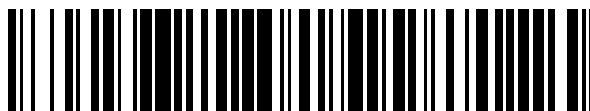


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 280**

21 Número de solicitud: 201130235

51 Int. Cl.:
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **23.02.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
19.09.2012

71 Solicitante/s:
**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA**
Edificio Emprendia-Campus Vida
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

72 Inventor/es:
**DOMÍNGUEZ GERPE, M^a LOURDES y
FERRO GALLEGO, PEDRO EMILIO**

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

54 Título: **pTOP: NUEVO VECTOR DE EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.**

57 Resumen:

pTOP: Nuevo vector de expresión y purificación de proteínas.

La presente invención se refiere a (1) un nuevo vector de expresión génica que permite el marcaje, la expresión y la purificación de proteínas, (2) al método de expresión y purificación proteica asociado a este vector y (3) a un kit que comprende dicho vector.

ES 2 387 280 A1

DESCRIPCIÓN**pTOP: NUEVO VECTOR DE EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

La presente invención pertenece al campo de la Biología Molecular, la Genética y la Biotecnología. La presente invención se refiere a (1) un nuevo vector de expresión génica que permite el marcaje, la expresión y la purificación de proteínas, (2) al método de expresión y purificación proteica asociado a este vector y (3) a un kit que comprende dicho vector.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Existen en el mercado numerosos ejemplos de vectores de expresión, entre los que están los vectores pGEX de GE Healthcare Life Sciences o los vectores pBAD de Invitrogen. En estas dos series de vectores la clonación del gen de interés puede llevarse a cabo por restricción. Además, hay vectores pBAD comerciales preparados para clonar mediante el uso de topoisomerasa, o usando vectores donantes para recombinación con vectores pBAD de entrada mediante la tecnología de recombinación Gateway. Ambos sistemas permiten controlar la expresión del gen de interés gracias a dos operones, el operón *lac* (de lactosa) que se induce en presencia de lactosa o también de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido, un análogo de la lactosa pero más ventajoso porque sus niveles se mantienen debido a que no se degrada durante el cultivo celular) en cultivos de células transformadas con pGEX, y el operón *ara* (de arabinosa) que se induce mediante la adición de arabinosa en cultivos de células transformadas con pBAD. Además, ambos sistemas permiten el marcaje y la obtención de las proteínas con distintos marcadores, como son la fusión con la GST (Glutación S-transferasa), la tiorredoxina, una cadena de 6 histidinas, el epítipo V5 (la forma larga consta de 14 aminoácidos y la corta de 9 aminoácidos y derivan del epítipo Pk presente en las proteínas P y V del paramixovirus del virus 5 de simio (SV5)), o el epítipo myc (de 10 aminoácidos y es parte de la secuencia del factor de transcripción c-myc humano), que facilitan tanto la detección como la purificación de la proteína expresada. Estos vectores también permiten el procesamiento de la proteína

resultante con proteasas específicas para liberar así la proteína de interés, como la proteasa Pre-Scission (proteína de fusión de GST con la proteasa HRV 3C del rinovirus humano (HRV) tipo 14), la proteasa Trombina (purificada de plasma bovino) o la proteasa Factor Xa (purificado de plasma bovino), en el caso del vector pGEX, o la proteasa Enterokinasa (purificada de intestino bovino o usando la subunidad catalítica recombinante *EKMax™ Enterokinase* comercializada por Invitrogen) en el caso de pBAD.

Estos vectores permiten la obtención de la proteína de interés fusionada con un marcador o libre. Las proteínas fusionadas a los marcadores llevan, además de la correspondiente secuencia codificada por el ADN del gen de interés y de los marcadores, otros residuos aminoacídicos añadidos no pertenecientes a éstas, sino que son los codificados por las dianas de corte de las proteasas y por las dianas de restricción o los sitios de recombinación usados en la clonación. Aunque en menor número, tras liberación de las proteínas de interés por corte con las proteasas específicas, alguno de estos residuos permanece unido a su secuencia. Puesto que PreScission y Trombina solamente dejan 2 residuos después del corte, y Factor Xa y Enterokinasa cortan exactamente en el extremo C-terminal de su diana, la mayoría de los residuos remanentes después del corte se deben fundamentalmente a los codificados e introducidos por las secuencias de las dianas de restricción y/o de los sitios específicos necesarios para la clonación.

El vector p-CAL-n-FLAG de Stratagene es otro ejemplo de vector de expresión que permite la obtención de una proteína de fusión con distintos elementos, que consisten en el péptido CBP (del inglés "*calmodulin-binding peptide*" o péptido de unión a calmodulina), la secuencia aminoacídica diana de la proteasa Trombina, el marcador FLAG (epítipo de 8 aminoácidos no natural diseñado específicamente como marcador de proteínas) y la secuencia aminoacídica diana de la proteasa Enterokinasa, situándose todos estos elementos en el extremo amino terminal de la proteína de interés. El gen de interés se clona por un método LIC ("*ligation independent cloning*"), que a

diferencia de otros métodos usados en la clonación en pGEX y en pBAD, evita la adición de residuos extra provenientes de la etapa de clonación a la proteína de interés. Los elementos que presenta la proteína de fusión resultante de la expresión en el vector p-CAL-n-FLAG tienen distintas utilidades: el CBP permite la purificación por afinidad de la proteína de fusión en una resina de calmodulina. Por otro lado, el marcador FLAG es un epítipo reconocido por anticuerpos específicos, que permite también el atrapado de la proteína de fusión, bien para su purificación o por ejemplo para el estudio de interacciones proteína-proteína o proteína-ADN mediante inmunoprecipitación o inmunoprecipitación de cromatina. Es conveniente liberar la proteína así obtenida del marcador CBP mediante corte con la proteasa Trombina, ya que en este tipo de estudios de inmunoprecipitación la presencia del CBP puede ser contraproducente, pues puede unirse inespecíficamente a muchas proteínas celulares de unión a calmodulina, por lo que es conveniente quitarlo para obtener la proteína de interés fusionada únicamente al marcador FLAG y a la diana de la Enterokinasa.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un nuevo vector, llamado pTOP (Figuras 1 y 2), para la expresión génica y purificación de proteínas basado en una secuencia nucleotídica que contiene diferentes elementos. Este vector permite el marcaje de la proteína de interés con distintas etiquetas o marcadores, que facilitan su manipulación y purificación, y permite también la obtención de la proteína de interés en distintas formas: fusionada con varios marcadores, con un único marcador o la proteína pura, sin ningún aminoácido extra (Figura 3).

Más concretamente, el vector de expresión de la invención permite la obtención de una proteína de fusión con tres marcadores y dos secuencias diana de proteasas dispuestos de tal forma que la proteína de interés puede ser purificada fusionada con todos estos elementos, con un único marcador o

simplemente la secuencia de la proteína de interés (Figura 3), en una única etapa o en varias etapas de forma secuencial.

5 Los marcadores de la proteína de fusión que se obtiene gracias al vector de expresión de la invención presentan varias ventajas, como son que permiten la purificación de la proteína de fusión por afinidad en distintos tipos de sistemas, lo cual aumenta la versatilidad del método de purificación y lo hace por tanto más eficiente. La proteína de fusión lleva la GST y, por tanto, puede ser purificada mediante afinidad por glutatión o mediante inmunoprecipitación, ya
10 que hay anticuerpos específicos contra GST. Además, la proteína de fusión lleva dos epítomos polihistidina, lo cual permite su purificación mediante afinidad por metales como el níquel o el cobalto, o mediante inmunoprecipitación, ya que hay anticuerpos específicos contra epítomos polihistidina. El hecho de que la proteína lleve dos epítomos polihistidina en
15 lugar de uno, como ocurre en otros casos del estado de la técnica, permite que la purificación sea más eficiente, ya que la proteína se une con más afinidad al metal y esto permite que se puedan realizar más lavados y de mayor astringencia para eliminar selectivamente otras proteínas celulares no deseadas que también presentan afinidad por el metal.

20

Otra ventaja de la proteína de fusión obtenida mediante el vector pTOP de expresión de la invención es que puede ser purificada de distintas formas y en etapas sucesivas, como podría ser una primera purificación de la proteína de fusión conteniendo todos los elementos en una columna de níquel y elución
25 con imidazol, una segunda purificación en una columna de glutatión, que puede ir seguida del procesamiento de la proteína con la proteasa PreScission para liberarla de la GST y de la primera polihistidina y, a continuación, una tercera purificación por afinidad mediante anticuerpos contra la segunda polihistidina.

30 El vector del primer aspecto de la invención presenta además la ventaja de que comprende un elemento que permite el control de la expresión de la proteína

de interés mediante la adición de una sustancia, es decir, presenta un promotor inducible.

5 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un nuevo método para la expresión génica y purificación de proteínas que emplea el vector del primer aspecto de la invención. Gracias a las características del vector del primer aspecto de la invención, la purificación de la proteína expresada mediante dicho vector es muy flexible, ya que puede realizarse, según se desee, en una única etapa o en varias, dependiendo de las necesidades de
10 pureza o de las dificultades de obtención de cada proteína, y de si se desea purificar la proteína marcada con uno o dos marcadores para ser reconocida por anticuerpos específicos o por otras moléculas.

15 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende el vector del primer aspecto de la invención, así como las instrucciones para llevar a cabo la clonación del gen, la inducción de la expresión de la proteína correspondiente y su purificación mediante el método del segundo aspecto de la invención.

20 Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una secuencia nucleotídica que comprende los siguientes elementos:

- a. un codón de iniciación,
- b. una secuencia nucleotídica que codifica para un marcador M,
- c. una secuencia nucleotídica que codifica para un marcador N,
- 25 d. una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica P de reconocimiento de una proteasa,
- e. una secuencia nucleotídica que codifica para un marcador O,
- f. una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica Q de reconocimiento de una proteasa,
- 30 g. un codón de terminación.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la secuencia nucleotídica comprende una secuencia que consiste esencialmente en los siguientes elementos:

- a. un codón de iniciación,
- 5 b. una secuencia nucleotídica que codifica para un marcador M,
- c. una secuencia nucleotídica que codifica para un marcador N,
- d. una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica P de reconocimiento de una proteasa,
- e. una secuencia nucleotídica que codifica para un marcador O,
- 10 f. una secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia aminoacídica Q de reconocimiento de una proteasa,
- g. un codón de terminación.

Una realización del primer aspecto de la invención puede ser una secuencia nucleotídica que consiste en los elementos (a)-(g) y que presenta alguna otra característica que no es relevante para la función del primer aspecto de la invención. Por ejemplo, una característica no relevante podría ser una región de multi-clonación (MCS del inglés "*multi cloning site*"), que consiste en la sucesión de dianas específicas de enzimas de restricción. Este elemento no sería relevante puesto que no supondría ninguna ventaja para la expresión de la proteína de interés, y además no es imprescindible para la clonación de dicha proteína de interés en la secuencia nucleotídica de la invención, puesto que existen en el estado de la técnica otras formas de clonar un fragmento de ADN.

25 En los ejemplos de la presente memoria los inventores usan un nuevo método de clonación por CiPCR (PCR inversa de clonación), que comprende una PCR clásica de amplificación del inserto y seguidamente la clonación de este mediante una CiPCR.

30 En una realización más preferida del primer aspecto de la invención, la secuencia nucleotídica comprende los elementos en el siguiente orden: (a) un

codón de iniciación; (b) una secuencia nucleotídica que codifica para un marcador M; (c) una secuencia nucleotídica que codifica para un marcador N; (d) una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica P de reconocimiento de una proteasa; (e) una secuencia nucleotídica que codifica para un marcador O; (f) una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica Q de reconocimiento de una proteasa; (g) un codón de terminación.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, los marcadores M y O son iguales. En una realización preferida del primer aspecto de la invención, los marcadores M, N y O se seleccionan de la lista que comprende: polihistidina, GST, avidina, estreptavidina, HA, VSV-G, HSVtk, FLAG, proteína de unión a maltosa, V5, myc y una proteína fluorescente. Preferiblemente, los marcadores M, N y O se seleccionan de entre polihistidina y GST. Más preferiblemente, los marcadores M y O son una polihistidina y el marcador N es la GST. Aún más preferiblemente, los marcadores M y O son una polihistidina de entre 6 y 14, preferiblemente de 10 histidinas.

El péptido marcador HA o hemaglutinina es un epítipo encontrado en el virus de la gripe humana, VSV-G pertenece a la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular, el péptido marcador HSVtk pertenece a la Timidina Kinasa del virus del herpes simple tipo 1, y los restantes se han descrito anteriormente.

El término “marcador”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un péptido marcador o proteína marcadora, que permiten la identificación de la proteína de interés cuando son producidos junto con dicha proteína como proteína de fusión. El péptido marcador o la proteína marcadora sirven para la identificación y/o la localización y/o el atrapado de la proteína de interés porque son sitios de unión a determinadas moléculas o átomos, o porque son fácilmente detectables por técnicas inmunoquímicas, tanto polihistidina, GST, avidina o estreptavidina, como HA, VSV-G, HSVtk, FLAG,

V5 o myc, o porque además son fácilmente observables por otros métodos, como ocurre con las proteínas fluorescentes.

5 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, las secuencias aminoacídicas P y Q de reconocimiento de proteasas se seleccionan de la lista que comprende las dianas de las proteasas: Pre-Scission, Enterokinasa, Trombina, Tev, HRV 3C, ULP1 y factor Xa. Preferiblemente, la secuencia aminoacídica P es la diana de reconocimiento de la proteasa Pre-Scission, y la secuencia aminoacídica Q es la diana de reconocimiento de la proteasa
10 Enterokinasa.

La proteasa Tev es una proteasa del virus del grabado del tabaco ("*Tobacco Etch Virus*"). La proteasa HRV 3C es una proteasa 3C del rinovirus humano tipo 14. La proteasa ULP1 ("*Ubl-specific protease 1*") es una proteasa de la
15 familia de las Ubls ("*ubiquitin-like proteins*"), de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. Cerevisiae*), que interviene en la ruptura de SUMO ("*small ubiquitin-like modifier*") para liberarlo de sus sustratos.

El término "proteasa", tal y como se emplea en la presente descripción, se
20 refiere a un enzima capaz de romper el enlace peptídico entre dos aminoácidos determinados dentro de una secuencia aminoacídica concreta, que es la secuencia diana (de reconocimiento) de dicha proteasa.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la secuencia
25 nucleotídica además comprende un promotor inducible. Preferiblemente, el promotor inducible se selecciona de la lista que comprende: promotor inducible por arabinosa, promotor inducible por lactosa o IPTG, promotor inducible por ecdisona, promotor inducible por tetraciclina, promotor inducible por galactosa, promotor inducible por metales pesados, promotor inducible por mifepristona,
30 promotor inducible por triptófano, promotor inducible por temperatura, promotor inducible por fosfatos y promotor inducible por metanol. Más preferiblemente, el promotor es inducible por arabinosa.

Un promotor es una secuencia de nucleótidos que controla la transcripción del gen de interés. El término “inducible”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la posibilidad de controlar la expresión de una
5 secuencia nucleotídica en el tiempo, y hace referencia a la presencia de un elemento de control. Dicho elemento de control permite activar o desactivar la expresión mediante, por ejemplo, la adición de una sustancia al medio de cultivo. Un promotor inducible por arabinosa es aquel que presenta los elementos necesarios para que la transcripción se produzca únicamente en
10 presencia de esta sustancia. Una realización del primer aspecto de la invención puede ser un promotor inducible por arabinosa que comprende el gen *araC* y el promotor pBAD del operón de arabinosa de *Escherichia coli* (*E. coli*).

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la secuencia nucleotídica además comprende al menos un origen de replicación. El origen de replicación puede ser de procariotas o de eucariotas. Preferiblemente,
15 comprende el origen de replicación del plásmido pUC.

El término “origen de replicación”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una secuencia de nucleótidos donde se forma una horquilla de replicación y donde se inicia la replicación del ADN.
20

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la secuencia nucleotídica además comprende un gen de selección. Preferiblemente, el gen de selección se escoge de la lista que comprende: un gen de resistencia a
25 antibiótico, un gen que codifica para una proteína fluorescente, un gen que codifica para una proteína luminiscente, un gen que codifica para la beta-galactosidasa y un gen que convierte a cepas auxótrofas en protótrofas. Más preferiblemente, el gen de selección es un gen de resistencia a antibiótico.
30 Preferiblemente, el antibiótico es ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, geneticina, higromicina B, puromicina, blastidina, metotrexato o zeocina. Más preferiblemente, es un gen de resistencia a ampicilina.

El término “gen de selección”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un gen que codifica para una proteína que confiere una característica distintiva al organismo en el que se expresa, como puede ser que sobreviva a la presencia de un antibiótico, que produzca una sustancia coloreada en presencia de un reactivo determinado o que emita luz. Un gen de resistencia a antibiótico codifica para una proteína que confiere a la célula que la expresa, que normalmente sería sensible al antibiótico, la capacidad de superar el efecto del antibiótico. Dicha proteína suele ser un enzima que inactiva o expulsa el antibiótico en cuestión.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la secuencia nucleotídica es SEQ ID NO: 1 o una variante bioequivalente. El término “variante bioequivalente”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una secuencia que presenta los mismos elementos que SEQ ID NO: 1 y que, aunque puede tener una secuencia ligeramente distinta, conserva las características funcionales de SEQ ID NO: 1, es decir, que las diferencias con la secuencia de SEQ ID NO: 1 no son relevantes.

Preferiblemente, la secuencia nucleotídica del primer aspecto de la invención es una construcción génica o forma parte de una construcción génica. Más preferiblemente, es una construcción génica. Una construcción génica es una molécula de ácido nucleico en la que se han dispuesto diferentes elementos de una forma específica y deseada. Estos elementos pueden ser, entre otros, secuencias de replicación, secuencias de control, secuencias codificantes, secuencias de multiclonación o secuencias de recombinación.

Preferiblemente, la secuencia nucleotídica del primer aspecto de la invención es un vector o forma parte de un vector. Más preferiblemente, es un vector. Un vector es una construcción génica o secuencia de ADN o ARN que contiene una serie de elementos funcionales, que incluyen un origen de replicación, secuencias de control, tales como, por ejemplo, elementos de control de la

traducción (como códigos de iniciación y de parada) y de la transcripción (por ejemplo, regiones de promotor-operador, sitios de unión de factores de transcripción o elementos reguladores). El vector puede incluir plásmidos bacterianos, vectores virales y otros vectores bien conocidos y documentados en el estado de la técnica. Se conoce, así mismo, una variedad de técnicas que pueden utilizarse para introducir tales vectores en células procarióticas o eucarióticas (células hospedadoras) para su expresión. Técnicas adecuadas de transformación o transfección están bien descritas en el estado de la técnica. Un replicón es por tanto cualquier elemento genético que se comporta como una unidad autónoma de replicación génica dentro de una célula; esto es, capaz de replicarse bajo su propio control. Un vector es por tanto un replicón que mediante la clonación de otro segmento polinucleótido, permite realizar la replicación y/o expresión del segmento unido. El término "secuencia de control" se refiere a secuencias de nucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias codificadoras a las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariontes, dichas secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio de unión ribosomal, y señales de terminación; en eucariotes, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores, señales de terminación, intensificadores y, en ocasiones, silenciadores. Se pretende que el término "secuencias de control" incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método de expresión génica y purificación proteica, caracterizado porque comprende una primera etapa (h):

h. Clonar un gen de interés en una secuencia nucleotídica, construcción génica o vector del primer aspecto de la invención.

