDTTAMTPLKTQQLAIKLI SQIAPNNDPASESITGVVRLATVAQTRQGTLRREG-YAI
Eff04_p12 --TDNTVTMTPLKVKQAIASLVP----VQSSATESSQGLVQLATVAQVQAGTIREG-YAI
RB43p12 --TDDTTSMTPLKVKQAIASLVP----VQSNATESAFGLVQLATVSEVRAGTIRDG-FAI
RB49p12 --SDDTMAVTPKQMHTAIAQIVPGLIPDQNTATESAQGLVQLATNAQVLQGTIREG-FAI
Miro1p12 --TDETTAVTPKRVMEMIGKFSVS-PPSYTSATESNLGLVRVATQAQVAAGAVHDG-YAV
Miro2p12 --TDETTAVTPKRVMEMIGKFSVS-PPSYTSATESNLGLVRVATQAQVAAGAVHDG-YAV
44RR2 --TDDATMTPLKTKLAIQALSQ----AWGTATESARGVVQMATVAQALQGTLRDG-FAI
PHG31p12 --TDDATMTPLKTKLAIQALSQ----AWGTATESARGVVQMATVAQALQGTLRDG-FAI
AehI p12 --VDDTTAMTPAKVKAIDTFAVT---SVSGATEVTGTGVKNSPALITNAALHTG--YAV
KVP40p12 GTLSTTVAMTPQRVKEMLDVWANT---TASDASETTKGLIRLANGTEVNSTLATEDNLAI

K3p12 SPYTFMNSSATEEYKGVIKLGTQSEVNSNN-ASVAVTGATLNGRGSTTSMRGVVRLTTTA
T2p12 SPYTFMNSTATEEYKGVIKLGTQSEVNSNN-ASVAVTGATLNGRGSTTSMRGVVRLTTTA
T4p12 SPYTFMNSSSTEYKGVIKLGTQSEVNSNN-ASVAVTGATLNGRGSTTSMRGVVRLTTTA
RB32-33 SPYTFMNSVATQEYKGVIRLGTQSEINSL-GDVAVTGETLNGRGATSSMRGVVRLTTQA
AR1p12 SPYTFMNSVATQEYKGVIRLGTQSEINSL-GDVAVTGGTLNNGRGATGSMRGVVRLTTQA
PP01p12 SPYTFMNSVATQEYKGVIRLGTQSEINSL-GDVAVTGETLNGRGATGSMRGVVRLTTQA
RB69 SPYTFMNSVATQEYKGVIRLGTQAEINSL-GDVAVTGETLNGRGATGSMRGVVRLTTQA
Eff04_p12 SPYTFIRLTATESNLGVIRIASQTEANAGTDDTKAITAKKLINTRATGSQFGVVKLATTV
RB43p12 SPYTFIRLNATESDLGIVRLASQAEVNAAGTDDTKAVTPLKLANLKGSGGSFGLVKLSTEV
RB49p12 SPYAFANARANENQAGTVKIASQSOMNAGSDDTVVVS AKKFASTKATTSOYGVIKLRDVT
Miro1p12 TPKTFMASKASDSVFGIVKFAKSDVASATSNLAVTPKSLQALKSTKDKYGLTRLGSGSP
Miro2p12 SPYTLKSMAGTESAAGMFKIASNSQILALADNTVVVTPAKLDILKATASQLGLVKLSGVS
44RR2 SPYTLKSMAGTESAAGMFKIASNSQILALADNTVVVTPAKLDILKATASQLGLVKLSGVS
PHG31p12 SPYTLKSMAGTESAAGMFKIASNSQILALADNTVVVTPAKLDILKATASQLGLVKLSGVS
AehI p12 TPKGFIETRAAQARVGTVRMATQAEANARTLGDVAISPATLPIASD--TOYGITALLHNA
KVP40p12 SPYRFNFRATTTRKAGFYLPDATVANARASNEHAVTVGTLNLFANSRVRGVAKIANNL

