

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 702**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2008 E 08782229 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2173877**

54 Título: **Etiquetas de solubilidad para la expresión y purificación de péptidos bioactivos**

30 Prioridad:

25.07.2007 US 782836

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

24.01.2014

73 Titular/es:

**E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
(100.0%)
1007 MARKET STREET
WILMINGTON, DE 19898, US**

72 Inventor/es:

**CHENG, QIONG;
DECAROLIS, LINDA JANE;
FAHNESTOCK, STEPHEN R.;
GRUBER, TANJA MARIA;
REISS, LISA DIANE y
ROUVIERE, PIERRE E.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 439 702 T3

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

DESCRIPCIÓN

Etiquetas de solubilidad para la expresión y purificación de péptidos bioactivos

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de la expresión y purificación de proteínas de células microbianas. Más específicamente, se proporciona una familia de etiquetas peptídicas pequeñas útiles en la generación de proteínas de fusión insolubles.

Antecedentes de la invención

La producción eficaz de proteínas y péptidos bioactivos se ha convertido en una característica distintiva de la industria biomédica y bioquímica industrial.

10 Los péptidos y proteínas bioactivos se usan como agentes curativos en una variedad de enfermedades tales como diabetes (insulina), infecciones virales y leucemia (interferón), enfermedades del sistema inmune (interleuquinas) y deficiencias de células rojas (eritropoyetina) por nombrar algunas. Además, se necesitan grandes cantidades de proteínas y péptidos para varias aplicaciones industriales incluyendo, por ejemplo, las industrias de pulpa y papel y pulpa, industrias alimentarias, industrias del cuidado personal y cosméticas, refinado de azúcar, tratamiento de aguas
15 residuales, producción de bebidas alcohólicas y como catalizadores para la generación de nuevos productos farmacéuticos.

Con el advenimiento del descubrimiento e implementación de tecnologías de cribado de péptidos combinatorias tales como exposición en bacterias (Kemp, D.J.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (7): 4520-4524 (1981); exposición en levaduras (Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (21): 9578-82 (1991), síntesis de péptidos en fase sólida combinatoria (Patente U.S. No. 5.449.754; Patente U.S. No. 5.480.971; Patente U.S. No. 5.585.275 y Patente U.S. No. 5.639.603),
20 tecnología de exposición en fagos (Patente U.S. No. 5.223.409; Patente U.S. No. 5.403.484; Patente U.S. No. 5.571.698; y Patente U.S. No. 5.837.500), exposición en ribosomas (Patente U.S. No. 5.643.768; Patente U.S. No. 5.658.754; y Patente U.S. No. 7.074.557) y tecnología de exposición en ARNm (PROFUSION™; Patente U.S. No. 6.258.558; Patente U.S. No. 6.518.018; Patente U.S. No. 6.281.344; Patente U.S. No. 6.214.553; Patente U.S. No. 6.261.804; Patente U.S. No. 6.207.446; Patente U.S. No. 6.846.655; Patente U.S. No. 6.312.927; Patente U.S. No. 6.602.685; Patente U.S. No. 6.416.950; Patente U.S. No. 6.429.300; Patente U.S. No. 7.078.197; y Patente U.S. No. 6.436.665) se han desarrollado nuevas aplicaciones para péptidos que tienen afinidades de unión específicas. En particular, se buscan péptidos como conectores en campos biomédicos para la unión de agentes de diagnóstico y farmacéuticos a superficies (véase Grinstaff *et al.*, Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2003/0185870 y Linter en Patente U.S. No. 6.620.419), así
30 como en la industria del cuidado personal para la unión de agentes beneficiosos a superficies corporales tales como pelo y piel (véase la Publ. Solic. Patente U.S. de propiedad común No. 2005/0050656, y Janssen et al. Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2003/0152976) y en la industria de la impresión para la unión de pigmentos a medios de impresión (véase la Publ. Solic. Patente U.S. de propiedad común No. 2005/0054752).

35 En algunos casos, pueden generarse sintéticamente proteínas y péptidos comercialmente útiles o aislarse de fuentes naturales. Sin embargo, estos métodos frecuentemente son costosos, exigen mucho tiempo y se caracterizan por una capacidad limitada de producción. El método preferido para la producción de proteínas y péptidos es mediante la fermentación de organismos construidos recombinantemente, preparados por ingeniería para sobreexpresar la proteína o péptido de interés. Aunque es preferible a la síntesis o aislamiento, la expresión recombinante de péptidos tiene varios obstáculos que hay que superar con el fin de que sea un medio rentable de producción. Por ejemplo, los péptidos (y en particular péptidos cortos) producidos en un entorno celular son susceptibles a la degradación por la acción de proteasas
40 celulares nativas. Además, la purificación puede ser difícil, lo que resulta en rendimientos bajos dependiendo de la naturaleza de la proteína o péptido de interés.