30

El término "clonación", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere al proceso que permite la generación de copias de un fragmento de

ADN, como puede ser la inserción de una secuencia nucleotídica de interés en un vector que pueda ser replicado dentro de una célula. La clonación de la etapa (h) se lleva a cabo de forma que la secuencia del gen de interés queda funcionalmente unida a los elementos (a)-(g) del primer aspecto de la invención. El gen de interés se inserta entre los elementos (f) y (g), originándose una región codificadora que comprende (a), (b), (c), (d), (e), (f) y el gen de interés. Por tanto, el lugar de inserción ("i") de la secuencia de interés es exactamente el comprendido entre la secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia aminoacídica Q de reconocimiento de una proteasa y el codón de terminación, y se representa en las figuras de la presente descripción como ****---## o **i##**.

La expresión "funcionalmente unida" se refiere a que la pauta de lectura, en el proceso de traducción del código genético desde el ácido nucleico hasta la proteína, es la adecuada para que se produzca la proteína de fusión que presenta los elementos (a)-(f) en su extremo amino terminal, y a continuación la secuencia aminoacídica de la proteína de interés.

El gen de interés (representado en las figuras como "gen") es la secuencia nucleotídica de interés insertada en ****i##** (Figura 2), y que codifica para la proteína de interés. El término "proteína de interés", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a cualquier proteína cuya secuencia codificante sea conocida, esté disponible o vaya a estar disponible, de forma que pueda clonarse en un vector apropiado para su expresión en las células apropiadas o en un sistema de expresión *in vitro*.

La clonación de la secuencia de interés puede llevarse a cabo mediante los métodos de clonación descritos en el estado de la técnica. Sin embargo, no todos los métodos de clonación conocidos permiten obtener la proteína pura sin ningún aminoácido extra. Por ello, los inventores recomiendan el uso del método de clonación por CiPCR, que además de permitir obtener las diferentes variantes de la proteína de fusión (figura 3), permite también la obtención de la

proteína pura sin aminoácidos extra, y además tiene otras ventajas como son:
 1) simplificar el proceso de clonación, 2) no requerir elevados conocimientos de
 ingeniería genética, 3) evitar el laborioso diseño y realización de una estrategia
 de clonación basada en la presencia de dianas específicas de enzimas de
 5 restricción o de recombinación.

Este nuevo método de clonación por CiPCR se basa en el diseño de dos
 oligonucleótidos cebadores directo y reverso, cuyos respectivos extremos 3'
 hibridan con la secuencia del gen de interés a insertar, para su cebado y
 10 amplificación. Tras la amplificación del gen de interés con estos cebadores,
 tanto los extremos 5' como los 3' de cada uno de los amplicones obtenidos
 hibridan con cada una de las cadenas del vector pTOP en una segunda
 reacción, la CiPCR.

15 Para el diseño de estos oligonucleótidos cebadores, el oligonucleótido directo
 empieza con la secuencia 5'-cacgatgacgatgacaag-3' (SEQ ID NO: 22), y a
 continuación se añade la secuencia del cebador directo diseñado para la
 amplificación del gen de interés a clonar sin el codón de iniciación,
 obteniéndose el oligonucleótido directo completo: 5'cacgatgacgatgacaag (SEQ
 20 ID NO: 22) +secuencia-cebador-directo-gen-interés 3'. El oligonucleótido
 reverso empieza en el extremo 5' con la secuencia 5'-atgacaactccgtcttcc-3'
 (SEQ ID NO: 23) y a continuación se añade la secuencia del cebador reverso
 diseñado para la amplificación del gen de interés sin incluir el codón de parada,
 puesto que éste se incluye en la parte correspondiente a la secuencia del
 25 vector pTOP, obteniéndose el oligonucleótido reverso completo:
 5'atgacaactccgtcttcctta (SEQ ID NO: 23) +secuencia-cebador-reverso-gen-
 interés 3'.

Las dos secuencias de hibridación con el vector de los cebadores directo y
 30 reverso (SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23) corresponden a las secuencias del
 vector pTOP flanqueantes al lugar de inserción del gen a clonar **---##. En SEQ

ID NO: 1, que corresponde al vector pTOP vacío, sus extremos 3' coinciden con las posiciones 1.093 y 1.094 respectivamente.

5 En los oligonucleótidos cebadores puede ser de interés añadir mutaciones M opcionales en dos regiones:

- entre la secuencia que hibrida con el vector y la de cebado para la amplificación del gen de interés a insertar en pTOP
- dentro de las propias secuencias cebadoras diseñadas para la amplificación del gen de interés a insertar o clonar.

10

Con las primeras se puede insertar alguna nueva etiqueta, tanto en el extremo amino terminal a continuación de la diana de EK, como en el carboxilo terminal antes del codón de parada. Con las segundas se pueden introducir mutaciones M en sitios cercanos tanto al extremo amino terminal como al carboxilo terminal de la proteína de interés.

15

En una primera PCR convencional se emplean estos oligonucleótidos cebadores para amplificar la secuencia de interés desde el molde del que se disponga o para amplificarlo y mutarlo. En una segunda PCR, denominada CiPCR, se emplea como molde el vector pTOP circular y como cebadores los amplicones bicatenarios producto de la primera PCR convencional, donde cada cadena del amplicón de la primera PCR convencional hibrida por sus extremos 5' y 3' simultáneamente con la correspondiente cadena del vector pTOP y actúa de cebador (por su extremo 3') y de terminador de la elongación (por su extremo 5') en la CiPCR.

20

25

Alternativamente a los amplicones bicatenarios de la primera PCR convencional se pueden usar los amplicones bicatenarios que se obtengan tras la reamplificación de dichos amplicones con unos oligonucleótidos cebadores directo y reverso, que permiten ampliar el tamaño de la secuencia de hibridación de los extremos 5' y 3' del amplicón con la secuencia del vector pTOP en el lugar de inserción de la secuencia de interés a clonar. Dichos

30

cebadores pueden tener una longitud variable desde un mínimo de 30 hasta un máximo de 135 nucleótidos, preferiblemente de entre 30 y 50 nucleótidos.

5 La secuencia del cebador directo de reamplificación coincide con la de un fragmento del vector pTOP desde el nucleótido en la posición 1.093 de SEQ ID NO: 1, que sería el nucleótido del extremo 3' del cebador directo. Por ejemplo, un cebador directo de reamplificación para la clonación por CiPCR en pTOP de 37 nucleótidos tendría la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 20):
 10 5'tcaccatcaccatcaccatcacgatgacgatgacaag3', coincidiendo con la secuencia del vector pTOP (SEQ ID NO: 1) desde el nucleótido en la posición 1.057, que sería el nucleótido del extremo 5' del cebador directo, hasta el nucleótido en la posición 1.093, que sería el nucleótido del extremo 3' del cebador directo.

15 La secuencia del cebador reverso de reamplificación es complementaria a la de pTOP y su extremo 3' sería el nucleótido complementario al nucleótido en la posición 1.094 de SEQ ID NO: 1. Un ejemplo del cebador reverso de 40 nucleótidos podría ser (SEQ ID NO: 21):
 20 5'gcccaagcttcgaattccaatgacaactccgtcttcctta3', cuya secuencia es complementaria a la de la cadena de pTOP indicada en SEQ ID NO: 1, de forma que su extremo 3' sería el nucleótido complementario al nucleótido en la posición 1.094 y su extremo 5' sería el nucleótido complementario al de la posición 1.133 de SEQ ID NO: 1.

25 Para evitar una segunda PCR convencional de reamplificación del inserto con los cebadores arriba descritos, la pareja de cebadores diseñada para la primera PCR de amplificación del inserto pueden llevar ya unas secuencias de hibridación con el vector de mayor longitud que las descritas arriba (SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23) en sus extremos 5'.

30 El uso de amplicones con un elevado número de residuos en las secuencias de sus extremos para hibridación con el vector, obtenidas bien mediante reamplificación de los amplicones de la PCR convencional de amplificación del

inserto o usando directamente en esta oligonucleótidos cebadores con un mayor número de residuos, se puede traducir en un aumento significativo de la eficiencia de la clonación. Un estudio de las temperaturas de fusión, la formación de dímeros, y otros parámetros de los oligonucleótidos que incluyen las secuencias de hibridación con el inserto y con el vector y las mutaciones M en su caso, ayudará en la elección de la estrategia a seguir.

La CiPCR, por las características derivadas del uso de moldes circulares y secuencias cebadoras-terminadoras (cuyas propiedades derivan del diseño especial de los oligonucleótidos directo y reverso), permite 1) clonar de forma dirigida, 2) introducir inserciones entre los extremos del inserto y del vector y/o mutaciones (inserciones, deleciones o sustituciones) en los extremos del vector y/o del inserto de forma simultánea a la clonación, 3) obtener amplicones lineales complementarios pero con largos extremos cohesivos complementarios también entre sí, 4) estos amplicones, a diferencia de lo que ocurre en una PCR convencional, se caracterizan porque no pueden ser usados como moldes en la CiPCR, y porque se estabilizan mediante hibridación *in situ* dando lugar a una construcción génica tipo vector que presenta un único corte en cada una de sus dos cadenas y que llevan el inserto o el inserto y las inserciones y/o mutaciones deseadas incorporadas en el/los lugares deseados.

Las moléculas de vector molde de partida de la CiPCR se destruyen mediante una endonucleasa dependiente de metilación, y las construcciones génicas tipo vector estabilizadas en forma circular resultantes se introducen en una célula procariota, preferiblemente *E. coli*, donde las ligasas celulares unen covalentemente el corte presente en cada una de las cadenas, y permiten que el vector se replique y herede durante la división celular para su amplificación y posterior extracción, purificación y análisis del plásmido correspondiente.

30

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, después de la etapa (h) se lleva a cabo la siguiente etapa (i):

- i. Producir la proteína codificada por la secuencia clonada en la etapa (h).

5 En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, la etapa (i) comprende al menos dos subetapas:

- i'. Introducir la secuencia nucleotídica, construcción génica o vector obtenido en la etapa (h) en una célula procariota o en una célula eucariota,
- 10 i''. Cultivar la célula de la etapa (i') en presencia de las sustancias necesarias para que se exprese la proteína codificada por el gen de interés clonado en la etapa (h).

Preferiblemente, en la etapa (i') se introduce la secuencia nucleotídica, construcción génica o vector en una célula de *E. coli*. Más preferiblemente es 15 *E. coli* BL21. Preferiblemente, en la etapa (i') se introduce la secuencia nucleotídica, construcción génica o vector en una célula de levadura, una célula de insecto o una célula de mamífero. Más preferiblemente, la célula de levadura es *S. cerevisiae* o *Pichia pastoris* (*P. pastoris*). Ejemplos de células de insecto son las líneas SF9, SF21, High-5 o Mimic-SF9. Ejemplos de células de 20 mamífero son, pero sin limitarse, líneas de origen tumoral como las líneas Cos, JEG3, NCI-H460, Jurkat, PC12.

La bacteria *E. coli* pertenece al Superreino *Prokaryota*, Reino *Bacteria*, Phylum *Proteobacteria*, Clase *Gammaproteobacteria*, Orden *Enterobacteriales*, Familia 25 *Enterobacteriaceae* y Género *Escherichia*.

La levadura de cerveza *S. cerevisiae* es un hongo unicelular que pertenece al Superreino *Eukaryota*, (grupo *Metazoa/Fungi*), Reino *Fungi*, Subreino *Dikarya*, Phylum *Ascomycota*, Subphylum *Saccharomycotina*, Clase *Saccharomycetes*, 30 Orden *Saccharomycetales*, Familia *Saccharomycetaceae* y Género *Saccharomyces*.

La levadura *P. Pastoris* es un hongo unicelular que pertenece al Superreino *Eukaryota*, (grupo *Metazoa/Fungi*), Reino *Fungi*, Subreino *Dikarya*, Phylum *Ascomycota*, Subphylum *Saccharomycotina*, Clase *Saccharomycetes*, Orden *Saccharomycetales*, Familia *Saccharomycetaceae* y Género: *Pichia*.

5

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el cultivo del paso (i'') se hace en presencia de arabinosa.

10 En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, después de la etapa (i) se lleva a cabo la siguiente etapa (j):

j. purificar la proteína producida en la etapa (i).

Preferiblemente, la etapa (j) comprende al menos tres subetapas:

j'. Lisar las células cultivadas en la etapa (i'').

15 j''. Unir la proteína del lisado obtenido en la etapa (j') a un ligando inmovilizado en un soporte sólido.

j'''. Liberar la proteína de la etapa (j'') de su unión al ligando de la etapa (j'').

20 Preferiblemente, el ligando inmovilizado en un soporte sólido de la etapa (j'') es glutatión. Preferiblemente, el ligando inmovilizado en un soporte sólido de la etapa (j'') es proteína A, proteína G o un ión metálico, más preferiblemente es un ión metálico. Preferiblemente, el ión metálico es níquel (II) (Ni) y/o cobalto (II). La unión de la proteína al ligando puede ser también a través de un anticuerpo anti-polihistidina y/o un anticuerpo anti-GST que se une a los ligandos proteína A o proteína G inmovilizados en un soporte sólido, preferiblemente agarosa o sefarosa. Las etapas j'' y j''' pueden repetirse de manera secuencial, de forma que pueden emplearse distintos ligandos inmovilizados en un soporte sólido para la purificación secuencial de la proteína en distintas etapas.

25

30

El término "lisar", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la acción de romper las paredes y/o membranas celulares para liberar el contenido celular.

5 El soporte sólido en el que se inmoviliza el ligando puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una resina acrílica, bolas de agarosa o de sefarosa, virutas de hierro (Fe), que se pueden presentar en suspensión o en una columna, un cartucho, una placa, un alambre que se puede imantar o un imán, entre otros.

10 En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, la proteína se libera de su unión al ligando inmovilizado mediante al menos una de las siguientes formas: un cambio en el pH, la adición de ligando libre, la adición de una molécula que desplace a la proteína mediante competición por la unión al
15 inmovilizado mediante la adición de un compuesto químico, el procesamiento con un agente reductor, el procesamiento con una proteasa, o un cambio de pH. Preferiblemente, el compuesto químico es imidazol, el agente reductor es glutatión reducido, la proteasa se selecciona de la lista que comprende: Pre-
20 Scission, Enterokinasa, Trombina, Tev, HRV 3C, ULP1 y factor Xa. Más preferiblemente, la proteasa es Pre-Scission. También más preferiblemente, la proteasa es Enterokinasa.

25 En el caso de proteínas con al menos un marcador de polihistidina, pueden unirse a ligandos de níquel (II) y/o cobalto (II) inmovilizados, y ser liberadas por adición de imidazol, o a anticuerpos anti-polihistidina unidos a proteína A o G inmovilizada y ser liberados mediante un cambio de pH.

30 En el caso de proteínas con al menos un marcador de GST, pueden unirse a un ligando de glutatión inmovilizado y ser liberadas por adición de glutatión reducido, o a anticuerpos anti-GST unidos a proteína A o G inmovilizada y ser liberados mediante un cambio de pH.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende la secuencia nucleotídica, la construcción génica o el vector del primer aspecto de la invención para la expresión proteica y purificación proteica. Preferiblemente, el vector, denominado pTOP, contiene la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1 o una variante bioequivalente. Más preferiblemente, el vector pTOP es la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1.

En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, el kit además comprende las instrucciones para llevar a cabo el método del segundo aspecto de la invención.

En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, el kit además comprende una proteasa. Preferiblemente, la proteasa es Pre-Scission. Preferiblemente, la proteasa es Enterokinasa.

En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, el kit además comprende una pareja de oligonucleótidos cebadores de reamplificación directo y reverso de entre 30 y 100 nucleótidos, donde la secuencia del cebador directo coincide con el fragmento de SEQ ID NO: 1 cuyo extremo 3' es el nucleótido en la posición 1.093 de SEQ ID NO: 1 o el nucleótido en una posición de hasta 10 nucleótidos anterior, y donde la secuencia del cebador reverso es complementaria a SEQ ID NO: 1 de manera que su extremo 3' es el nucleótido complementario al nucleótido en la posición 1.094 de SEQ ID NO: 1 o el nucleótido en una posición de hasta 10 nucleótidos posterior.

Los cebadores directo y reverso podrían ser SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21, respectivamente.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas

y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

5

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Muestra el proceso de construcción del vector pTOP. Esquema de las etapas para la obtención de pTOP que solamente muestra la zona codificadora con los marcadores y dianas específicas de proteasas, el resto de la secuencia nucleotídica permanece inalterada durante todo el proceso. MD: mutagénesis dirigida usando el Site-directed mutagenesis Kit (Stratagene). R: clonación clásica por restricción. CiPCR: clonación por PCR inversa de clonación. ATG: codón de iniciación (a); 10H: secuencia codificadora del marcador de polihistidina (b) y (e); GST: secuencia codificadora del marcador de Glutación-S-transferasa (c); PS: secuencia diana de reconocimiento y corte por la proteasa PreScission (d); EK: secuencia diana de reconocimiento y corte por la proteasa Enterokinasa (f); **---##: sitio de inserción de la secuencia de interés a clonar; TAA: codón de terminación de la traducción (g).

20

Figura 2. Muestra el mapa del vector pTOP circular. Se muestra el sitio de inserción de la secuencia de interés a clonar y un detalle de los marcadores y elementos de fusión a la secuencia del gen de interés, así como su orden.

25

Figura 3. Muestra las tres posibles proteínas que se pueden obtener usando pTOP para su expresión y purificación. A: Proteína de interés fusionada a los tres marcadores y a las dos dianas de reconocimiento por proteasas específicas. B: Proteína de interés fusionada a un marcador y a la diana de reconocimiento por la proteasa Enterokinasa. C: Proteína de interés sin aminoácidos extra.

30

Figura 4. Muestra la obtención de la proteína PCBP1. A. *Western blot* mostrando la puesta a punto de la inducción con arabinosa de la expresión de PCBP1 en el cultivo de *E. coli* BL21 que contiene la construcción génica pTOP-PCBP1. Las condiciones óptimas de expresión de PCBP1 se obtienen a las 3 horas de inducción con arabinosa. **B.** Obtención de la proteína recombinante PCBP1 fusionada a los marcadores correspondientes, pura en disolución o inmovilizada en bolas de glutatión o de Ni. Carril 1: 10His-GST-10His-PCBP1 en disolución, carril M: marcador de peso molecular, carril 2 10His-PCBP1 en disolución, carril 3:10His-GST-10His-PCBP1 inmovilizada en bolas de glutatión.

10

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante varios ejemplos que describen las etapas para la construcción de pTOP y unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad del vector de expresión de la invención pTOP y del método asociado a dicho vector.

15

EJEMPLO 1: Construcción del vector de expresión pTOP.

20

El vector pTOP se construyó en cuatro etapas (Figura 1) a partir del plásmido pPreTOP1-Tfam (SEQ ID NO: 2), donde el gen Tfam clonado en pPreTOP1 va desde el nucleótido 365 al nucleótido 973 de SEQ ID NO: 2.

25

Etapas 1. Cambio de la secuencia de reconocimiento del enzima de restricción BamHI en la posición 359-364 del plásmido pPreTOP1-Tfam (SEQ ID NO: 2) por la del enzima de restricción Bgl II para obtener el plásmido pPreTOP2-Tfam (SEQ ID NO: 3).

30

Se llevó a cabo por mutagénesis dirigida mediante PCR en un volumen total de 50 µl usando el QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Se preparó la mezcla de reacción en frío siguiendo las instrucciones del proveedor

mediante la adición de 5 μ l de tampón 10X, 1 μ l de dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato), 125 ng de cada uno de los cebadores, 2,5 U de la polimerasa de ADN Pfu Turbo, 69 ng del plásmido pPreTOP1-Tfam y 37 μ l de agua bidestilada estéril para completar los 50 μ l totales del volumen de reacción.