K3p12 GSQSGGDASSALAWNADV IHQRGGQTINGTLRINNTLTIASGGANITGTVNMTGGYIQGK
T2p12 GSQSGGDASSALAWNADV IHQRGGQTINGTLRINNTLTIASGGANITGTVNMTGGYIQGK
T4p12 GSQSGGDASSALAWNADV IQRGGQIIYGLTRIEDFTIANGGANITGTVRMTGGYIQGN
RB32-33 GIAPEGDSSGALAWNADVINTRGGQTINGSLNLD---HLTANGIWSRGGMWKNG---DQ
AR1p12 GIAPEGDSSGALAWNADVINTRGGQTINGSLNLD---HLTANGIWSRGGMWKNG---DQ
PP01p12 GIAPEGDSSGALAWNADVINTRGGQTINGSLNLD---HLTANGIWSRGGMWKNG---DQ
RB69 GVAPEGDSSGALAWNADVINTRGGQTINGSLNLD---HLTANGIWSRGGMWKNG---DQ
Eff04_p12 GY----VANTALSSNAYVLP SDR-----SAVINGSLYEYS AIHNN-----K
RB43p12 NAG---LANTALSAGANVVP SNRD-----SAITGGALYQGSVAAN-----K
RB49p12 GS---EANAALSANAKVLPSTG-----GTVSGNVYKGSNSDGN-----Q
Miro1p12 TT---DASLAAAATDAVFKTRK-----INGKTLDNNDITITNNDINCYTR
Miro2p12 TT---DASLAAAATDAVFKTRR-----INGKTLDNNDITITNNDINCYTR
44RR2 TA---AANTALAASAPVLYTSGG-----IITGDVFTFTGNMQGIQWSRNTD
PHG31p12 TA---AANTALAASAPVLYTSGG-----IITGDVFTFTGNMQGIQWSRNTD
AehI p12 QSG---VTNKALSAHGATLFINR-----NGDSMTGDLTVHNI FTANGQNGRGD
KVP40p12 TTN---DPLQALSAAAMGYKLNNEK-----IGDAGGTVTGLKINNVSQVGGTQLMNT

FIG. 11 C

K3p12 RVTQNEIDRTI PVGAIMMWAADSLPSDAWRFCGGTVSASDCPLYASRIGTRYGGSSSN
T2p12 RVTQNEIDRTI PVGAIMMWAADSLPSDAWRFCGGTVSASDCPLYASRIGTRYGGTSSN
T4p12 RIVTQNEIDRTI PVGAIMMWAADSLPSDAWRFCGGTVSASDCPLYASRIGTRYGGNPSN
RB32-33 PVATERYASERVPGTIMMFAGDSAP-PGWIMCHGGTVSGDQYPDYRNTVGARFGGDWNN
AR1p12 PVATERYASERVPGTIMMFAGDSAP-PGWIMCHGGTVSGDQYPDYRNTVGARFGGDWNN
PP01p12 PVATERYASERVPGTIMMFAGDSAP-PGWIMCHGGTVSGDQYPDYRNTVGARFGGDWNN
RB69 PVATERYASERVPGTIQMFAGDSAP-PGWVLCGGTISGDQFPDYRNVVGARFGGDWNN
Eff04_p12 YQWTDLDWH-FPVGAI VMTGFQTDH-GSLYICDGRSLNKNNYPLLFERIGYTFGGGGDW
RB43p12 YQTHSDIEAS-LPIGCMMAAFNSDY-GNLCIANGRGMITYEYPEL FALIGYTYGGSGNI
RB49p12 FVTKNELANHAMP IGGI ILSGFNADR-GDFLICNGRSLNKNNYPLL FSAIGYTFGGSGDN
Miro1p12 QESDGRYMPAGTRVGNVTWVEGQSWISRGATFTCNAPWEASSRLALNVNVKFERNNDG YD
Miro2p12 QESDGRYMPAGTRVGNVTWVEGQSWISRGATFTCNAPWEASSRLALNVNVKFERNNDG YD
44RR2 MAHIVFKNDSNADSN S FMQFCVGDNNNEYFRWVN--RFSGSDN----IMATLRPGGHMWL
PHG31p12 MAHIVFKNDSNADSN S FMQFCVGDNNNEYFRWVN--RFSGSDN----IMATLRPGGHMWL
Aeh1p12 SLTRKDYVDGLFNQ-KANISHTHGT PQESWTLIWQGPLDRGNF----VTNQPPWNF DALV
KVP40p12 GLIESQAMLNMYPVGSVYMSLVSTSPATLFGGTWARLAQGRVL----VSEGSYGGRTFAV