Un medio para mitigar las dificultades anteriores es el uso de quimeras genéticas para la expresión de proteínas y péptidos. Una proteína quimérica o "proteína de fusión" es un polipéptido que comprende al menos una parte del
45 producto proteico deseado fusionada con al menos una parte que comprende una etiqueta peptídica. La etiqueta peptídica puede usarse para ayudar en el plegamiento de la proteína, ayudar en la purificación posterior a la expresión, proteger a la proteína de la acción de enzimas degradantes y/o ayudar a la proteína a pasar a través de la membrana celular.

50 En muchos casos es útil expresar una proteína o péptido en forma insoluble, particularmente cuando el péptido de interés es bastante corto, normalmente soluble y/o susceptible a degradación proteolítica en la célula huésped. La producción del péptido en forma insoluble facilita una recuperación sencilla a la vez que protege al péptido de la degradación proteolítica indeseable. Un medio para producir el péptido en forma insoluble es producir el péptido recombinantemente como parte de una proteína de fusión insoluble incluyendo en la construcción de fusión al menos

una etiqueta peptídica (es decir, una etiqueta de cuerpo de inclusión) que induce la formación de cuerpos de inclusión. Típicamente, la proteína de fusión se diseña para incluir al menos un conector peptídico escindible de manera que el péptido de interés puede recuperarse posteriormente de la proteína de fusión. La proteína de fusión puede diseñarse para incluir una pluralidad de etiquetas de cuerpo de inclusión, conectores peptídicos escindibles y regiones que codifican el péptido de interés.

5

Las proteínas de fusión que comprenden una etiqueta peptídica que facilita la expresión de proteínas insolubles son muy conocidas en la técnica. Típicamente, la parte de etiqueta de la proteína química o de fusión es grande, lo que incrementa la probabilidad de que la proteína de fusión sea insoluble. El ejemplo de etiquetas peptídicas grandes usadas típicamente incluyen, pero no está limitado a, cloranfenicol acetiltransferasa (Dykes et al., Eur. J. Biochem., 174: 411 (1988), β -galactosidasa (Schellenberger et al., Int. J. Peptide Protein Res., 41: 326 (1993); Shen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 281: 4627 (1984); y Kempe et al., Gene, 39: 239 (1985), glutatión-S-transferasa (Ray et al., Bio/Technology, 11: 64 (1993) y Hancock et al. (WO94/04688), el N terminal de L-ribulokinasa (Patente U.S. 5.206.154 y Lai et al., Antimicrob. Agents & Chemo., 37: 1614 (1993), proteína gp55 del bacteriófago T4 (Gramm et al., Bio/Technology, 12: 1017 (1994), proteína quetoesteroide isomerasa bacteriana (Kuliopulos et al., J. Am. Chem. Soc. 116: 4599 (1994), ubiquitina (Pilon et al., Biotechnol. Prog., 13: 374-79 (1997), proquimosina bacteriana (Haught et al., Biotechnol. Bioengineer. 57: 55-61 (1998) y proteína bactericida/potenciadora de la permeabilidad ("BPI", Better, M.D. y Gavit, PD., Patente U.S. No. 6.242.219). La técnica está repleta de ejemplos específicos de esta tecnología, véase por ejemplo US 6.613.548, que describe una proteína de fusión de una etiqueta proteínica y una proteína soluble y la purificación posterior del lisado celular; US 6.037.145, que enseña una etiqueta que protege a la proteína química expresada de una proteasa específica; Patente U.S. No. 5.648.244, que enseña la síntesis de una proteína de fusión que tiene una etiqueta y un conector escindible para una purificación fácil de la proteína deseada; y Patente U.S. No. 5.215.896; Patente U.S. No. 5.302.526; Patente U.S. No. 5.330.902; y Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2005/221444, que describe etiquetas de fusión que contienen composiciones de aminoácidos diseñadas específicamente para incrementar la insolubilidad de la proteína o péptido químico.

10

15

20

25

30

Recientemente se han desarrollado etiquetas de cuerpo de inclusión más cortas a partir de la proteína zeína de *Zea mays* (Publ. Solic. Patente U.S. en co-propiedad No. 2008/0096246), la cistatina de *Daucus carota* (Publ. Solic. Patente U.S. en co-propiedad No. 2008/0096245), y una proteína hipotética semejante a amiloide de *Caenorhabditis elegans* (Publ. Solic. Patente U.S. en co-propiedad No. 2008/0206809). El uso de etiquetas de cuerpo de inclusión cortas incrementa el rendimiento del péptido diana producido en la célula huésped recombinante.