El programa del termociclador PTC-200 (MJ Research) consistió en 1 ciclo a 95 °C durante 30 segundos, seguido de 12 ciclos compuestos de tres etapas, a 95 °C durante 30 segundos, a 55 °C durante 1 minuto, y a 68 °C durante 5 minutos. Tras enfriamiento en hielo durante 2 minutos se trató con 2 U de DpnI durante 2 horas a 37 °C. Seguidamente, 2 μ l de la mezcla de reacción se usaron para transformar 50 μ l de células competentes *E. coli* TOP10 (proporcionadas con el kit) por choque térmico. Después de 1 hora en agitación orbital a 200 rpm y 37 °C en un incubador-agitador se sembraron en una placa de LB-agar con ampicilina (100 μ g/ml).

Tras 24 horas de incubación a 37 °C, se inocularon dos de las colonias en un cultivo de 5 ml de medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) y se mantuvieron a 37 °C y 200 rpm durante 16 horas. Tras su enfriamiento en un baño de hielo, se extrajeron y purificaron sendos plásmidos, que se eluyeron en 50 μ l de agua bidestilada estéril y se visualizaron en un gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml). Posteriormente, se prepararon dos reacciones de 10 μ l de volumen total con cada uno de los plásmidos, respectivamente, para corte con el enzima de restricción Bgl II (Roche), según las instrucciones del proveedor. Se mantuvo a 37 °C en un termobloque durante 1 hora y tras desactivación del enzima durante 20 minutos a 65 °C en un termobloque, los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE conteniendo 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio. Como marcador de peso molecular se utilizó el 100 bp DNA Ladder (GeneCraft). Los productos se visualizaron y fotografiaron en el sistema de documentación de geles Bio-Vision con el software Vision-CAPT. Finalmente se secuenció uno de los dos plásmidos con el kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied

Biosystems) y los electroferogramas se obtuvieron en el servicio de secuenciación de la Universidad de Santiago de Compostela con el aparato 3730xl DNA Analyzer de Applied Biosystems™. Los electroferogramas fueron visualizados con el programa Chromas Lite (Copyright © 2005 Technelysium Pty Ltd), que confirmaron la obtención del plásmido pPreTOP2-Tfam.

Etapa 2. Introducción simultánea de la secuencia de reconocimiento de la proteasa Pre-Scission y de la secuencia de reconocimiento del enzima de restricción NheI en el plásmido pPreTOP2-Tfam (SEQ ID NO: 3) para obtener el plásmido pPreTOP3-Tfam (SEQ ID NO: 6).

La clonación del inserto en el vector se realizó por el método de restricción mediante corte con los enzimas de restricción Bgl II (Roche) y PvuII (New England Biolabs) y ligamiento con la T4 DNA ligasa (Promega).

Obtención del inserto

Primero se diseñaron los cebadores adecuadamente para llevar a cabo la amplificación del inserto por PCR. El cebador directo (SEQ ID NO: 4), 5'-tttt-agatct-ctggaagttctgtccaggggccc-gctagc-tttccagcatgggtagcta-3' fue dotado de una secuencia extra en el extremo 5' que contenía la secuencia diana para el enzima de restricción Bgl II, entre las posiciones 5-10 de SEQ ID NO: 4, seguida de la secuencia diana de la proteasa Pre-Scission, entre las posiciones 11-34 de SEQ ID NO: 4, y de la secuencia diana para el enzima de restricción NheI, entre las posiciones 35-40 de SEQ ID NO: 4, y en su extremo 3' se incluyó la secuencia para la hibridación con el ADN a amplificar. La secuencia del cebador inverso (SEQ ID NO: 5), 5'-catacccat-cagctg-acttggagtttag-3' hibrida en su totalidad con la correspondiente secuencia del molde, que ya contenía la secuencia para el enzima de restricción PvuII, y que ocupa las posiciones 10-15 de SEQ ID NO: 5.

5 Para un volumen total de 80 μ l de mezcla de reacción se añadieron en frío 16 μ l de tampón 5x PrimeSTAR, cebador directo e inverso 0,2 μ M cada uno, mezcla de dNTPs 0,2 mM cada uno, 200 ng del molde pPreTOP2-Tfam (SEQ ID NO: 3), 0,8 μ l de polimerasa PrimeSTAR™ HS DNA (Takara) y agua bidestilada estéril hasta completar el volumen total.

10 El programa de amplificación en un termociclador PTC-200 consistió en 1 ciclo a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos compuestos de tres etapas, a 95 °C durante 30 segundos, a 60 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 1 minuto, y un ciclo final a 72 °C durante 10 minutos. A continuación, se analizaron los productos en un gel de agarosa al 1%.

15 Tras purificación mediante corte y extracción de la banda de un gel preparativo de agarosa usando el kit High Pure PCR Product Purification (Roche), y elución con agua bidestilada estéril, se procedió a la cuantificación del fragmento amplificado por espectrofotometría en el Nanodrop 2000C. Dos μ g del amplicón puro se mezclaron en frío con 4 μ l de tampón 10x, 0,4 μ l de BSA 100x y 0,5 μ l de cada enzima de restricción Bgl II (NEB) y PvuII (NEB) y agua bidestilada estéril hasta 40 μ l de volumen total, y se incubaron a 37 °C toda la noche en un
20 termobloque. Los productos se analizaron y purificaron de nuevo por el mismo procedimiento, se cuantificaron y se almacenaron a -20 °C.

Obtención del vector lineal

25 Tres μ g del plásmido pPreTOP2-Tfam (SEQ ID NO: 3) circular puro se mezclaron en frío con 4 μ l de tampón 10x, 0,4 μ l de BSA 100x y 0,5 μ l de cada enzima de restricción Bgl II (NEB) y PvuII (NEB) y agua bidestilada estéril hasta 40 μ l de volumen total y se incubaron a 37 °C toda la noche. Los productos se extrajeron de la banda de un gel preparativo de agarosa, se purificaron
30 siguiendo el mismo protocolo que para la purificación del inserto y tras la cuantificación se almacenaron a -20 °C.

Clonación del inserto

Trescientos ng del inserto cortado se mezclaron con 30 ng del vector pPrepTOP2-Tfam (SEQ ID NO: 3) lineal, 2 µl de tampón 10x y 1 µl de T4 DNA ligasa (NEB) y agua bidestilada estéril hasta completar 20 µl. La mezcla se incubó a 16 °C toda la noche en un termociclador dentro de una cámara fría. Noventa µl de bacterias *E. coli* DH5α químicamente competentes se transformaron con 10 µl del producto de ligamiento y se sembraron en una placa de LB-agar ampicilina (100 µg/ml). Después de 24 horas se analizaron 23 colonias mediante PCR de las cuales 21 resultaron positivas. Se extrajo el plásmido de 5 ml de cultivo líquido de 2 clones con el kit GeneElute™ Plasmid Miniprep (Sigma) y tras la cuantificación por espectrofotometría se comprobó la presencia del inserto por corte con el enzima de restricción NheI (NEB) siguiendo las instrucciones del proveedor. La correcta inserción del inserto en el plásmido pPreTOP2-Tfam (SEQ ID NO: 3) se realizó mediante secuenciación directa del plásmido de uno de los clones positivos, corroborándose la obtención del plásmido pPreTOP3-Tfam (SEQ ID NO: 6).

Etapa 3. Introducción de la secuencia codificadora de Glutación S-transferasa (GST) en el plásmido pPreTOP3-Tfam (SEQ ID NO: 6) para obtener el plásmido pPreTOP4-Tfam (SEQ ID NO: 9)

La inserción de la secuencia codificadora de GST se realizó por CiPCR como método de clonación.

25

Amplificación del inserto

Para la amplificación de la secuencia de GST se utilizó como molde el vector pGEX-6P-1 (GE Healthcare). La zona codificadora para GST se extiende desde la posición +261 a la +917 y, si se incluye la secuencia codificadora de la diana de la proteasa Pre-Scission, abarca hasta la posición 941 y suma un total de 680 pares de bases, las cuales fueron amplificadas.

30

La PCR se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía 10 µl de tampón PrimeSTAR 5X, mezcla de dNTPs 0,2 mM cada uno, 0,2 µM de cada uno de los oligonucleótidos cebadores, 50 pg de plásmido pGEX-6P-1 y 1,25 U de la polimerasa PrimeSTAR™ HS DNA (Takara). Los oligonucleótidos cebadores se diseñaron con la ayuda del programa Primer Express 2.0.0 (Applied Biosystems), teniendo en cuenta la secuencia de la región del molde pGEX-6p-1 de donde se amplificó el inserto (nucleótidos 22-35 de SEQ ID NO: 7) y la de la región del vector pPreTOP3-Tfam (SEQ ID NO: 6) donde se clonó el inserto (nucleótidos 1-21 de SEQ ID NO: 7). La secuencia del cebador directo fue (SEQ ID NO: 7): 5'-catcatcatggcggcagatct-tcccctatactagg-3' y la del inverso (SEQ ID NO: 8) 5'-aaagctagc-gggcccctggaacagaacttc -3', que incluía la secuencia codificadora de la diana de la proteasa Pre-Scission (nucleótidos 1-9 de SEQ ID NO: 8). En todas las reacciones se usó como diluyente agua bidestilada estéril. Las condiciones de amplificación en el termociclador PTC-200 consistieron en 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos; 40 ciclos compuestos de tres etapas, a 98 °C durante 10 segundos, a 54 °C durante 30 segundos, y a 72 °C durante 45 segundos, y 1 ciclo final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La banda correcta se cortó con una hoja de bisturí y los fragmentos de ADN se extrajeron y purificaron con el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor, y se eluyeron con agua bidestilada estéril. A continuación, se cuantificaron por espectrofotometría en el NanoDrop 2000C y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

CiPCR para la inserción de la secuencia codificadora de GST

La CiPCR se realizó en un termociclador PTC-200 en un volumen final de 25 µl que contenía 5 µl de tampón PrimeSTAR 5X, mezcla de dNTPs 0,2 mM cada uno, 250 ng del amplicón de PCR obtenido en el apartado anterior (cuyas secuencias actuaron de cebadores (por el extremo 3'), y terminadores de la

elongación (por el extremo 5') mediante la doble hibridación de sus dos extremos con las correspondientes secuencias del vector en el lugar seleccionado para clonar el inserto), 100 ng de plásmido pPreTOP3-Tfam (SEQ ID NO: 6) y 1,25 U de polimerasa PrimeSTAR™ HS DNA (Takara). Las condiciones de amplificación de la CiPCR fueron: 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, 5 ciclos compuestos de cuatro etapas, a 95 °C durante 1 minuto, a 81 °C durante 30 segundos, a 65 °C durante 30 segundos, y a 72 °C durante 6 minutos, 1 ciclo de cuatro etapas, a 98 °C durante 30 segundos, a 81 °C durante 20 segundos, a 65 °C durante 20 segundos y a 72 °C durante 6 minutos. Seguidamente, otros 10 ciclos compuestos de cuatro etapas, a 98 °C durante 20 segundos, a 81 °C durante 15 segundos, a 65 °C durante 15 segundos y a 72 °C durante 6 minutos. Finalmente, 1 ciclo de extensión a 72 °C durante 15 minutos. Tras enfriamiento en hielo, el producto de PCR se trató con 2 U del enzima DpnI (Fermentas) durante 6 horas a 37 °C, seguido de desnaturalización por calentamiento, y tras renaturalización por enfriamiento se precipitaron los productos con acetato sódico/etanol, se secaron al aire, se diluyeron en 6 µl de agua bidestilada estéril, que se usaron para transformar por choque térmico 60 µl de células químicamente competentes *E. coli* TG-1. Tras el sembrado de las bacterias transformadas en placas de LB-agar conteniendo ampicilina (100 µg/ml), se incubaron durante 24 horas. Las colonias obtenidas se analizaron por PCR, y los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% en tampón TAE. Dos de las colonias positivas se sembraron en LB líquido conteniendo ampicilina (100 µg/ml) y se crecieron durante 16 horas. El cultivo se enfrió en hielo, se precipitaron las células por centrifugación a 3.000 x g durante 20 minutos, se decantó el sobrenadante y se extrajo el plásmido del precipitado con el kit de purificación de plásmidos GenElute (Sigma), siguiendo las instrucciones del proveedor. Se volvió a confirmar la presencia del inserto en los plásmidos por PCR y éstos se introdujeron en células químicamene competentes *E. coli* BL21 mediante transformación por choque térmico. Se seleccionaron dos colonias, que se crecieron en cultivo líquido de LB conteniendo ampicilina (100 µg/ml) durante 16 horas. A una alícuota de 0,5 ml del cultivo líquido de cada una de las dos

colonias se le añadió un 25% de glicerol estéril y se almacenaron las dos a -80 °C. Del resto del cultivo se extrajeron de nuevo los dos plásmidos para el análisis y corroboración de las secuencias por secuenciación directa del plásmido, que correspondieron a las esperadas para el plásmido pPreTOP4-Tfam (SEQ ID NO: 9).

Etapa 4. Introducción del epítipo 10 histidinas y la secuencia diana de reconocimiento por la proteasa Enterokinasa en el plásmido pPreTOP4-Tfam (SEQ ID NO: 9) para obtener el plásmido pTOP-Tfam (SEQ ID NO: 19).

La inserción del epítipo 10 histidinas (10His ó 10H) y la secuencia codificadora de la diana de corte con Enterokinasa (EK) se llevó a cabo directamente por CiPCR con los cebadores: cebador directo, (SEQ ID NO: 10) 5'-gaagttctgttccaggggcc-cacaccatcaccatcaccatcaccatcac-gatgacgatgaca ag-tttccagcatgggtagctatcca-3', que contiene la secuencia codificadora de las 10 His, entre los nucleótidos 22-51, la de la diana de EK, entre los nucleótidos 52-64, la secuencia del extremos 5', entre los nucleótidos 1-21, es la señal de terminación de la elongación por la polimerasa y la del extremo 3' es la secuencia de hibridación con el molde pPreTOP4-Tfam (SEQ ID NO: 9); el cebador inverso (SEQ ID NO: 11) con la secuencia 5'-aaagctagcggggcccctggaacagaacttc-3', hibrida en su totalidad con la zona codificadora de la diana de la proteasa Pre-Scission del molde y del inserto. El volumen final de la mezcla de CiPCR fue de 25 µl y contenía 5 µl de tampón 5X, mezcla de dNTPs 0,2 mM cada uno, 0,2 µM de cada uno de los cebadores, 100 ng de plásmido pPreTOP4-Tfam y 1,25 U de polimerasa PrimeSTAR™ HS DNA (Takara). En todas las reacciones se usó como diluyente agua bidestilada estéril. El programa de amplificación en el termociclador PTC-200 consistió en 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, 5 ciclos de amplificación compuestos de tres etapas, a 95 °C durante 1 minuto, a 70 °C durante 30 segundos, a 72 °C durante 7 minutos. Un ciclo compuesto de tres etapas, a 98 °C durante 30 segundos, a 70 °C durante 20 segundos y a 72 °C

durante 7 minutos. Continuó con 10 ciclos compuestos de tres etapas, a 98 °C durante 20 segundos, a 70 °C durante 15 segundos y a 72 °C durante 7 minutos y, por último, un ciclo final a 72 °C durante 15 minutos. Tras enfriamiento en hielo, el producto de PCR se trató con 2 U de DpnI (Fermentas) durante 6 horas a 37 °C, seguido de precipitación con acetato sódico/etanol. Tras centrifugación de las muestras en frío a velocidad máxima durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó 2 veces con 100 µl de etanol al 70% seguido de centrifugación en frío a velocidad máxima durante 20 minutos. Tras el secado completo del precipitado al aire, dicho precipitado se disolvió en 5 µl de agua bidestilada estéril. Con el producto se procedió a la transformación de 60 µl de células químicamente competentes *E. coli* TG-1 por choque térmico. Se sembró el cultivo en una placa de agar-chocolate (Becton-Dickinson) con ampicilina (200 µg/ml) y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

15

Las colonias obtenidas fueron analizadas por PCR con los cebadores (SEQ ID NO: 12) 5'-ctaggctggaagttctgttccaggggccg-3' e inverso (SEQ ID NO: 13) 5'-tttgaattc-ctttatacttgctcacagctcttt, y los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% en tampón TAE. Las colonias de nuestro interés fueron las negativas y éstas fueron preseleccionadas para un segundo análisis también por PCR con los cebadores directo (SEQ ID NO: 14) 5'-gaccaaagccatgacaaaaacg-3' e inverso (SEQ ID NO: 15) 5'-tcgacggcgctattcagatc-3'. En este caso, los amplicones de las colonias positivas del tamaño correcto (1.670 pares de bases) fueron cortados con NheI siguiendo las instrucciones del proveedor (NEB). Los plásmidos correctos eran aquellos que no se digerían con NheI. Dos de las colonias correspondientes a amplicones que no se cortaron con NheI se sembraron en LB líquido y se crecieron durante 16 horas a 37 °C con agitación orbital a 200 rpm. Los cultivos se enfriaron en hielo, se precipitaron las células por centrifugación a 3.000 x g durante 20 minutos, se decantó el sobrenadante y se extrajeron los dos plásmidos contenidos en los precipitados con el kit de purificación de plásmidos GenElute™ Plasmid Miniprep (Sigma) siguiendo las instrucciones del

30

proveedor. Se volvió a confirmar la presencia del inserto en sendos plásmidos por PCR, y se introdujeron en células químicamente competentes *E. coli* BL21 mediante transformación por choque térmico igual que anteriormente. Se seleccionaron dos colonias de una de las placas, se crecieron en cultivo líquido de LB conteniendo ampicilina (100 µg/mL), se extrajo de nuevo el plásmido y a una alícuota del cultivo líquido de cada colonia se le añadió un 25% de glicerol estéril y se almacenaron a -80 °C. Los plásmidos extraídos se purificaron y se secuenciaron, corroborándose la secuencia esperada para el plásmido pTOP-Tfam (SEQ ID NO: 19). En SEQ ID NO: 19, el codón de iniciación comprende los nucleótidos 320-322, la secuencia que codifica para el primer marcador de polihistidina comprende los nucleótidos 326-355, la secuencia que codifica para el segundo marcador GST comprende los nucleótidos 356-1.024, la secuencia que codifica para la diana de la proteasa Pre-Scission comprende los nucleótidos 1.025-1.048, la secuencia que codifica para el tercer marcador de polihistidina comprende los nucleótidos 1.049- 1.078 y la secuencia que codifica para la diana de la proteasa Enterokinasa comprende los nucleótidos 1.079-1.093.

EJEMPLO 2: Clonación en pTOP de una proteína recombinante por CiPCR: Obtención de PCBP1 (poly-C-binding protein 1) recombinante

Clonación de PCBP1 en pTOP

PCBP1 se amplificó de un ADN complementario (cDNA) obtenido por retrotranscripción con la retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen) a partir de ARN mensajero de linfocitos de sangre extraído mediante trizol (Invitrogen). Los cebadores para la PCR, fueron el cebador directo (SEQ ID NO: 16) 5'-cacgatgacgatgacaag-gatgccggtgtgactgaa-3' y el cebador inverso (SEQ ID NO: 17) 5'-atgacaactccgtcttcc-ctagctgcaccccat-3', diseñados en base a la secuencia del cDNA del transcrito PCBP1-001 ENST00000303577, cuya región codificadora contiene 1.071 pares de bases, según la base de datos Ensembl. Los extremos 3' de los oligonucleótidos cebadores (nucleótidos 19-36 de SEQ

ID NO: 16 y nucleótidos 19-35 de SEQ ID NO: 17) corresponden a la secuencia complementaria al sitio de hibridación con PCBP1. El amplicón resultante es de 1.104 pares de bases, que corresponde a la secuencia del cDNA de PCBP1 desde la posición 294 a la 1.362 (1.068 pares de bases, quedando excluido el
 5 ATG de iniciación). Las secuencias de los extremos 5', (nucleótidos 1-18 de SEQ ID NO: 16 y nucleótidos 1-18 de SEQ ID NO: 17) y sus complementarias de los extremos 3' del amplicón de 1.104 pares de bases, hibridan con el vector pTOP en los sitios **---##.