K3p12 PGLPDMRGLFVRGSGRGSHTLTPNVNGNDQFGKPR LGVCTGGYVGEVQKQMSYHKHAG
T2p12 PGLPDMRGLFVRGSGRGSHTLTPNVNGNDQFGKPR LGVCTGGYVGEVQKQMSYHKHAG
T4p12 PGLPDMRGLFVRGSGRGSHTLTPNVNGNDQFGKPR LGVCTGGYVGEVQIQMSYHKHAG
RB32-33 PGI PDMRGLFVRGAGTGSHILNQ--RGQDGYGKDR LGVCGDGMHVGGVQAQQMSYHKHAG
AR1p12 PGI PDMRGLFVRGAGTGSHILNQ--RGQDGYGKDR LGVCGDGMHVGGVQAQQMSYHKHAG
PP01p12 PGI PDMRGLFVRGAGTGXHILNQ--RGQDGYGKDR LGVCGDGMHVGGVQAQQISYHKHAG
RB69 PGI PDMRGLFVRGAGTGSHILNN--RGQDGYGKDR LGVCGDGMHVGGVQAQQMSYHKHAG
Eff04_p12 FNI PDCRGVAVRGHDRGRGLNPN--RGYGT YEGDMLG-----WHEHPLQLIYQ--NGG
RB43p12 FNL PDMRGVAVRGFDAGRGLDPG--RGFGTYQHHEVQ-----SHEHPLQMIYQ--SGG
RB49p12 FNL PDMRGLVARGCDHGRNLDPG--RRFGSYQEDAMQR-----ITGKFPVADRWRGWYGG
Miro1p12 NRIFRFV-VIVNGSQWGGELTLN-----IENKGGRNHSHW
Miro2p12 NRIFRFV-VIVNGSQWGGELTLN-----IENKGGRNHSHW
44RR2 AGNIDVNDFYIRSDRRLKHGFKPIENALDKIDLLNPG-----TYHKQYSLTDDRIV
PHG31p12 AGNIDVNDFYIRSDRRLKHGFKPIENALDKIDLLNPG-----TYHKQYSLTDDRIV
Aeh1p12 IESSRDGGSWFNTMEISRWQIEQ-----MQAKYPN---
KVP40p12 RQTGGEYEVQLTEATI PAHKHAG-----WGEHYDNGNI

K3p12 GFGEW---DDSGAFGNTRRSNFVGT RKGLDWDRSYFTNDGYEIDPASQRNSRYTLNRPE
T2p12 GFGEY---DDSGAFGNTRRSNFVGT RKGLDWDRSYFTNDGYEIDPASQRNSRYTLNRPE
T4p12 GFGEH---DDLGAFGNTRRSNFVGT RKGLDWDRSYFTNDGYEIDPESQRNSKYTLNRPE
RB32-33 GWGEY--QRHEAPFGASVYQGYLGRKYS DWDNASYFTNDGFELG--GPRDALGTLNREG
AR1p12 GWGEY--NRSEGPFGASVYQGYLGRKYS DWDNASYFTNDGFELG--GPRDALGTLNREG
PP01p12 AWGENGNRGYAPFGASNGSGYLGNGRSADWNHLFF TNDGFEMG--GPRDSFGTLNREG
RB69 GWGEF--QRHEAPFGASVYQGYLGRKYS DWDNASYFTNDGFELG--GHRDATGTLNREG
Eff04_p12 NIPKW-----QAVYELKSAEKNDQ SARVFDASITKATGVG-----
RB43p12 NLP SW-----QCVYELRTAEKNDQQLYWPDP SLSKAMAVG-----
RB49p12 AFTAQ-----RGQWSTNYKNGGGDDWGT TVNFDSGRSVRT-----
Miro1p12 RFEAY-----ASSNFFFNIPPNATVQIRPTEDS-----
Miro2p12 RFEAY-----ASSNFFFNIPPNATVQIRPTEDS-----
44RR2 GLEAG-----IFAQDFQKAMPEGVRSLEDGTLTVSPMG-----AIA
PHG31p12 GLEAG-----IFAQDFQKAMPEGVRSLEDGTLTVSPMG-----AIA
Aeh1p12 -FNLVS-----AQEYYWFGKFRADG--MYFDT-----
KVP40p12 GFGVAK-----QYGRNNPGRSRTDS DNYLYTSPVGGNQ-----