10 La PCR de amplificación de PCBP1 (inserto) se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía 10 µl de tampón PrimeSTAR 5X, mezcla de dNTPs 0,2 mM cada uno, 0,2 µM de cada uno de los cebadores, 50 ng de cDNA y 1,25 U de PrimeSTAR HS DNA polimerasa (Takara) y como diluyente agua bidestilada estéril. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador PTC-200 con el
 15 programa de 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos; 40 ciclos compuestos de tres etapas, a 98 °C durante 10 segundos, a 60 °C durante 30 segundos, y a 72 °C durante 75 segundos y 1 ciclo final a 72 °C durante 10 minutos, para obtener el amplicón de 1.104 pares de bases, que fue
 20 analizado en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE conteniendo bromuro de etidio (0,5 µl/ml en TBE) y comparándolo con el marcador de peso molecular de ADN de 1Kb de GeneCraft. Se visualizó con luz UV y fotografió en el aparato de documentación de geles Bio-Vision. Tras corte de la banda con una hoja de bisturí y purificación de los productos con el kit de purificación de productos de PCR (Roche), se eluyeron con agua bidestilada estéril y se almacenaron a -20
 25 °C hasta su utilización en la CiPCR.

En la CiPCR las secuencias de cada uno de los extremos 5' y 3' de cada una de las cadenas de los amplicones de 1.104 pares de bases anterior hibridaron con cada una de las dos secuencias complementarias de los sitios **---##
 30 correspondientes de cada cadena del vector donde se clonó PCBP1 (SEQ ID NO: 19), siendo por lo tanto, las de los extremos 3' (complementarias de las partes correspondientes de cada uno de los extremos 5' de los oligonucleótidos

cebadores directo e inverso de la primera PCR), las que actuaron de cebadores en la CiPCR, y las secuencias de los extremos 5' (aportadas directamente por los oligonucleótidos cebadores a los amplicones de 1.104 pares de bases de la primera PCR) como señales de terminación de la elongación. Para la CiPCR se preparó una mezcla de 25 µl que contenía 5 µl de tampón PrimeSTAR 5X, mezcla de dNTPs 0,2 mM cada uno, 250 ng del amplicón de PCBP1, 100 ng de plásmido pTOP-Tfam y 1,25 U de PrimeSTAR HS DNA polimerasa (Takara). Las condiciones de amplificación en el termociclador PTC200 fueron 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, 5 ciclos compuestos de cuatro etapas, a 95 °C durante 1 minuto, a 65 °C durante 30 segundos, a 52 °C durante 30 segundos, y a 72 °C durante 7,5 minutos, 1 ciclo compuesto de cuatro etapas, a 98 °C durante 30 segundos, a 65 °C durante 20 segundos, a 52 °C durante 20 segundos y a 72 °C durante 7,5 minutos, seguido de 10 ciclos compuestos de tres etapas, a 98 °C durante 20 segundos, a 80 °C durante 15 segundos y a 72 °C durante 7,5 minutos; y 1 ciclo final a 72 °C durante 15 minutos. Los productos de la CiPCR se trataron con 2 unidades de DpnI durante 6 horas a 37 °C. Después de desactivar el enzima durante 20 minutos a 80 °C, los productos se precipitaron con acetato sódico/etanol, se resuspendieron en 5 µl de agua bidestilada estéril, y se transformaron en *E. coli* TG1 para el análisis y selección de clones positivos por PCR. A continuación, dos de los clones positivos se crecieron en 5 ml de medio líquido LB con ampicilina (100 µg/ml) y se extrajeron sendos plásmidos. Se comprobó de nuevo la presencia del inserto por PCR y una alícuota de cada uno se transformó en la cepa *E. coli* BL21. Se obtuvo un cultivo de 5 ml de cada una, del que 0,5 ml se usaron para preparar las cepas con glicerol y almacenarlas a -80 °C como fuente de bacterias para futuros cultivos. Del resto del volumen de cultivo se extrajeron de nuevo los plásmidos, se comprobó la presencia del inserto por PCR y uno de los plásmidos pTOP-PCBP1 (SEQ ID NO: 18) se secuenció para corroborar que el sitio de inserción y la secuencia del gen PCBP1 y las del resto de las regiones codificadoras de las etiquetas y dianas eran correctos.

EJEMPLO 3: Optimización de las condiciones de inducción del plásmido pTOP-PCBP1 y obtención y purificación de PCBP1 recombinante fusionada con distintos elementos:

5 **3.1- Fusionada con las dos etiquetas de polihistidinas y la de Glutación S-Transferasa (10His-GST-10His-PCBP1) inmovilizada o en disolución**

3.2- Cortada con la proteasa Pre-Scission para obtener PCBP1 fusionada con la etiqueta de 10His (10His-PCBP1)

10

Optimización de las condiciones de inducción de la expresión de PCBP1 en el plásmido pTOP

15 Para la optimización de las condiciones de inducción de la expresión de PCBP1 en el plásmido pTOP se usaron las cepas de reserva de bacterias *E. coli* BL21 con el plásmido pTOP-PCBP1 (SEQ ID NO: 18) que estaban almacenadas en LB-glicerol a -80 °C. Se sembró una alícuota en una placa de LB-agar ampicilina (100 µg/ml). Una de las colonias de la placa se usó en fresco para
20 inocular 5 ml de LB en un tubo de 25 ml de capacidad que se dejó crecer durante 6 horas a 37 °C con agitación. Este cultivo fresco se usó para inocular un matraz conteniendo 100 ml de LB con ampicilina (100 µg/ml). Se dejó crecer hasta que alcanzó una densidad aproximada de 0,4 unidades de densidad óptica, medida en un espectrofotómetro Biomate3 (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 600 nm. Seguidamente, se indujo la expresión de PCBP1
25 por adición de un 0,2% de arabinosa (de una disolución estéril al 20% en agua bidestilada). Se recogieron alícuotas de 1 ml del cultivo cada hora en cubetas de plástico para espectrofotometría de 1ml, hasta transcurridas 6 horas de inducción. Se midieron sus densidades ópticas a medida que se recogieron y, a continuación, se trasvasaron los contenidos a los tubos correspondientes, que
30 se enfriaron en un baño de hielo, se centrifugaron a velocidad máxima durante 1 minuto y los precipitados se almacenaron a -80 °C. Una vez terminado el proceso, los precipitados se pasaron del congelador a un baño de hielo y se

resuspendieron en el volumen de tampón de lisis (50 mM Tris-ClH pH 7.9, 0.5M NaCl, 1mM leupeptina, 1mM PMSF y 1mM aprotinina) correspondiente, de manera que todos llevaran la misma concentración de bacterias que la muestra a tiempo 0 de inducción. A continuación, estas suspensiones celulares se

5 sonicaron en el aparato de ultrasonidos Ultrasonic Homogenizer al 50% de su capacidad durante 4 segundos 4 veces con enfriamientos de 5 segundos en hielo y seguidamente se sometieron a tres etapas de congelación (rápida en hielo seco) y descongelación en hielo. Tras centrifugación en frío a 15.000 x g

10 durante 20 minutos, se separaron los sobrenadantes de los precipitados y, después de la incubación de una alícuota igual de cada uno de los sobrenadantes con tampón de carga a 95 °C durante 2 minutos, las alíquotas se depositaron en pocillos de minigeles de poliacrilamida SDS-PAGE del 12% (37,5:1 acrilamida:bisacrilamida, Bio-Rad) de 0,75 mm de grosor, 9 cm de ancho y 7 cm de alto (Mini-PROTEAN 3, Bio-Rad). Finalizada la separación de

15 las bandas de proteínas mediante electroforesis, éstas se transfirieron a membranas de PVDF previamente activadas con metanol. La transferencia se realizó en disolución con el equipo de transferencia Mini Trans-Blot® (Bio-Rad) durante 2 horas a 60 v en frío y a continuación se procedió con el análisis de las proteínas por *Western blot*. Para ello, las membranas se lavaron con PBS

20 conteniendo 0,05% de Tween-20 (Sigma) y se dejaron bloqueando toda la noche a 4° C en PBS conteniendo 0,05% de Tween-20 y 10% de leche desnatada en polvo. Al día siguiente se lavaron 3 veces con PBS conteniendo 0,05% de Tween-20 y se incubaron con 5 ml de una dilución 1:2.500 del anticuerpo monoclonal de ratón anti-GST (Santa Cruz Biotechnology) durante 1

25 hora a temperatura ambiente. A continuación, se lavó la membrana 3 veces con PBS conteniendo 0,05% de Tween-20 y se procedió a incubar la membrana con 5 ml de una dilución 1:5.000 del anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Amersham) durante 1 hora en agitación orbital lenta a temperatura ambiente. Tras 3 lavados con PBS

30 conteniendo 0,05% de Tween-20, se procedió al revelado de las membranas mediante un ensayo de quimioluminiscencia. Para ello, se utilizó como sustrato una solución de Lumigen™ PS-3 (Amersham), siguiendo las recomendaciones

del proveedor. La membrana se incubó durante 1 minuto con el sustrato y a continuación se realizó la exposición consecutiva de varias películas radiográficas (Hyperfilm ECL, Amersham) en oscuridad, la primera durante 1 minuto en el aparato automático Curix Compact Plus, Agfa, que tras revelado permitió hacer un cálculo aproximado del tiempo de exposición necesario para obtener la señal con la intensidad satisfactoria. Las siguientes películas se expusieron inmediatamente después de haber hecho el cálculo del tiempo necesario de exposición. El resultado se muestra en el *Western blot* de la Figura 4A.

10

A continuación, se procedió al escalado del proceso para obtener PCBP1 en las cantidades requeridas para cada tipo de ensayo. Se inoculó 1 litro de LB conteniendo 100 µg/ml de ampicilina con 50 ml de un cultivo previo inoculado con las bacterias correspondientes de la reserva de cepas en glicerol a -80 °C sembradas previamente en una placa de LB-agar ampicilina (100 µg/ml). Este cultivo se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una turbidez de 0,4 unidades de densidad óptica a 600 nm de longitud de onda. Se le añadió un 0,2% de arabinosa y se mantuvo en cultivo durante 3 horas (tal como se deduce del experimento de puesta a punto, véase la Figura 4A). Seguidamente, el cultivo se enfrió en hielo, se trasvasó a los frascos correspondientes y se centrifugó a 3.000 x g durante 20 minutos en frío. Los precipitados se resuspendieron en 10 ml de tampón de lisis y se sonicaron en un aparato Ultrasonic Homogenizer al 50% de su capacidad durante 10 segundos, 10 veces con intervalos de enfriamiento de 30 segundos en hielo. Tras tres ciclos de congelación-descongelación en hielo seco y hielo se centrifugó en frío a 15.000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante se incubó con 200 µl de bolas de Ni-NTA (Invitrogen), lavadas previamente 3 veces con 1 ml de PBS durante 2 horas en frío y agitación orbital lenta. Tras centrifugación y decantado del sobrenadante se hicieron dos lavados del precipitado con tampón de lisis conteniendo un 1% de tritón X-100 (Sigma) mediante incubación de 5 minutos con agitación orbital lenta en frío, otros dos con tampón de lisis, y otros dos con tampón de lisis conteniendo 50 mM de

30

imidazol. Las centrifugaciones entre lavados se hicieron en frío a 2.000 x g durante 2 minutos. Seguidamente, se le añadieron 200 µl de tampón de lisis conteniendo 1M de imidazol, se agitó durante 5 minutos en frío y agitación rotatoria lenta para su elución de las bolas. Tras una nueva centrifugación, se trasvasó el sobrenadante a otro tubo y el proceso se repitió una segunda vez. Una vez juntados los dos volúmenes de sobrenadante conteniendo la proteína eluida, se almacenó una alícuota de 10 µl en frío (que contiene 10His-GST-10His-PCBP1, Figura 4B carril 1), y al resto se le añadieron PBS frío hasta completar 1ml y 150 µl de glutatión inmovilizado en bolas (Amersham Biosciences), lavadas previamente 3 veces con 1 ml de PBS frío. Tras la incubación en frío con agitación orbital lenta durante 2 horas se realizaron dos lavados con tampón de lisis conteniendo 1% de tritón X-100, otros dos con tampón de lisis y otros dos con tampón de corte de la proteasa Pre-Scission (Amersham), todos mediante incubación en frío y agitación rotatoria lenta durante 5 minutos y centrifugación en frío a 2.000 x g durante 2 minutos. Tras el último lavado se le añadieron 70 µl de tampón de corte de la proteasa PreScisión al precipitado de las bolas, se almacenó una alícuota de 2 µl (que contiene 10His-GST-10His-PCBP1 unida a las bolas de glutatión, Figura 4B carril 3). La mitad se almacenó para usar en ensayos que requirieron la proteína inmovilizada en las bolas y a la otra mitad se le añadieron 35 µl de tampón de corte de la proteasa y 4 µl de proteasa Pre-Scission y la mezcla se incubó con agitación rotatoria lenta durante 48 horas recogiendo alícuotas de 65 µl cada 12 horas con reposición de nuevo tampón de corte (la proteasa Pre-Scission tiene una cola de GST por lo que permanece unida a las bolas y no es necesario reponerla). A cada alícuota se le añadió un 25% de glicerol y se almacenaron a -80 °C hasta su uso (estas alícuotas contienen 10His-PCBP1). La proteína inmovilizada en las bolas se almacenó como tal a 4 °C para su uso inmediato. El resultado puede verse en la Figura 4B.

REIVINDICACIONES

1.- Una secuencia nucleotídica que comprende los siguientes elementos:

- a. un codón de iniciación,
- 5 b. una secuencia nucleotídica que codifica para un marcador M,
- c. una secuencia nucleotídica que codifica para un marcador N,
- d. una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica P de reconocimiento de una proteasa,
- e. una secuencia nucleotídica que codifica para un marcador O,
- 10 f. una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica Q de reconocimiento de una proteasa,
- g. un codón de terminación.

2.- La secuencia nucleotídica según la reivindicación anterior que comprende una secuencia que consiste esencialmente en los siguientes elementos:

- a. un codón de iniciación,
- b. una secuencia nucleotídica que codifica para un marcador M,
- c. una secuencia nucleotídica que codifica para un marcador N,
- d. una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica P de reconocimiento de una proteasa,
- 20 e. una secuencia nucleotídica que codifica para un marcador O,
- f. una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica Q de reconocimiento de una proteasa,
- g. un codón de terminación.

25

3.- La secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende los elementos en el siguiente orden: un codón de iniciación, una secuencia nucleotídica que codifica para un marcador M, una secuencia nucleotídica que codifica para un marcador N, una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica P de reconocimiento de una proteasa, una secuencia nucleotídica que codifica para

30

un marcador O, una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica Q de reconocimiento de una proteasa, un codón de terminación.

5 4.- La secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque los marcadores M y O son iguales.

10 5.- La secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque los marcadores M, N y O se seleccionan de la lista que comprende: polihistidina, Glutación S-transferasa, avidina, estreptavidina, hemaglutinina, VSV-G, HSVtk, FLAG, proteína de unión a maltosa, V5, myc y una proteína fluorescente.

15 6.- La secuencia nucleotídica según la reivindicación anterior donde los marcadores M, N y O se seleccionan de entre polihistidina y Glutación S-transferasa.

20 7.- La secuencia nucleotídica según la reivindicación anterior donde los marcadores M y O son una polihistidina y el marcador N es la Glutación S-transferasa.

8.- La secuencia nucleotídica según la reivindicación anterior donde los marcadores M y O son una polihistidina de entre 6 y 14 histidinas, preferiblemente de 10 histidinas.

25 9.- La secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque las secuencias aminoacídicas P y Q de reconocimiento de proteasas se seleccionan de la lista que comprende las dianas de las proteasas: Pre-Scission, Enterokinasa, Trombina, Tev, HRV 3C, ULP1 y factor Xa.

30 10.- La secuencia nucleotídica según la reivindicación anterior donde la secuencia aminoacídica P es la diana de reconocimiento de la proteasa Pre-

Scission y la secuencia aminoacídica Q es la diana de reconocimiento de la proteasa Enterokinasa.

5 11.- La secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprende un promotor inducible.

10 12.- La secuencia nucleotídica según la reivindicación anterior donde el promotor inducible se selecciona de la lista que comprende: promotor inducible por arabinosa, promotor inducible por lactosa o IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido), promotor inducible por ecdisona, promotor inducible por tetraciclina, promotor inducible por galactosa, promotor inducible por metales pesados, promotor inducible por mifepristona, promotor inducible por triptófano, promotor inducible por temperatura, promotor inducible por fosfatos y promotor inducible por metanol.

15 13.- La secuencia nucleotídica según la reivindicación anterior donde el promotor es inducible por arabinosa.

20 14.- La secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprende al menos un origen de replicación.

15.- La secuencia nucleotídica según la reivindicación anterior que comprende el origen de replicación del plásmido pUC.

25 16.- La secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprende al menos un gen de selección.

30 17.- La secuencia nucleotídica según la reivindicación anterior donde el gen de selección se escoge de la lista que comprende: un gen de resistencia a antibiótico, un gen que codifica para una proteína fluorescente, un gen que codifica para una proteína luminiscente, un gen que codifica para la beta-galactosidasa y un gen que convierte a cepas auxótrofas en protótrofas.

- 18.- La secuencia nucleotídica según la reivindicación anterior donde el gen de selección es un gen de resistencia a antibiótico.
- 5 19.- La secuencia nucleotídica según la reivindicación anterior donde el gen de selección es un gen de resistencia a ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, geneticina, higromicina B, puromicina, blasticidina, metotrexato o zeocina.
- 10 20.- La secuencia nucleotídica según la reivindicación anterior donde el gen de selección es un gen de resistencia a ampicilina.
- 15 21.- La secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque es SEQ ID NO: 1 o una variante bioequivalente.
- 20 22.- La secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque es una construcción génica o forma parte de una construcción génica.
- 23.- La secuencia nucleotídica según la reivindicación anterior caracterizada porque es una construcción génica.
- 25 24.- La secuencia nucleotídica según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores caracterizada porque es un vector o forma parte de un vector.
- 25.- La secuencia nucleotídica según la reivindicación anterior caracterizada porque es un vector.
- 30 26.- Un método de expresión génica y purificación proteica caracterizado porque comprende una etapa (h):

h. Clonar un gen de interés en una secuencia nucleotídica, construcción génica o vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.

5 27.- El método según la reivindicación anterior caracterizado porque después de la etapa (h) se lleva a cabo la siguiente etapa (i):

i. Producir la proteína codificada por la secuencia clonada en la etapa (h).

10 28.- El método según la reivindicación anterior caracterizado porque la etapa (i) comprende al menos dos subetapas:

i'. Introducir la secuencia nucleotídica, construcción génica o vector obtenido en la etapa (h) en una célula procariota o en una célula eucariota,

15 i''. Cultivar la célula de la etapa (i') en presencia de las sustancias necesarias para que se exprese la proteína codificada por el gen de interés clonado en la etapa (h).

20 29.- El método según la reivindicación anterior donde en la etapa (i') se introduce la secuencia nucleotídica, construcción génica o vector en una célula procariota, preferiblemente *Escherichia coli*.

25 30.- El método según la reivindicación 28 caracterizado porque en la etapa (i') se introduce la secuencia nucleotídica, construcción génica o vector en una célula de levadura, una célula de insecto o una célula de mamífero.

31.- El método según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores donde el cultivo del paso (i'') se hace en presencia de arabinosa.

30 32.- El método según cualquiera de las cuatro reivindicaciones anteriores, que además comprende la siguiente etapa (j):

j. Purificar la proteína producida en la etapa (i).

33.- El método según la reivindicación anterior caracterizado porque la etapa (j) comprende al menos tres subetapas:

j'. Lisar las células cultivadas en la etapa (i'').

5 j''. Unir la proteína del lisado obtenido en la etapa (j') a un ligando inmovilizado en un soporte sólido.

j'''. Liberar la proteína de su unión al ligando de la etapa (j'').

34.- El método según la reivindicación anterior donde el ligando inmovilizado en un soporte sólido de la etapa (j'') es Glutati6n.

10

35.- El método según la reivindicaci6n 33 donde el ligando inmovilizado en un soporte sólido de la etapa (j'') es un i6n metálico.

36.- El método según la reivindicaci6n anterior donde el i6n metálico es níquel (II) y/o cobalto (II).

15

37.- El método según cualquiera de las cuatro reivindicaciones anteriores donde la proteína se libera de su uni6n al ligando mediante al menos una de las siguientes formas: un cambio en el pH, la adici6n de ligando libre, la adici6n de una molécula que desplace a la proteína mediante competici6n por la uni6n al ligando, el tratamiento con un agente reductor, el procesamiento con una proteasa.

20

38.- El método según la reivindicaci6n anterior donde la proteína se libera de su uni6n al ligando mediante el procesamiento con una proteasa.

25

39.- El método según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores donde la proteasa se selecciona de la lista que comprende: Pre-Scission, Enterokinasa, Trombina, Tev, HRV 3C, ULP1 y factor Xa.

30

40.- El método según la reivindicaci6n anterior que comprende la proteasa Pre-Scission.

41.- El método según la reivindicación 39 que comprende la proteasa Enterokinasa.

5 42.- El método según la reivindicación 37 donde la molécula que compite por la unión al ligando es imidazol.

43.- El método según la reivindicación 37 donde el agente reductor es glutatión reducido.

10

44.-Un kit que comprende una secuencia nucleotídica, una construcción génica o un vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 para la expresión y purificación proteica.

15

45.- El kit según la reivindicación anterior donde el vector es la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1 o una variante bioequivalente.

46.- El kit según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores donde el vector es la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1.

20

47.- El kit según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores que además comprende las instrucciones para llevar a cabo los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 43.

25

48.- El kit según cualquiera de las cuatro reivindicaciones anteriores que además comprende al menos una proteasa.

49.- El kit según la reivindicación anterior donde la proteasa es Pre-Scission.

30

50.- El kit según la reivindicación 48 donde la proteasa es Enterokinasa.

51.- El kit según cualquiera de las siete reivindicaciones anteriores que comprende una pareja de cebadores directo y reverso de entre 30 y 100 nucleótidos, donde la secuencia del cebador directo coincide con el fragmento de SEQ ID NO: 1 y cuyo extremo 3' es el nucleótido en la posición 1.093 de SEQ ID NO: 1, y donde la secuencia del cebador reverso es complementaria a SEQ ID NO: 1 de manera que su extremo 3' es el nucleótido complementario al nucleótido en la posición 1.094 de SEQ ID NO: 1.

FIG. 1

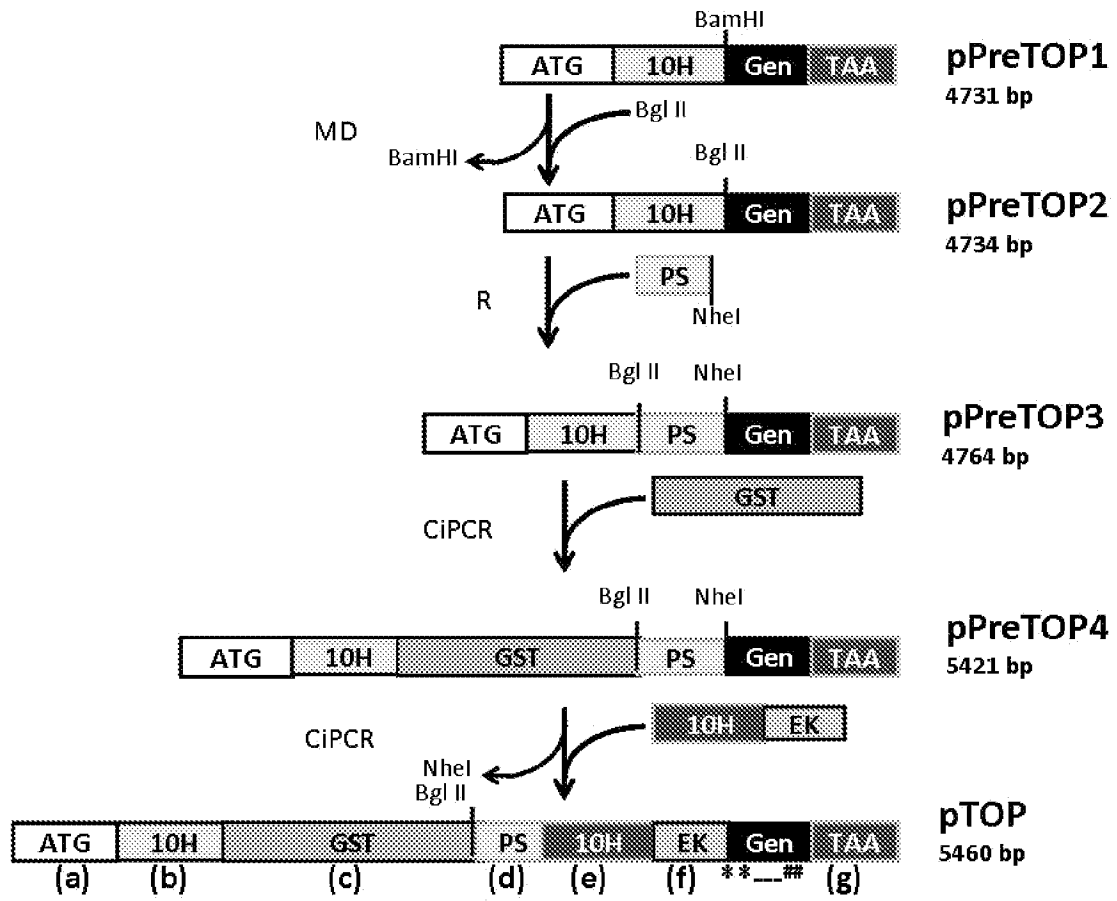


FIG. 2

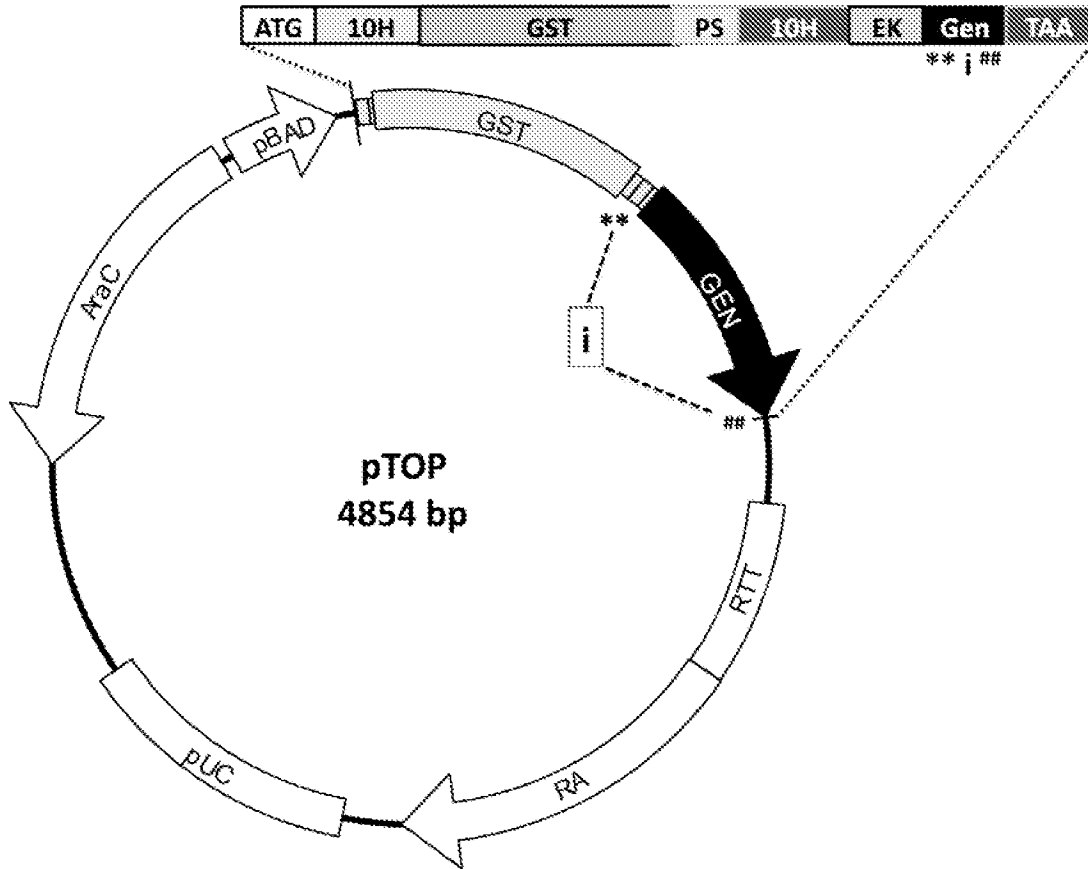


FIG. 3

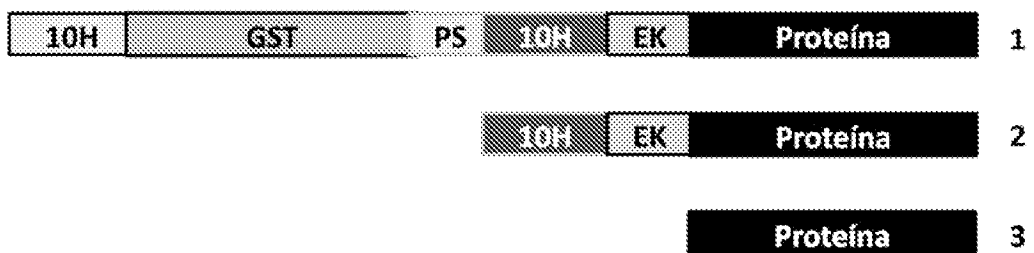
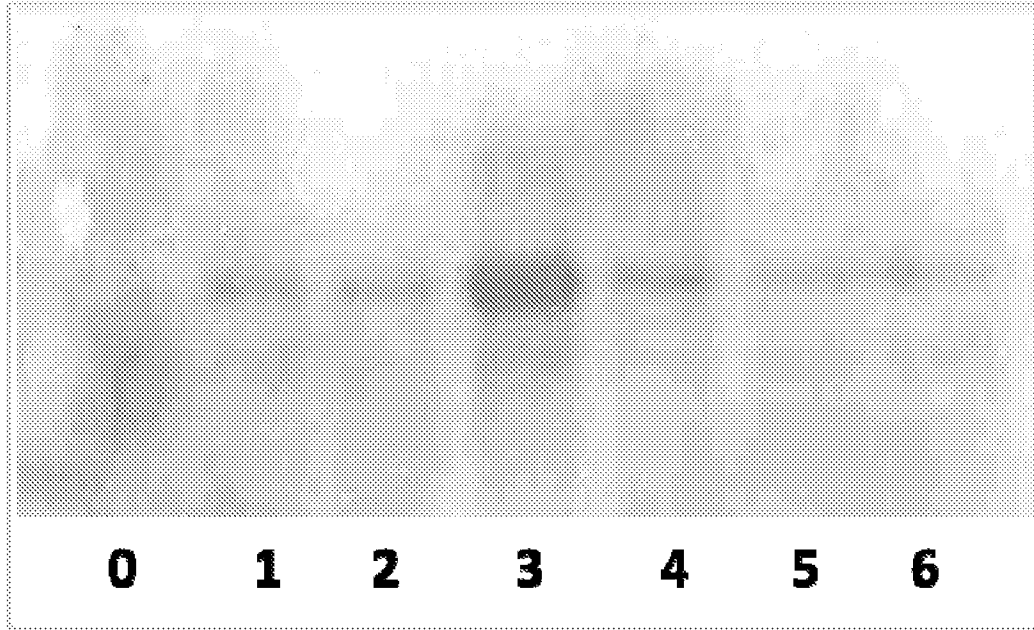
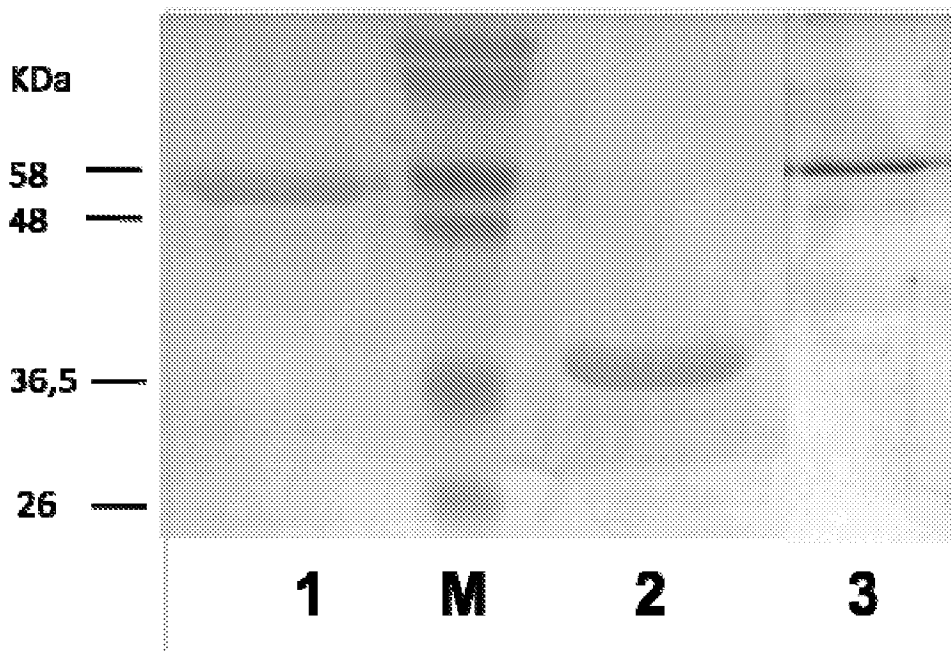


FIG. 4

A



B



ES 2 387 280 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidade de Santiago de Compostela
 <120> pTOP: Nuevo vector de expresión y purificación de proteínas
 <130> 1596.30
 <160> 23
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 4854
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Vector pTOP

<400> 1
 aagaaaccaa ttgtccatat tgcacagac attgccgtca ctgctcttt tactggctct 60
 tctcgctaac caaacggta accccgctta ttaaagcat tctgtaaca agcgggacca 120
 aagccatgac aaaaacgct acaaaagt tctataatca cggcagaaaa gtccacattg 180
 attatttgca cggcgtcaca ctttgctatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg 240
 atcctacctg acgcttttta tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg ttttttggg 300
 ctaacaggag gaattaacca tgggccacca ccatcaccac caccatcatc atcatggcgg 360
 cagatcttcc cctatactag gttattggaa aattaagggc cttgtgcaac cactcgact 420
 tcttttggaa tatcttgaag aaaaatatga agagcatttg tatgagcggc atgaaggtga 480
 taaatggcga acaaaaagt ttgaattggg tttggagttt cccaatcttc cttattatat 540
 tgatggtgat gttaaattaa cacagtctat ggccatcata cgttatatag ctgacaagca 600
 caacatggtg ggtggttgtc caaagagcg tgcagagatt tcaatgcttg aaggagcgg 660
 tttgatatt agatacggg tttcgagaat tgcataatag aaagactttg aaactctcaa 720
 agttgatatt cttagcaagc tacctgaaat gctgaaaatg ttcgaagatc gtttatgtca 780
 taaaacatat taaatggtg atcatgtaac ccatcctgac ttcattgttg atgacgctct 840
 tgatgttgtt ttatacatgg acccaatgtg cctggatgcg ttcccaaat tagtttgttt 900
 taaaaacgt attgaagcta tcccacaaat tgataagtac ttgaaatcca gcaagtatat 960
 agcatggcct ttgcagggt ggcaagccac gtttggtggt ggcgaccatc ctccaaaatc 1020
 ggatctggaa gttctgttcc aggggccccca tcaccatcac catcaccatc accatcacga 1080
 tgacgatgac aagtaaggaa gacggagttg tcattggaat tcgaagcttg ggcccgaaca 1140
 aaaactcatc tcagaagagg atctgaatag cgccgtcgac catcatcatc atcatcattg 1200
 agtttaaacy gtctccagct tggctgtttt ggcggatgag agaagatttt cagcctgata 1260
 cagattaaat cagaacgcag aagcggctctg ataaaacaga atttgcctgg cggcagtagc 1320
 gcggtggtcc cacctgacct catgccgaac tcagaagtga aacgccgtag cgccgatggt 1380
 agtgtgggggt ctcccatgc gagagtaggg aactgccagg catcaaataa aacgaaaggc 1440

ES 2 387 280 A1

tcagtcgaaa gactgggcct ttcgttttat ctgttgtttg tcggtgaacg ctctcctgag	1500
taggacaaat ccgccgggag cggatttgaa cgttgcgaag caacggcccc gaggggtggcg	1560
ggcaggacgc ccgccataaa ctgccaggca tcaaattaag cagaaggcca tcctgacgga	1620
tggccttttt gcgtttctac aaactctttt tgtttatttt tctaaataca ttcaaataatg	1680
tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt	1740
atgagtattc aacatttccg tgtcgcctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct	1800
gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca	1860
cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc	1920
gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc	1980
cgtgttgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac actattctca gaatgacttg	2040
gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta	2100
tgcaagtctg ccataacat gatgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc	2160
ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt	2220
gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg	2280
cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaa ctattaactg gcgaactact tactctagct	2340
tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc	2400
tcggccctc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccgggtga gcgtgggtct	2460
cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac	2520
acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc	2580
tactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat	2640
ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg	2700
acaaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc	2760
aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa	2820
ccaccgctac cagcgggtgg ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag	2880
gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta	2940
ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta	3000
ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag	3060
ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg	3120
gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgcacg	3180
cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag	3240
cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt atagtctctgt cgggtttcgc	3300
cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa	3360
aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg	3420
ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct	3480

ES 2 387 280 A1

gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagtgagcga ggaagcggaa 3540
 gagcgcctga tgcggtatth tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca ccgcatatgg 3600
 tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat 3660
 cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc gacaccgccc aacaccgct gacgcgcctt 3720
 gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct 3780
 gcatgtgtca gaggthttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagcag atcaattcgc 3840
 gcgcgaaggc gaagcggcat gcataatgtg cctgtcaaat ggacgaagca gggattctgc 3900
 aaaccctatg ctactccgctc aagccgtcaa ttgtctgatt cgttaccaat tatgacaact 3960
 tgacggctac atcattcact thttcttcac aaccggcacg gaactcgctc gggctggccc 4020
 cgggtgattt thtaaatacc cgcgagaaat agagttgatc gtcaaaaacca acattgcgac 4080
 cgacggtggc gataggcatc cgggtggtgc tcaaaagcag cttcgcctgg ctgatacgtt 4140
 ggtcctcgcg ccagcttaag acgctaattc ctaactgctg gcggaaaaga tgtgacagac 4200
 gcgacggcga caagcaaaca tgctgtgcca cgctggcgat atcaaaattg ctgtctgcca 4260
 ggtgatcgcg gatgtactga caagcctcgc gtaccgatt atccatcggg ggatggagcg 4320
 actcgthaat cgcttccatg cgccgcagta acaattgctc aagcagattt atcgccagca 4380
 gctccgaata gcgcccttc ccttgcccgg cgthaatgat ttgcccaaac aggtcgcctga 4440
 aatgcggctg gtgcgcttca tccgggcaaa agaaccgct attggcaaat attgacggcc 4500
 agthaaagcca thcatgccag taggcgcgcg gacgaaagta aaccactgg tgataccatt 4560
 cgcgagcctc cggatgacga ccgtagtgat gaatctctcc tggcgggaac agcaaaatat 4620
 caccggtcg gcaaaacaat tctcgtccct gattthttcac caccctga ccgcaatgg 4680
 tgagattgag aatataacct thcattcca gcggtcggtc gataaaaaaa tcgagataac 4740
 cgthggcctc aatcggcgtt aaaccgcca ccagatgggc ataaacgag tatcccgga 4800
 gcaggggatc atthtgctc tcagccatac thttcatact cccgccattc agag 4854