FIG.11 D

K3p12	LIGNETRPWNISLNYIIKVKE
T2p12	LIGNETRPWNISLNYIIKVKE
T4p12	LIGNETRPWNISLNYIIKVKE
RB32-33	LIGYETRPWNISLNYIIKIHY
AR1p12	LIGYETRPWNISLNYIIKIHY
PP01p12	LIGYETRPWNISLNYIIKIHY
RB69	LIGYETRPWNISLNYIIKVHY
Eff04_p12	--GEETRMKNIALNYVIRVL-
RB43p12	--GNETRMKNLAINYVIRVR-
RB49p12	--ANETRVKSLALNYIIRVR-
Mirolp12	----RIIFYDCMLTFCNRP-
Miro2p12	----RIIFYDCMLTFCNRP-
44RR2	FLIQCNKELKARLEKLEGIK-
PHG31p12	FLIQCNKELKARLEKLEGIK-
AehIp12	---HTENCYLWRIYGVNKTWS
KVP40p12	--AHNNVQPYTYVMWERTA-

Fig.12

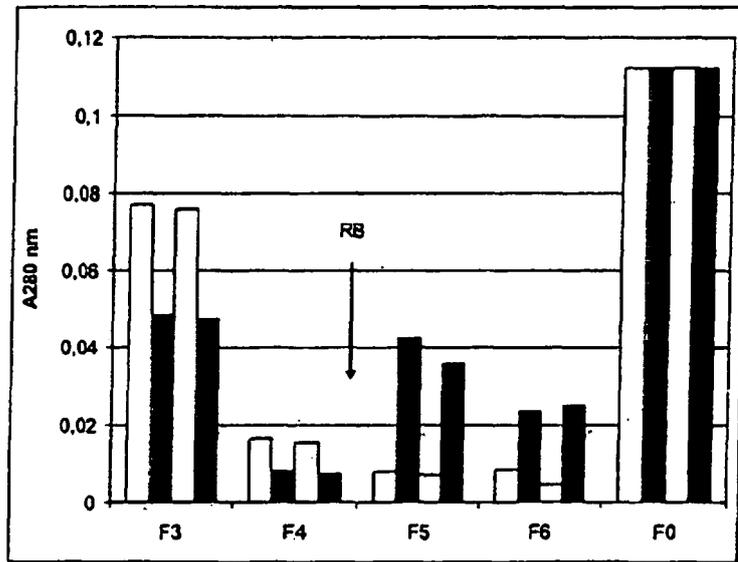


Fig. 13

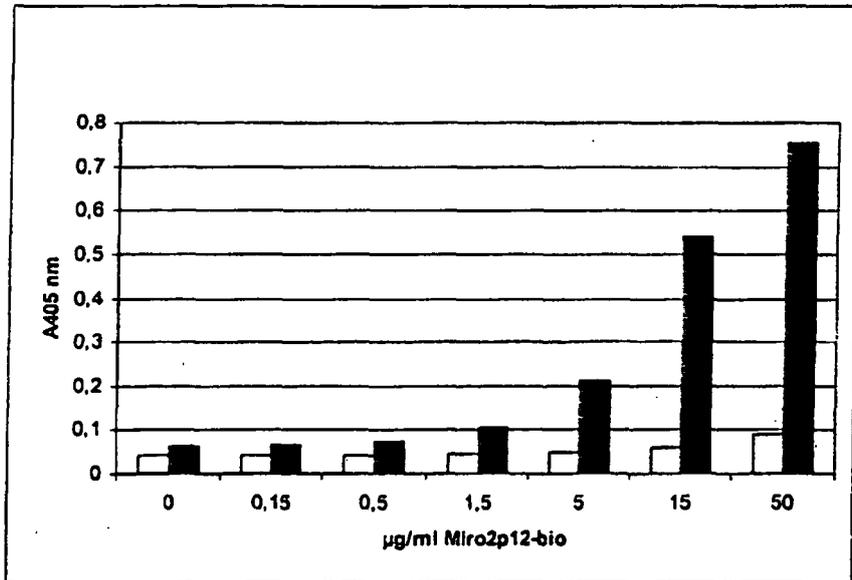


Fig. 14