<210> 2
 <211> 4731
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia del plásmido pPreTOP1-Tfam

<400> 2
 aagaaaccaa ttgtccatat tgcacagac attgccgtca ctgcgtcttt tactggctct 60
 tctcgctaac caaacggta acccgctta thaaaagcat tctgtaaca agcgggacca 120
 aagccatgac aaaaacgcgt acaaaaagtg tctataatca cggcagaaaa gtccacattg 180
 attatttgca cggcgtcaca cthtgctatg ccatagcatt thtatccata agattagcgg 240
 atcctacctg acgctthtta tcgcaactct ctactgthtc tccatacccg thththtggg 300
 ctaacaggag gaattaacca tgggccacca ccatcaccac caccatcatc atcatggcgg 360

ES 2 387 280 A1

atccttttcc agcatgggta gctatccaaa gaaacctatg agttcatacc ttcgattttc 420
 cacagaacag ctacccaaat ttaaagctaa acaccagat gcaaaacttt cagaattggg 480
 taggaaaatt gcagccctgt ggagggagct accagaagca gaaaaaagg tttatgaagc 540
 tgattttaa gctgagtgga aagcatacaa agaagctgtg agcaagtata aagagcagct 600
 aactccaagt cagctgatgg gtatggagaa ggaggcccg cagagacggg taaaaaagaa 660
 agcactggta aagagaagag aattaatfff gcttggaaaa caaaaagac ctcgttcagc 720
 atataacatt tatgtatctg aaagcttcca ggaggcaaag gatgattcgg ctcagggaaa 780
 attgaagctt gtaaattgagg cttggaaaaa tctgtctcct gaggaaaagc aggcataatat 840
 tcagcttgct aaagatgata ggattcgtaa cgacaatgaa atgaagtctt ggggaagagca 900
 gatggctgaa gttggacgaa gtgatctcat ccgtcgaagt gtgaaacgat ccggagacat 960
 ctctgagcat taaggaagac ggagttgtca ttggaattcg aagcttgggc ccgaacaaaa 1020
 actcatctca gaagaggatc tgaatagcgc cgtcgaccat catcatcatc atcattgagt 1080
 ttaaacggtc tccagcttgg ctgttttggc ggatgagaga agattttcag cctgatacag 1140
 attaaatcag aacgcagaag cggctgata aaacagaatt tgcctggcgg cagtagcgcg 1200
 gtgggtcccac ctgaccccat gccgaactca gaagtgaac gccgtagcgc cgatggtagt 1260
 gtgggtctc cccatgagag agtagggaac tgccaggcat caaataaac gaaaggctca 1320
 gtcgaaagac tgggcctttc gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tcctgagtag 1380
 gacaaatccg ccgggagcgg atttgaacgt tgcgaagcaa cggcccggag ggtggcgggc 1440
 aggacgcccg ccataaactg ccaggcatca aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg 1500
 cctttttgcg tttctacaaa ctctttttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat 1560
 ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg 1620
 agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctggt 1680
 tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga 1740
 gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa 1800
 gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt 1860
 gttgacgccc ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt 1920
 gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc 1980
 agtgctgcca taaccatgag tgataaact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga 2040
 ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat 2100
 cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgac agcgtgacac cacgatgcct 2160
 gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc 2220
 cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg 2280
 gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc 2340
 ggtatcattg cagcactggg gccagatggg aagccctccc gtatcgtagt tatctacag 2400

ES 2 387 280 A1

acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca 2460
 ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta 2520
 aaacttcatt ttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc 2580
 aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa 2640
 ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca 2700
 ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta 2760
 actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc 2820
 caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacc 2880
 gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta 2940
 ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag 3000
 cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaaag cgccacgctt 3060
 cccgaagggg gaaaggcggg caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc 3120
 acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac 3180
 ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac 3240
 gccagcaacg cggccttttt acggttctctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc 3300
 tttcctgctg tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat 3360
 accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag 3420
 cgctgatgc ggtatcttct ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg catatggtgc 3480
 actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc 3540
 tacgtgactg ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgcccctgac 3600
 gggcttgtct gtccccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca 3660
 tgtgtcagag gttttaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagcagatc aattcgcgcg 3720
 cgaaggcga gcgcatgca taatgtgcct gtcaaagga cgaagcaggg attctgcaaa 3780
 ccctatgcta ctccgtcaag ccgtcaattg tctgattcgt taccaattat gacaacttga 3840
 cggctacatc attcactttt tcttcacaac cggcacggaa ctcgctcggg ctggccccgg 3900
 tgcatTTTTT aaataccgc gagaaataga gttgatcgtc aaaaccaaca ttgcgaccga 3960
 cggtgccgat aggcattccg gtggtgctca aaagcagctt cgcctggctg atacgttgg 4020
 cctcgcgcca gcttaagacg ctaatcccta actgctggcg gaaaagatgt gacagacgcg 4080
 acggcgacaa gcaaacatgc tgtgcgacgc tggcgatc aaattgctg tctgccaggt 4140
 gatcgtgat gtactgaca gcctcgcgta cccgattatc catcggtgga tggagcgact 4200
 cgtaaatcgc ttccatgcgc cgcagtaaca attgctcaag cagatttatc gccagcagct 4260
 ccgaatagc ccctcccct tgcccggcgt taatgatttg cccaacagg tcgctgaaat 4320
 gcggctggtg cgcttcatcc gggcgaaaga accccgtatt ggcaaatatt gacggccagt 4380
 taagccattc atgccagtag gcgcgcggac gaaagtaaac cactggtga taccattcgc 4440

ES 2 387 280 A1

gagcctccgg atgacgaccg tagtgatgaa tctctcctgg cggaacagc aaaatatcac 4500
 ccggtcggca aacaaattct cgtccctgat tttcaccac cccctgaccg cgaatggtga 4560
 gattgagaat ataacctttc attcccagcg gtcggtcgat aaaaaaatcg agataaccgt 4620
 tggcctcaat cggcgtaaa cccgccacca gatgggcatt aaacgagtat cccggcagca 4680
 ggggatcatt ttgcgcttca gccatacttt tcatactccc gccattcaga g 4731

<210> 3
 <211> 4734
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia de pPreTOP2-TFAM

<400> 3
 aagaaaccaa ttgtccatat tgcacagac attgccgtca ctgcgtcttt tactggctct 60
 tctcgctaac caaacggta accccgctta ttaaagcat tctgtaacaa agcgggacca 120
 aagccatgac aaaaacgctg acaaaaagtg tctataatca cggcagaaaa gtccacattg 180
 attatattgca cggcgtcaca ctttgctatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg 240
 atcctacctg acgcttttta tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg ttttttggg 300
 ctaacaggag gaattaacca tgggccacca ccatcaccac caccatcatc atcatggcgg 360
 cagatctttt tccagcatgg gtagctatcc aaagaaacct atgagttcat accttcgatt 420
 ttccacagaa cagctacca aatttaaagc taaacacca gatgcaaac tttcagaatt 480
 ggttaggaaa attgcagccc tgtggaggga gctaccagaa gcagaaaaaa aggtttatga 540
 agctgatttt aaagctgagt ggaaagcata caaagaagct gtgagcaagt ataaagagca 600
 gctaactcca agtcagctga tgggtatgga gaaggaggcc cggcagagac ggttaaaaaa 660
 gaaagcactg gtaaagagaa gagaattaat tttgcttggg aaacaaaaaa gacctcgttc 720
 agcatataac atttatgtat ctgaaagctt ccaggaggca aaggatgatt cggctcaggg 780
 aaaattgaag cttgtaaagc aggcttggaa aaatctgtct cctgaggaaa agcaggcata 840
 tattcagctt gctaaagatg ataggattcg ttacgacaat gaaatgaagt cttgggaaga 900
 gcagatggct gaagttggac gaagtgatct catccgtcga agtgtgaaac gatccggaga 960
 catctctgag cattaaggaa gacggagttg tcattggaat tcgaagcttg ggcccgaaca 1020
 aaaactcatc tcagaagagg atctgaatag cgccgtcgac catcatcatc atcatcattg 1080
 agtttaaacy gtctccagct tggctgtttt ggcggatgag agaagatttt cagcctgata 1140
 cagattaaat cagaacgcag aagcggctctg ataaaacaga atttgcctgg cggcagtagc 1200
 gcggtggtcc cacctgacc catgccgaac tcagaagtga aacgccgtag cgccgatggt 1260
 agtgtggggc ctccccatgc gagagtaggg aactgccagg catcaaataa aacgaaaggc 1320
 tcagtcgaaa gactgggcct ttcgttttat ctgttgtttg tcggtgaacg ctctcctgag 1380
 taggacaaat ccgccgggag cggatttgaa cgttgcaag caacggcccg gaggggtggcg 1440

ES 2 387 280 A1

ggaggacgc ccgccataaa ctgccaggca tcaaattaag cagaaggcca tcctgacgga 1500
 tggccttttt gcgtttctac aaactctttt tgtttatfff tctaaataca ttcaaatatg 1560
 tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt 1620
 atgagtattc aacatttccg tgtcgcctt attccctfff ttgcggcatt ttgccttctt 1680
 gtttttgctc acccagaaac gctgggtgaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca 1740
 cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc 1800
 gaagaacgtt ttcaatgat gagcactfff aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc 1860
 cgtgttgacg ccgggcaaga gcaactcggg cgcgcatac actattctca gaatgacttg 1920
 gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta 1980
 tgcaagtctg ccataacat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc 2040
 ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt 2100
 gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg 2160
 cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct 2220
 tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc 2280
 tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccgggtga gcgtgggtct 2340
 cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac 2400
 acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc 2460
 tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat 2520
 ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg 2580
 accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc 2640
 aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa 2700
 ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag 2760
 gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgta gccgtagtta 2820
 ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta 2880
 ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag 2940
 ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg 3000
 gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcggcacg 3060
 cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcaggggtcgg aacaggagag 3120
 cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatcttt atagtcctgt cgggtttcgc 3180
 cacctctgac ttgagcgtc atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa 3240
 aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctfff gctggcctff tgctcacatg 3300
 ttctttctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct 3360
 gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagttagcga ggaagcggaa 3420
 gagcgcctga tgcggtatff tctccttacg catctgtgcg gtatffcaca ccgcatatgg 3480

ES 2 387 280 A1

tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat 3540
 cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct 3600
 gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct 3660
 gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagcag atcaattcgc 3720
 gcgcgaaggc gaagcggcat gcataatgtg cctgtcaaat ggacgaagca gggattctgc 3780
 aaaccctatg ctactccgtc aagccgtaa ttgtctgatt cgttaccaat tatgacaact 3840
 tgacggctac atcattcact ttttcttcac aaccggcacg gaactcgctc gggctggccc 3900
 cggtgcattt tttaaatacc cgcgagaaat agagttgatc gtcaaaaacca acattgcgac 3960
 cgacggtggc gataggcatc cgggtggtgc tcaaaagcag cttcgcctgg ctgatacgtt 4020
 ggtcctcgcg ccagcttaag acgctaatac ctaactgctg gcggaaaaga tgtgacagac 4080
 gcgacggcga caagcaaaca tgctgtgcga cgctggcgat atcaaaaattg ctgtctgcc 4140
 ggtgatcgct gatgtactga caagcctcgc gtacccgatt atccatcggg ggatggagcg 4200
 actcgtaata cgcttccatg cgccgcagta acaattgctc aagcagattt atcgccagca 4260
 gctccgaata gcgcccttc ccttgcccgg cgtaaatgat ttgcccaaac aggtcgtgta 4320
 aatgcggctg gtgcgcttca tccgggcgaa agaaccccggt attggcaaat attgacggcc 4380
 agttaagcca ttcattgccag taggcgcgcg gacgaaagta aaccactgg tgataccatt 4440
 cgcgagcctc cggatgacga ccgtagtgat gaatctctcc tggcgggaac agcaaaatat 4500
 caccggctcg gcaaacaaat tctcgtccct gatTTTTTcac caccctga cgcgcaatgg 4560
 tgagattgag aatataacct ttcattccca gcggtcggtc gataaaaaaa tcgagataac 4620
 cgttggcctc aatcggcggtt aaaccgcca ccagatgggc attaaacgag tatcccgga 4680
 gcaggggatc attttgcgct tcagccatac ttttcatact cccgccattc agag 4734

<210> 4
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador directo para la clonación de la diana de de pre-Scission en pPRETOP2-Tfam que contiene las dianas de Bgl II y NheI

<400> 4
 ttttagatct ctggaagttc tgttccaggg gcccgctagc tttccagca tgggtagcta 60

<210> 5
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador inverso para la clonación de la diana de pre-Scission en pPRETOP2-Tfam

<400> 5
 catacccatc agctgacttg gagttag 27

ES 2 387 280 A1

<210> 6
 <211> 4764
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia del plásmido pPreTOP3-Tfam

<400> 6
 aagaaaccaa ttgtccatat tgcacagac attgccgtca ctgcgtcttt tactggctct 60
 tctcgctaac caaacggta accccgctta ttaaagcat tctgtaaca agcgggacca 120
 aagccatgac aaaaacgct acaaaaagt tctataatca cggcagaaaa gtccacattg 180
 attatttgca cggcgtcaca ctttgctatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg 240
 atcctacctg acgcttttta tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg ttttttggg 300
 ctaacaggag gaattaacca tgggccacca ccatcaccac caccatcatc atcatggcgg 360
 cagatctctg gaagttctgt tccaggggcc cgctagcttt tccagcatgg gtagctatcc 420
 aaagaaacct atgagttcat accttcgatt ttccacagaa cagctacca aatttaaagc 480
 taaacacca gatgcaaac tttcagaatt ggtaggaaa attgcagccc tgtggaggga 540
 gctaccagaa gcagaaaaaa aggtttatga agctgatttt aaagctgagt ggaaagcata 600
 caaagaagct gtgagcaagt ataaagagca gctaactcca agtcagctga tgggtatgga 660
 gaaggaggcc cggcagagac ggttaaaaaa gaaagcactg gtaaagagaa gagaattaat 720
 ttgcttggga aaacaaaaaa gacctcgttc agcatataac atttatgtat ctgaaagctt 780
 ccaggaggca aaggatgatt cggctcaggg aaaattgaag cttgtaaatg aggcttgaa 840
 aaatctgtct cctgaggaaa agcaggcata tattcagctt gctaaagatg ataggattcg 900
 ttacgacaat gaaatgaagt cttgggaaga gcagatggct gaagttggac gaagtgatct 960
 catccgtcga agtgtgaaac gatccggaga catctctgag cattaaggaa gacggagttg 1020
 tcattggaat tcgaagcttg gccccgaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgaatag 1080
 cgccgtcgac catcatcatc atcatcattg agtttaaacg gtctccagct tggctgtttt 1140
 ggcggatgag agaagatttt cagcctgata cagattaaat cagaacgcag aagcggctctg 1200
 ataaaacaga atttgcctgg cggcagtagc gcggtggtcc cacctgacct catgccgaac 1260
 tcagaagtga aacgccgtag cgccgatggt agtgtgggggt ctcccatgc gagagtaggg 1320
 aactgccagg catcaataa aacgaaaggc tcagtcgaaa gactgggcct ttcgttttat 1380
 ctgttgtttg tcggtgaacg ctctcctgag taggacaaat ccgccgggag cggatttgaa 1440
 cgttgcgaag caacggcccg gaggggtggc ggcaggacgc ccgccataaa ctgccaggca 1500
 tcaaattaag cagaaggcca tcctgacgga tggccttttt gcgtttctac aaactctttt 1560
 tgtttatfff tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa 1620
 atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgcctt 1680
 attccctfff ttgcggcatt ttgccttct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa 1740

ES 2 387 280 A1

gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac 1800
 agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt 1860
 aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtggtgacg ccgggcaaga gcaactcggg 1920
 cgccgatac actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat 1980
 cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac 2040
 actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg 2100
 cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc 2160
 ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa 2220
 ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag 2280
 gcggataaag ttgcaggacc acttctgcmc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct 2340
 gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat 2400
 ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa 2460
 cgaaatagac agatcgtga gatagtgcc tctactgatta agcattggta actgtcagac 2520
 caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc 2580
 taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc 2640
 cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc aaaggatcct cttgagatcc ttttttctg 2700
 cgcgtaatct gctgcttga aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtggg ttgtttgccg 2760
 gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 2820
 aatactgtcc ttctagtga gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 2880
 cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg 2940
 tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 3000
 acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 3060
 ctacagcgtg agctatgaga aagcgcacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat 3120
 ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc 3180
 tggatcctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 3240
 tgctcgtcag gggggcggag cctatgaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc 3300
 ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg 3360
 gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag 3420
 cgcagcagat cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcctga tgcggtatth tctccttacg 3480
 catctgtgcg gtatttcaca ccgcatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc 3540
 gcatagttaa gccagtatac actccgctat cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc 3600
 gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt 3660
 acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac 3720
 cgaaacgcgc gaggcagcag atcaattcgc gcgcgaaggc gaagcggcat gcataatgtg 3780

ES 2 387 280 A1

cctgtcaaat ggacgaagca gggattctgc aaaccctatg ctactccgtc aagccgtcaa 3840
 ttgtctgatt cgttaccaat tatgacaact tgacggctac atcattcact ttttcttcac 3900
 aaccggcacg gaactcgctc gggctggccc cgggtgcattt tttaaatacc cgcgagaaat 3960
 agagttgatc gtcaaaacca acattgacgac cgacgggtggc gataggcatc cgggtggtgc 4020
 tcaaaagcag cttgcgctgg ctgatacggt ggtcctcgcg ccagcttaag acgctaatac 4080
 ctaactgctg gcggaaaaga tgtgacagac gcgacggcga caagcaaaca tgctgtgcca 4140
 cgctggcgat atcaaaattg ctgtctgcca ggtgatcgct gatgtactga caagcctcgc 4200
 gtacccgatt atccatcggg ggtgggagcg actcgttaat cgcttccatg cgccgcagta 4260
 acaattgctc aagcagattt atcgccagca gctccgaata gcgcccttcc ccttgcccgg 4320
 cgtaaatgat ttgcccacac aggtcgctga aatgcggctg gtgagcttca tccgggagaa 4380
 agaaccccgt attggcaaat attgacggcc agttaagcca ttcattgccc taggcgcgag 4440
 gacgaaagta aaccactgg tgataccatt cgcgagcctc cggatgacga ccgtagtgat 4500
 gaatctctcc tggcgggaac agcaaaatat caccgggtcg gcaaacaaat tctcgtccct 4560
 gatttttcac caccctcga ccgcaaatgg tgagattgag aatataacct ttcattccca 4620
 gcggtcggtc gataaaaaaa tcgagataac cgttggcctc aatcggcggt aaaccgcca 4680
 ccagatgggc attaaacgag tatcccggca gcaggggatc attttgcgct tcagccatac 4740
 ttttcatact cccgccattc agag 4764

<210> 7
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador directo para la clonación de la secuencia que codifica para la GST en pPRETOP3-Tfam

<400> 7
 catcatcatg gcggcagatc ttcccctata ctagg 35

<210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador inverso para la clonación de la secuencia que codifica para la GST en pPRETOP3-Tfam

<400> 8
 aaagctagcg ggcccctgga acagaacttc 30

<210> 9
 <211> 5421
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

ES 2 387 280 A1

<223> Secuencia del plásmido pPreTOP4-Tfam

<400> 9

aagaaaccaa ttgtccatat tgcatacagac attgccgtca ctgCGTcttt tactggctct	60
tctcgctaac caaacCGGta acccCGctta ttaaaagcat tctgtaacaa agcgggacca	120
aagccatgac aaaaacgcgt acaaaaagt tctataatca cggcagaaaa gtccacattg	180
attatTTGca cggcgtcaca cTTTgctatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg	240
atcctacctg acgctTTTTa tcgcaactct ctactgTTTc tccatacccg tTTTTTggg	300
ctaacaggag gaattaacca tgggCCacca ccatcaccac caccatcatc atcatggcgg	360
cagatcttcc cctatactag gttattggaa aattaagggc cttgtgcaac ccaCTcgact	420
tctTTTggaa tatcttgaag aaaaatatga agagcatttg tatgagcgcg atgaaggtga	480
taaTggcga acaaaaagt ttgaattggg tttggagttt cccaatcttC cttattatat	540
tgatggTgat gttaaattaa cacagtctat ggccatcata cgttatatag ctgacaagca	600
caacatgTtg gTggtTgtc caaaagagcg tgcagagatt tcaatgcttg aaggagcggT	660
ttTgatatt agatacggTg tttcgagaat tgcataatag aaagactTtg aaactctcaa	720
agTtgatTTT cttagcaagc tacctgaaat gctgaaaatg ttcgaagatc gTTTatgtca	780
taaaacatat taaatggTg atcatgtaac ccatcctgac tTcatgTtGt atgacgctct	840
tgatgTtGt ttatacatgg acccaatgTg cctggatgCg tTcccaaaat tagTtTgTtT	900
taaaaaacgt attgaagcta tcccacaaat tgataagTac tTgaaatcca gcaagtatat	960
agcatggcct ttgcagggct ggcaagccac gTTTggTggT ggcgaccatc ctccaaaatc	1020
ggatctggaa gTtctgTtcc aggggcccgc tagctTTTcc agcatgggta gctatccaaa	1080
gaaacctatg agTtcatacc ttcgattTtC cacagaacag ctacccaaat tTaaagctaa	1140
acaccagat gcaaaacttt cagaattggT taggaaaatt gcagccctgt ggagggagct	1200
accagaagca gaaaaaaagg tttatgaagc tgattTTaaa gctgagTgga aagcatacaa	1260
agaagctgtg agcaagtata aagagcagct aactccaagt cagctgatgg gtatggagaa	1320
ggaggcccgg cagagacggT taaaaaagaa agcactggta aagagaagag aattaatTTT	1380
gctTggaaaa ccaaaaagac ctCGttcagc atataacatt tatgtatctg aaagcttcca	1440
ggaggcaaag gatgattcgg ctCagggaaa attgaagctt gTaaatgagg cTtggaaaaa	1500
tctgtctcct gaggaaaagc aggcataat tCagcttgct aaagatgata ggattcgtta	1560
cgacaatgaa atgaagtctt gggaagagca gatggctgaa gTtggacgaa gtgatctcat	1620
ccgtcgaagt gtgaaacgat ccggagacat ctctgagcat taaggaagac ggagTtGtca	1680
ttggaattcg aagctTggc ccgaacaaa actcatctca gaagaggatc tgaatagcgc	1740
cgTcgaccat catcatcatc atcattgagT tTaaacggTc tccagctTgg ctgTTTTggc	1800
ggatgagaga agattTtCag cctgatacag attaaatcag aacgcagaag cggTctgata	1860
aaacagaatt tgcctggcgg cagtagcgcg gtggTcccac ctgaccccat gccgaactca	1920
gaagtgaaac gccgtagcgc cgatggtagT gtggggTctc cccatgCgag agtagggaac	1980

ES 2 387 280 A1

tgccaggcat	caaataaaac	gaaaggctca	gtcgaaagac	tgggcctttc	gttttatctg	2040
ttgtttgtcg	gtgaacgctc	tcctgagtag	gacaaatccg	ccgggagcgg	atltgaacgt	2100
tgCGaagcaa	cggcccggag	ggtggcgggc	aggacgcccg	ccataaactg	ccaggcatca	2160
aattaagcag	aaggccatcc	tgacggatgg	cctttttgCG	tttctacaaa	ctctttttgt	2220
ttatlttttct	aaatacattc	aaatatgtat	ccgctcatga	gacaataacc	ctgataaatg	2280
cttcaataat	attgaaaaag	gaagagtatg	agtattcaac	atltccgtgt	cgcccttatt	2340
ccctltttttg	cggcattttg	ccttctgttt	tttgtcacc	cagaaacgct	ggtgaaagta	2400
aaagatgctg	aagatcagtt	gggtgcacga	gtgggttaca	tcgaactgga	tctcaacagc	2460
ggtaagatcc	ttgagagttt	tcgccccgaa	gaacgttttc	caatgatgag	cactltttaa	2520
gttctgctat	gtggcgcggt	attatcccgt	gttgacgccg	ggcaagagca	actcggtcgc	2580
cgcatacact	attctcagaa	tgacttggtt	gagtactcac	cagtcacaga	aaagcatctt	2640
acggatggca	tgacagtaag	agaattatgc	agtgtgccca	taaccatgag	tgataaact	2700
gcggccaact	tacttctgac	aacgatcggg	ggaccgaagg	agctaaccgc	ttttttgcac	2760
aacatggggg	atcatgtaac	tcgccttgat	cgttgggaaC	cggagctgaa	tgaagccata	2820
ccaaacgacg	agcgtgacac	cacgatgcct	gtagcaatgg	caacaacgtt	gcgcaaaacta	2880
ttactggcg	aactacttac	tctagcttcc	cggcaacaat	taatagactg	gatggaggcg	2940
gataaagttg	caggaccact	tctgcgctcg	gcccttccgg	ctggctgggt	tattgctgat	3000
aaatctggag	ccggtgagcg	tgggtctcgc	ggtatcattg	cagcactggg	gccagatggt	3060
aagccctccc	gtatcgtagt	tatctacacg	acggggagtc	aggcaactat	ggatgaacga	3120
aatagacaga	tcgctgagat	aggtgcctca	ctgattaagc	attggtaact	gtcagaccaa	3180
gtttactcat	atatacttta	gattgattta	aaacttcatt	tttaatttaa	aaggatctag	3240
gtgaagatcc	tttttgataa	tctcatgacc	aaaatccctt	aacgtgagtt	ttcgtttcac	3300
tgagcgtcag	accccgtaga	aaagatcaaa	ggatcttctt	gagatccttt	ttttctgcgc	3360
gtaatctgct	gcttgcaaac	aaaaaaacca	ccgctaccag	cggtggtttg	tttgccggat	3420
caagagctac	caactctttt	tccgaaggta	actggcttca	gcagagcgca	gataccaaat	3480
actgtccttc	tagtgtagcc	gtagttaggc	caccacttca	agaactctgt	agcaccgcct	3540
acatacctcg	ctctgctaata	cctgttacca	gtggctgctg	ccagtggcga	taagtcgtgt	3600
cttaccgggt	tggactcaag	acgatagtta	ccggataagg	cgcagcggtc	gggctgaacg	3660
gggggttcgt	gcacacagcc	cagcttggag	cgaacgacct	acaccgaact	gagataccta	3720
cagcgtgagc	tatgagaaaG	cgccacgctt	cccgaagggg	gaaaggcggg	caggtatccg	3780
gtaagcggca	gggtcggaaC	aggagagcgc	acgagggagc	ttccaggggg	aaacgcctgg	3840
tatctttata	gtcctgtcgg	gtttcgccac	ctctgacttg	agcgtcgatt	tttgtgatgc	3900
tcgtcagggg	ggcggagcct	atggaaaaac	gccagcaacg	cggcctlttt	acggttcctg	3960
gcctltttgct	ggcctltttg	tcacatgttc	tttctgcgt	tatcccctga	ttctgtggat	4020

ES 2 387 280 A1

aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc 4080
 agcgagtcag tgagcgagga agcgggaagag cgcctgatgc ggtatTTTTct ccttacgcat 4140
 ctgtgCGgta tttcacaccg catatggTgc actctcagta caatctgctc tgatgCCgca 4200
 tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg ggtcatggct gcgccccgac 4260
 acccgccaac acccgctgac gcgcccTgac gggcttTgtct gctcccggca tccgcttaca 4320
 gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gTTTTcaccg tcatcaccga 4380
 aacgcgcgag gcagcagatc aattcgcgcg cgaaggcgaa gcggcatgca taatgtgcct 4440
 gtcaaattgga cgaagcaggg attctgcaa ccctatgcta ctccgtcaag ccgtcaattg 4500
 tctgattcgt taccaattat gacaacttga cggctacatc attcactttt tcttcacaac 4560
 cggcacggaa ctgctcggg ctggccccgg tgcatttttt aaataccgc gagaaataga 4620
 gttgatcgtc aaaaccaaca ttgcgaccga cggTggcgat aggcattccg gtggtgctca 4680
 aaagcagctt cgcctggctg atacgttggT cctcgcgcca gcttaagacg ctaatcccta 4740
 actgctggcg gaaaagatgt gacagacgcg acggcgaaa gcaaactgc tgtgcgacgc 4800
 tggcgatatac aaaattgctg tctgccaggt gatcgtgat gtactgaaa gcctcgcgta 4860
 cccgattatc catcggTgga tggagcgact cgttaatcgc ttccatgcgc cgcagtaaca 4920
 attgctcaag cagatttatc gccagcagct ccgaatagcg cccttcccct tgcccggcgt 4980
 taatgatttg cccaaacagg tcgctgaaat gcggctggTg cgcttcatcc gggcgaaaga 5040
 accccgtatt ggcaaattt gacggccagt taagccattc atgccagtag gcgcgcggac 5100
 gaaagtaaac cactggTga taccattcgc gagcctccgg atgacgaccg tagtgatgaa 5160
 tctctcctgg cgggaacagc aaaatatcac ccggtcggca aacaaattct cgtccctgat 5220
 tttcaccac cccctgaccg cgaatggTga gattgagaat ataacctttc attcccagcg 5280
 gtcggtcgat aaaaaaatcg agataaccgt tggcctcaat cggcgTtaaa cccgccacca 5340
 gatgggcatt aaacgagtat cccggcagca ggggatcatt ttgcgcttca gccatacttt 5400
 tcatactccc gccattcaga g 5421

<210> 10
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador directo con la secuencia que codifica para 10 histidinas y para la diana de corte de la enterokinasa

<400> 10
 gaagtTctgt tccaggggcc ccatcacat caccatcacc atcaccatca cgatgacgat 60
 gacaagtttt ccagcatggg tagctatcca 90

<210> 11
 <211> 30
 <212> DNA

ES 2 387 280 A1

<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cebador inverso que hibrida con la secuencia que codifica para la diana de corte de pre-Scission	
<400>	11	
	aaagctagcg ggcccctgga acagaacttc	30
<210>	12	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cebador directo para distinguir pPRETOP4-Tfam de pTOP-Tfam	
<400>	12	
	ctaggctgga agttctgttc caggggcccg	30
<210>	13	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cebador inverso para distinguir pPRETOP4-Tfam de pTOP-Tfam	
<400>	13	
	ttttgaattc ctctttatac ttgctcacag cttcttt	37
<210>	14	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cebador directo para comprobar el vector pTOP-Tfam	
<400>	14	
	gaccaaagcc atgacaaaaa cg	22
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cebador inverso para comprobar el vector pTOP-Tfam	
<400>	15	
	tcgacggcgc tattcagatc	20
<210>	16	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cebador directo de clonación de PCBP1 en pTOP	
<400>	16	
	cacgatgacg atgacaagga tgccggtgtg actgaa	36

ES 2 387 280 A1

<210> 17
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador inverso de clonación de PCBP1 en pTOP

<400> 17
 atgacaactc cgtcttcct agctgcaccc cat 33

<210> 18
 <211> 5918
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia de pTOP-PCBP1

<400> 18
 aagaaaccaa ttgtccatat tgcacagac attgccgtca ctgcgtcttt tactggctct 60
 tctcgctaac caaacggta accccgctta ttaaagcat tctgtaaca agcgggacca 120
 aagccatgac aaaaacgct acaaaaagt tctataatca cggcagaaaa gtccacattg 180
 attatttgca cggcgtcaca ctttgctatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg 240
 atcctacctg acgcttttta tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg tttttgggc 300
 taacaggagg aattaacat gggccaccac catcaccacc accatcatca tcatggcggc 360
 agatcttccc ctatactagg ttattggaaa attaagggcc ttgtgcaacc cactcgactt 420
 cttttggaat atcttgaaga aaaatatgaa gagcatttgt atgagcgca tgaaggatgat 480
 aaatggcgaa acaaaaagt tgaattgggt ttggagtttc ccaatcttcc ttattatatt 540
 gatggtgatg ttaaattaac acagtctatg gccatcatac gttatatagc tgacaagcac 600
 aacatgttgg gtggttgtcc aaaagagcgt gcagagattt caatgcttga aggagcggtt 660
 ttggatatta gatacgggtg ttcgagaatt gcatatagta aagactttga aactctcaaa 720
 gttgattttc ttagcaagct acctgaaatg ctgaaaatgt tcgaagatcg tttatgtcat 780
 aaaacatatt taaatggtga tcatgtaacc catcctgact tcatgttgta tgacgctctt 840
 gatgttgttt tatacatgga ccaatgtgc ctggatgcgt tcccaaaatt agtttgtttt 900
 aaaaaacgta ttgaagctat cccacaaatt gataagtact tgaaatccag caagtatata 960
 gcatggcctt tgcagggctg gcaagccacg tttggtggtg gcgaccatcc tccaaaatcg 1020
 gatctggaag ttctgttcca ggggccccat caccatcacc atcaccatca ccatcacgat 1080
 gacgatgaca aggatgccgg tgtgactgaa agtggactaa atgtgactct caccattcgg 1140
 cttcttatgc acggaaagga agtaggaagc atcattggga agaaagggga gtcggttaag 1200
 aggatccgag aggagagtgg cgcgcgatc aacatctcgg aggggaattg tccggagaga 1260
 atcatcactc tgaccggccc caccaatgcc atctttaagg ctttcgctat gatcatcgac 1320
 aagctggagg aagatatcaa cagctccatg accaacagta ccgcgccag caggcccccg 1380

ES 2 387 280 A1

gtcaccctga ggctggtggt gccggccacc cagtgcggct ccctgattgg gaaaggcggg 1440
 tgtaagatca aagagatccg cgagagtacg ggggvcgagg tccaggtggc gggggatatg 1500
 ctgcccact ccaccgagcg ggccatcacc atcgctggcg tgccgcagtc tgtcaccgag 1560
 tgtgtcaagc agatttgctt ggtcatgctg gagacgctct cccagtctcc gcaagggaga 1620
 gtcattgacca ttccgtacca gcccatgccg gccagctccc cagtcattctg cgcgggvcggc 1680
 caagatcggg gcagcgagcg tgcgggctac ccccatgcc a cccatgacct ggagggacca 1740
 cctctagatg cctactcgat tcaaggacaa cacaccattt ctccgctcga tctggccaag 1800
 ctgaaccagg tggcaagaca acagtctcac tttgccatga tgcacggcgg gaccggattc 1860
 gccggaattg actccagctc tccagaggtg aaaggctatt gggcaagttt ggatgcatct 1920
 actcaaacca cccatgaact caccattcca aataacttaa ttggctgcat aatcgggvcgc 1980
 caaggvcgcca acattaatga gatccgccag atgtccgggg cccagatcaa aattgccaac 2040
 ccagtggagg gtcctctgg taggcagggt actatcactg gctctgctgc cagtattagt 2100
 ctggcccagt atctaatcaa tgccaggctt tcctctgaga agggcatggg gtgcagctag 2160
 ggaagacgga gttgtcattg gaattcgaag cttgggcccg aacaaaaact catctcagaa 2220
 gaggatctga atagvcgctt cgaccatcat catcatcatc attgagttta aacggctctc 2280
 agcttggtg ttttgvcgga tgagagaaga ttttcagcct gatacagatt aaatcagaac 2340
 gcagaagvcg tctgataaaa cagaatttgc ctggvcgvcag tagcvcggtg gtcccacctg 2400
 accccatgcc gaactcagaa gtgaaacgcc gtagvcgcca tggtagtgtg gggctctccc 2460
 atgvcgagat agggaaactgc caggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg 2520
 gcctttcgtt ttatctgttg tttgtvcgtg aacgctctcc tgagtaggac aaatccvcgg 2580
 ggagvcggtt tgaacgttgc gaagcaacgg cccggagggg ggcgggvcagg acgcccvcga 2640
 taaactgcc ggcatcaaat taagcagaag gccatcctga cggatggcct ttttgcgttt 2700
 ctacaaaact tttttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac 2760
 aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt 2820
 tccgtgtvcg ccttattccc ttttttvcgg cattttgcct tcctgttttt gctcaccvcg 2880
 aaacgctggg gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatvcg 2940
 aactggatct caacagvcgtt aagatcctt agagttttc cccvcgaa gaa cgttttccaa 3000
 tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcvcggtatt atcccgtgtt gacvcgvcggc 3060
 aagagcaact cggctvcgvc atacactatt ctcagaatga cttggttgag tactcaccvcg 3120
 tcacagaaaa gcatcttac gatggcatga cagtaagaga attatgvcag gctvccataa 3180
 ccatgagtg taactvcgvc gccaaacttac ttctgacaac gatvcgvcagg ccgaaagvcg 3240
 taaccgctt tttgcacaac atgggggatc atgtaactvc ccttgatvcg tgggaaaccvcg 3300
 agctgaaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatvcctgtg gcaatggcaa 3360
 caacgttvcg caaactatta actggvcgaa tactttactct agcttcccvcg caacaattaa 3420

ES 2 387 280 A1

tagactggat	ggaggcggat	aaagttgcag	gaccacttct	gcgctcggcc	cttccggctg	3480
gctggtttat	tgctgataaa	tctggagccg	gtgagcgtgg	gtctcgcggt	atcattgcag	3540
cactggggcc	agatggtaag	ccctcccgta	tcgtagttat	ctacacgacg	gggagtcagg	3600
caactatgga	tgaacgaaat	agacagatcg	ctgagatagg	tgccctactg	attaagcatt	3660
ggtaactgtc	agaccaagtt	tactcatata	tactttagat	tgatttaaaa	cttcattttt	3720
aatttaaaag	gatctaggtg	aagatccttt	ttgataatct	catgaccaa	atccctaac	3780
gtgagttttc	gttccactga	gcgtcagacc	ccgtagaaaa	gatcaaagga	tcttcttgag	3840
atcctttttt	tctgcgcgta	atctgctgct	tgcaaacaaa	aaaaccaccg	ctaccagcgg	3900
tggtttgttt	gccggatcaa	gagctaccaa	ctctttttcc	gaaggtaact	ggcttcagca	3960
gagcgcagat	accaaatact	gtccttctag	tgtagccgta	gttaggccac	cacttcaaga	4020
actctgtagc	accgcctaca	tacctcgtc	tgctaatcct	gttaccagtg	gctgctgcca	4080
gtggcgataa	gtcgtgtcct	accgggttg	actcaagacg	atagttaccg	gataaggcgc	4140
agcggtcggg	ctgaacgggg	ggttcgtgca	cacagcccag	cttgagcga	acgacctaca	4200
ccgaactgag	atacctacag	cgtgagctat	gagaaagcgc	cacgcttccc	gaagggagaa	4260
aggcggacag	gtatccggta	agcggcaggg	tcggaacagg	agagcgcacg	agggagcttc	4320
cagggggaaa	cgcttggat	ctttatagtc	ctgtcgggtt	tcgccacctc	tgacttgagc	4380
gtcgattttt	gtgatgctcg	tcaggggggc	ggagcctatg	gaaaaacgcc	agcaacgcgg	4440
cctttttacg	gttcttggcc	ttttgctggc	cttttgctca	catgttcttt	cctgcgttat	4500
cccctgattc	tgtggataac	cgtattaccg	cctttgagtg	agctgatacc	gctcgccgca	4560
gccgaacgac	cgagcgcagc	gagtcagtga	gcgaggaagc	ggaagagcgc	ctgatgcggt	4620
atthttctcct	tacgcatctg	tgcggtatth	cacaccgcat	atggtgcact	ctcagtacaa	4680
tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagt	atacactccg	ctatcgctac	gtgactgggt	4740
catggctgcg	ccccgacacc	cgccaacacc	cgctgacgcg	ccctgacggg	cttgtctgct	4800
cccggcatcc	gcttacagac	aagctgtgac	cgctctccggg	agctgcatgt	gtcagagggt	4860
ttcaccgtca	tcaccgaaac	gcgcgaggca	gcagatcaat	tcgcgcgcga	aggcgaagcg	4920
gcatgcataa	tgtgcctgtc	aaatggacga	agcagggatt	ctgcaaacc	tatgctactc	4980
cgtaagccg	tcaattgtct	gattcgttac	caattatgac	aacttgacgg	ctacatcatt	5040
cactttttct	tcacaaccgg	cacggaactc	gctcgggctg	gccccggtgc	atthtttaaa	5100
taccgcgag	aaatagagtt	gatcgtcaaa	accaacattg	cgaccgacgg	tggcgatagg	5160
catccgggtg	gtgctcaaaa	gcagcttcgc	ctggctgata	cgttggtcct	cgcgccagct	5220
taagacgcta	atccctaact	gctggcggaa	aagatgtgac	agacgcgacg	gcgacaagca	5280
aacatgctgt	gcgacgctgg	cgatatcaaa	attgctgtct	gccaggtgat	cgctgatgta	5340
ctgacaagcc	tcgctgacct	gattatccat	cggtggatgg	agcgactcgt	taatcgcttc	5400
catgcgccgc	agtaacaatt	gctcaagcag	atthttatcgcc	agcagctccg	aatagcgccc	5460

ES 2 387 280 A1

ttccccttgc ccggcgtaa tgatttggcc aaacaggtcg ctgaaatgcg gctggtgcbc 5520
 ttcattccggg cgaaagaacc ccgtattggc aaatattgac ggccagttaa gccattcatg 5580
 ccagtaggag cgcgacgaa agtaaaccba ctggtgatac cattcgcgag cctccggatg 5640
 acgaccgtag tgatgaatct ctctggcgg gaacagcaaa atatcaccg gtcggcaaac 5700
 aaattctcgt ccctgatttt tcaccacccc ctgaccgca atggtgagat tgagaatata 5760
 acctttcatt cccagcggtc ggtcgataaa aaaatcgaga taaccgttgg cctcaatcgg 5820
 cgtaaacc gccaccagat gggcattaa cgagtatccc ggcagcaggg gatcattttg 5880
 cgcttcagcc atacttttca tactcccgcc attcagag 5918

<210> 19
 <211> 5460
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia del plásmido pTOP-Tfam

<400> 19
 aagaaaccaa ttgtccatat tgcattcagac attgccgtca ctgcgtcttt tactggctct 60
 tctcgctaac caaacggta accccgctta ttaaaagcat tctgtaacaa agcgggacca 120
 aagccatgac aaaaacgcgt acaaaaagt tctataatca cggcagaaaa gtccacattg 180
 attatttgca cggcgtcaca ctttgctatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg 240
 atcctacctg acgcttttta tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg ttttttggg 300
 ctaacaggag gaattaacca tgggccacca ccatcaccac caccatcatc atcatggcgg 360
 cagatcttc cctatactag gttattggaa aattaagggc cttgtgcaac cactcagact 420
 tcttttggaa tatcttgaag aaaaatatga agagcatttg tatgagcgcg atgaaggtga 480
 taaatggcga acaaaaaagt ttgaattggg tttggagttt cccaatcttc cttattatat 540
 tgatggtgat gttaaattaa cacagtctat ggccatcata cgttatatag ctgacaagca 600
 caacatggtg ggtggttgtc caaaagagcg tgcagagatt tcaatgcttg aaggagcgg 660
 tttggatatt agatacggtg tttcagaaat tgcataatag aaagactttg aaactctcaa 720
 agttgatatt cttagcaagc tacctgaaat gctgaaaatg ttcgaagatc gtttatgtca 780
 taaaacatat ttaaatggtg atcatgtaac ccacctgac ttcattgttg atgacgctct 840
 tgatgttgtt ttatacatgg acccaatgtg cctggatgag ttcccaaaat tagtttgttt 900
 taaaaaacgt attgaagcta tcccacaaat tgataagtac ttgaaatcca gcaagtatat 960
 agcatggcct ttgcagggt ggcaagccac gtttgggtgt ggcgaccatc ctccaaaatc 1020
 ggatctggaa gttctgttcc aggggccccca tcaccatcac catcaccatc accatcacga 1080
 tgacgatgac aagttttcca gcatgggtag ctatccaaag aaacctatga gttcatacct 1140
 tcgattttcc acagaacagc tacccaaatt taaagctaaa caccagatg caaaactttc 1200
 agaattggtt aggaaaattg cagccctgtg gagggagcta ccagaagcag aaaaaaagg 1260

ES 2 387 280 A1

ttatgaagct gattttaaag ctgagtggaa agcatacaaa gaagctgtga gcaagtataa	1320
agagcagcta actccaagtc agctgatggg tatggagaag gaggccccggc agagacggtt	1380
aaaaaagaaa gcaactggtaa agagaagaga attaattttg cttggaaaac caaaaagacc	1440
tcgttcagca tataacattt atgtatctga aagcttcag gaggcaaagg atgattcggc	1500
tcagggaaaa ttgaagcttg taaatgaggc ttggaaaaat ctgtctcctg aggaaaagca	1560
ggcatatatt cagcttgcta aagatgatag gattcgttac gacaatgaaa tgaagtcttg	1620
ggaagagcag atggctgaag ttggacgaag tgatctcatc cgtcgaagtg tgaaacgatc	1680
cggagacatc tctgagcatt aaggaagacg gagttgtcat tgggaattcga agcttggggc	1740
cgaacaaaaa ctcatctcag aagaggatct gaatagcgc gtcgaccatc atcatcatca	1800
tcattgagtt taaacggtct ccagcttggc tgttttggcg gatgagagaa gattttcagc	1860
ctgatacaga ttaaatacaga acgcagaagc ggtctgataa aacagaattt gcctggcggc	1920
agtagcgcgg tggcccacc tgaccccatg ccgaactcag aagtgaaacg ccgtagcgc	1980
gatggtagtg tggggtctcc ccatgcgaga gtagggaact gccaggcatc aaataaaacg	2040
aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt tgtttgtcgg tgaacgctct	2100
cctgagtagg acaaatccgc cgggagcggg tttgaacggt gcgaagcaac ggcccggagg	2160
gtggcgggca ggacgccccg cataaactgc caggcatcaa attaagcaga aggccatcct	2220
gacggatggc ctttttgctt ttctacaaac tctttttggt tttttttcta aatacattca	2280
aatatgtatc cgctcatgag acaataacc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg	2340
aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc cttttttgct ggcattttgc	2400
cttctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg	2460
ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt	2520
cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc actttttaaag ttctgctatg tggcgcggta	2580
ttatcccgtg ttgacgccg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat	2640
gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga	2700
gaattatgca gtgctgcat aaccatgagt gataaactg cggccaactt acttctgaca	2760
acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact	2820
cgcttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc	2880
acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact	2940
ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt	3000
ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt	3060
gggtctcgcg gtatcattgc agcaactggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt	3120
atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata	3180
ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag ttactcata tatactttag	3240
attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat	3300

ES 2 387 280 A1

ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa 3360
aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca 3420
aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt 3480
ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg 3540
tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaatc 3600
ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga 3660
cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc 3720
agcttgagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc 3780
gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca 3840
ggagagcgca cgaggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg 3900
tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta 3960
tgaaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct 4020
cacatgttct ttctgcggt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag 4080
tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa 4140
gcggaagagc gcctgatgcg gtatthttct cttacgcadc tgtgcggtat ttcacaccgc 4200
atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgat agttaagcca gtatacactc 4260
cgctatcgct acgtgactgg gtcattgctg cgcctcgaca cccgccaaca cccgctgacg 4320
cgccctgacg ggcttgtctg ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg 4380
ggagctgcat gtgtcagagg ttttaccgt catcaccgaa acgcgcgagg cagcagatca 4440
attcgcgcgc gaaggcgaag cggcatgcat aatgtgcctg tcaaattggac gaagcagggg 4500
ttctgcaaac cctatgctac tccgtcaagc cgtcaattgt ctgattcgtt accaattatg 4560
acaacttgac ggctacatca ttcacttttt cttcacaacc ggcacggaac tcgctcgggc 4620
tggccccggt gcatttttta aatacccgcg agaaatagag ttgatcgtca aaaccaacat 4680
tgcgaccgac ggtggcgata ggcattccgg tgggtgctca aagcagcttc gcctggctga 4740
tacgttggtc ctgcgcccag cttaaagacgc taatccctaa ctgctggcgg aaaagatgtg 4800
acagacgca cggcgacaag caaacatgct gtgcgacgct ggcgatatca aaattgctgt 4860
ctgccaggtg atcgtgatg tactgacaag cctcgcgtac ccgattatcc atcgggtggat 4920
ggagcgactc gttaatcgct tccatgcgcc gcagtaacaa ttgctcaagc agatttatcg 4980
ccagcagctc cgaatagcgc cttcccctt gcccgcggtt aatgatttgc ccaaacaggt 5040
cgctgaaatg cggctggtgc gcttcatccg ggcgaaagaa ccccgattg gcaaatttg 5100
acggccagtt aagcattca tgccagtagg cgcgcggacg aaagtaaacc cactggtgat 5160
accattcgcg agcctccgga tgacgaccgt agtgatgaat ctctcctggc gggaaacagca 5220
aaatatcacc cggctcgcaa acaaattctc gtccctgatt tttcaccacc ccctgaccgc 5280
gaatggtgag attgagaata taacctttca ttcccagcgg tcggtcgata aaaaaatcga 5340

ES 2 387 280 A1

gataaccggtt ggcctcaatc ggcgttaaac cgcaccag atgggcatta aacgagtatc 5400
 ccggcagcag gggatcattt tgcgcttcag ccatactttt catactcccg ccattcagag 5460

<210> 20
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador directo de reamplificación del inserto a clonar en pTOP por CiPCR

<400> 20
 tcaccatcac catcaccatc acgatgacga tgacaag 37

<210> 21
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador reverso de reamplificación del inserto a clonar en pTOP por CiPCR

<400> 21
 gcccaagctt cgaattccaa tgacaactcc gtcttcctta 40

<210> 22
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Parte 5' del cebador directo para la clonación del inserto por CiPCR

<400> 22
 cacgatgacg atgacaag 18

<210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Parte 5' del cebador reverso de clonación del inserto por CiPCR

<400> 23
 atgacaactc cgtcttcctt a 21



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130235

②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.02.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/62** (2006.01)
C07K1/22 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	POLANOWSKA, J. et al., 'Tandem immunoaffinity purification of protein complexes from Caenorhabditis elegans', BIOTECHNIQUES, 2004, Vol. 36, No. 5, páginas 778-80, 782, ISSN 0736-6205 (print), todo el documento.	1-51
Y	BÜRCKSTÜMMER, T. et al., 'An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells', NATURE METHODS, 2006, Vol. 3, No. 12, páginas 1013-1019, ISSN: 1548-7091 (print), ISSN: 1549-1676 (electronic), Resultados, Figura 1.	1-51
Y	PUIG, O. et al., 'The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification', METHODS, 2001, Vol. 24, No. 3, páginas 218-229, ISSN: 1046-2023, todo el documento, Apartado 6.1.1.; Figura 4.	1-51
A	XU, X. et al., 'The tandem affinity purification method: An efficient system for protein complex purification and protein interaction identification', PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, 2010, Vol. 72, No. 2, páginas 149-156, ISSN: 1046-5928, todo el documento, en especial, Figura 1, Tabla 1.	1-51
A	LI, Y., 'Commonly used tag combinations for tandem affinity purification', BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY, 2010 Feb, Vol. 55, No. 2, páginas 73-83, ISSN: 0885-4513 (print), ISSN: 1470-8744 (electronic), todo el documento, en especial, Tabla 2.	1-51
A	AUSTIN, B.P. et al., 'Hexahistidine-tagged maltose-binding protein as a fusion partner for the production of soluble recombinant proteins in Escherichia coli', METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 2009, Vol. 498, páginas 157-172, ISSN: 1064-3745 (print), todo el documento.	1-51
A	HONEY, S. et al., 'A novel multiple affinity purification tag and its use in identification of proteins associated with a cyclin-CDK complex', NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 2001, Vol. 29, No. 4, página E24, ISSN: 0305-1048 (print), ISSN: 1362-4962 (electronic), todo el documento.	1-51
A	US 2006099710 A1 (DONNELLY et al.) 11.05.2006, todo el documento.	1-51
A	US 2008039616 A1 (SIGMA ALDRICH CO.) 14.02.2008, todo el documento.	1-51

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
22.02.2012

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201130235

②² Fecha de presentación de la solicitud: 23.02.2011

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12N15/62** (2006.01)
C07K1/22 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	TAGWERKER, C. et al., 'A tandem affinity tag for two-step purification under fully denaturing conditions: application in ubiquitin profiling and protein complex identification combined with in vivocross-linking', MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, 2006, Vol. 5, No. 4, páginas 737-748, ISSN: 1535-9476 (print), ISSN: 1535-9484 (electronic), todo el documento.	1-51
A	KANEKO, A. et al., 'Tandem affinity purification of the Candida albicans septin protein complex', YEAST, 2004, Vol. 21, No. 12, páginas 1025-1033, ISSN: 0749-503X, todo el documento.	1-51

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
22.02.2012

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
2/6

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.02.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-51	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-51	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	POLANOWSKA, J. et al., <i>Biotechniques</i> , (2004), <u>36</u> (5): 778-80, 782.	2004
D02	BÜRCKSTÜMMER, T. et al., <i>Nat. Methods</i> , (2006), <u>3</u> (12): 1013-9.	2006
D03	PUIG, O. et al., <i>Methods</i> , (2001), <u>24</u> (3): 218-29.	2001
D04	XU, X. et al., <i>Protein Expr. Purif.</i> , (2010), <u>72</u> (2): 149-56.	2010
D05	LI, Y., <i>Biotechnol. Appl. Biochem.</i> , (2010 Feb), <u>55</u> (2): 73-83.	2010
D06	AUSTIN, B.P. et al., <i>Methods Mol. Biol.</i> , (2009), <u>498</u> : 157-72.	2009
D07	HONEY, S. et al., <i>Nucleic Acids Res.</i> , (2001), <u>29</u> (4): E24.	2001
D08	US 2006099710 A1 (DONNELLY et al.)	11.05.2006
D09	US 2008039616 A1 (SIGMA ALDRICH CO.)	14.02.2008
D10	TAGWERKER, C. et al., <i>Mol. Cell Proteomics</i> , (2006), <u>5</u> (4): 737-48.	2006
D11	KANEKO, A. et al., <i>Yeast</i> , (2004), <u>21</u> (12): 1025-33.	2004

En D1-D11 se describen estructuras polipeptídicas constituidas por secuencias marcadoras y secuencias de reconocimiento de una actividad proteasa para su aplicación en el método TAP ('*Tandem Affinity Purification*') de purificación de proteínas.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).**

1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste básicamente en una secuencia de nucleótidos que codifica tres marcadores (M, N y O) y dos secuencias de reconocimiento de una proteasa (P y Q). En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D1-D11, no se ha divulgado ninguna secuencia que comparta las mismas características técnicas de la reivindicada en la solicitud de patente.

1.2. La presente invención satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-51, es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).**2.1. Reivindicación independiente 1.**

2.1.1. Los documentos D1-D3 constituyen el estado de la técnica más próximo. En D1 se describe una secuencia constituida por los epítomos HA, polihistidina (8xHis) y myc, y la secuencia del sitio de corte de la proteasa TEV; dispuestas según el siguiente orden: HA-8xHis-TEV-myc. Dicha secuencia, fusionada al extremo 3' de un gen de interés, tiene aplicación en métodos de marcaje y purificación de proteínas (c.f. D1: Figura 1). En D2 se analizan secuencias constituidas por tres secuencias marcadoras (2xProA-CBP/SBP, 2xProG-CBP/SBP) y la secuencia de reconocimiento TEV con aplicación en métodos de marcaje y purificación de proteínas (cf. D2: Resultados, Figura 1). En D3 se divulgan análogamente una secuencia constituida por el epítomo ProA, la secuencia de corte de TEV, el epítomo CBP y la secuencia de corte de la enteroquinasa (EK). La fusión de esta secuencia en el extremo 5' de un gen de interés facilita la purificación del polipeptídico codificado (c.f. D2: Apartado 6.1.1; Figura 4).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación independiente 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de una nueva secuencia de nucleótidos codificadora de secuencias marcadoras y de reconocimiento de proteasas.

2.1.3. La solución propuesta es la secuencia de la reivindicación 1 que consiste básicamente en una secuencia de nucleótidos que codifica tres marcadores (M, N y O) y dos secuencias de reconocimiento de una proteasa (P y Q). Según se describe, dichos elementos se disponen preferentemente en el siguiente orden: M-N-P-Q, lo que facilita diferentes opciones de marcaje y purificación de proteínas. En concreto, permite la purificación de una proteína fusionada a tres marcadores (M-N-P-Q), a un marcador (Q-Q) o sin ningún tipo de marcador (cf. Página 6, línea 31-32; Página 7, línea 7; Página 3, línea 20-Página 4, línea 2).

Básicamente, la diferencia técnica entre la secuencia de la invención y las descritas en D1-D2 es la existencia de un segundo elemento de reconocimiento de una proteasa (Q). No obstante, en D3 se describe la secuencia para el marcaje y purificación de proteínas caracterizada por los elementos ProA-TEV-CBP-EK, en donde TEV y EK son secuencias de reconocimiento de unas proteasas. Por consiguiente, la secuencia descrita en D3 facilita la purificación de proteínas con los marcajes ProA y/o CBP, o sin ningún tipo de marcaje específico.

Sobre la base del estado de la técnica más próximo, representado por D1-D3, junto con los conocimientos de uso y aplicación habitual en este campo de la técnica (cf: D4-D11), se concluye que la solución propuesta por la solicitud de patente al problema técnico planteado sería evidente para el experto en la materia. Por ello, el objeto de la reivindicación independiente 1 puede considerarse que no es inventivo. Según lo anteriormente expuesto, el objeto de las reivindicaciones dependientes 2-51 también se considera que es no inventivo.

- 2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-51, no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patente.