El problema a resolver es proporcionar etiquetas de solubilidad que sean eficaces para la preparación de proteínas de fusión que comprenden un péptido de interés.

Resumen de la invención

35

El problema indicado se ha resuelto mediante el descubrimiento de un conjunto de etiquetas de cuerpo de inclusión (IBT) cortas estructuralmente similares útiles para sintetizar proteínas de fusión para la expresión incrementada y purificación sencilla de péptidos cortos ("péptidos de interés").

La invención se refiere a un conjunto de etiquetas de cuerpo de inclusión peptídicas que pueden estar unidas a un péptido de interés que se van a expresar para facilitar la insolubilidad y recuperación posterior del péptido expresado.

De acuerdo con esto, la invención proporciona una etiqueta de cuerpo de inclusión que comprende la estructura:

40

Gln-Gln-Xaa1-Phe-Xaa2-Trp-Xaa3-Phe-Xaa4-Xaa5-Gln-Espaciador-[[Gln-Gln-Xaa1-Phe-Xaa2-Trp-Xaa3-Phe-Xaa4-Xaa5-Gln]-[Espaciador]_m]_n

en la que

Xaa1= Arg, His o Lys;

Xaa2= Gln, His o Lys;

Xaa3= Gln, His o Lys;

45

Xaa4= Glu o Gln;

Xaa5= Gln o Lys;

n=1 a 10;

m= n-1; y

en la que el Espaciador es un péptido que comprende aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en prolina, arginina, glicina, ácido glutámico y cisteína.

5 En una realización adicional, las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión comprenden al menos dos copias de la secuencia central (Gln-Gln-Xaa1-Phe-Xaa2-Trp-Xaa3-Phe-Xaa4-Xaa5-Gln; SEQ ID NO: 58) en la que Xaa1= Arg, His o Lys; Xaa2= Gln, His o Lys; Xaa3= Gln, His o Lys; Xaa4= Glu o Gln; y Xaa5= Gln o Lys; en la que la secuencia central está separada por al menos un espaciador como se ha definido anteriormente.

En otra realización, la etiqueta de cuerpo de inclusión comprende además al menos un resto de tetracisteína entrecruzable (CCPGCC; SEQ ID NO: 33). En una realización adicional, el resto de cisteína entrecruzable está localizado en el extremo amino y/o carboxi de la etiqueta de cuerpo de inclusión definida anteriormente.

10 En otra realización, la etiqueta de cuerpo de inclusión se selecciona del grupo que consiste en IBT 103 (SEQ ID NO: 15), IBT 138 (SEQ ID NO: 19), IBT 139 (SEQ ID NO: 21), IBT 139.CCPGCC (SEQ ID NO: 31), IBT 139(5C) (SEQ ID NO: 265), IBT 182 (SEQ ID NO: 39), IBT 183 (SEQ ID NO: 41), IBT 184 (SEQ ID NO: 43), IBT 185 (SEQ ID NO: 45), IBT 186 (SEQ ID NO: 27), IBT 187a (SEQ ID NO: 47) e IBT 187b (SEQ ID NO: 49).

15 En otra realización, se proporciona un péptido de fusión insoluble que comprende la presente etiqueta de cuerpo de inclusión (IBT) unida de manera operativa a un péptido de interés (POI) y separada por al menos una secuencia conectora peptídica escindible (CS).

En otra realización, el péptido de interés se selecciona del grupo que consiste en péptidos de unión a pelo, péptidos de unión a uñas, péptidos de unión a piel, péptidos de unión a diente, péptidos de unión a polímero, péptidos de unión a arcilla, péptidos antimicrobianos, péptidos de unión a pigmento y péptidos de unión a celulosa.

20 En otra realización más, el péptido de interés es un péptido multi-bloque.

En una realización adicional, la invención proporciona un método para expresar un péptido de interés en forma insoluble que comprende:

25 a) sintetizar una construcción genética que codifica un péptido de fusión que comprende una primera parte que codifica la etiqueta de cuerpo de inclusión de la invención unida de manera operativa a una segunda parte que codifica un péptido de interés;

b) transformar una célula huésped de expresión con la construcción genética de (a);

c) crecer la célula huésped transformada de (b) en condiciones en las que la construcción genética se exprese y el péptido de fusión codificado se produzca en una forma insoluble; y

d) recuperar dicho péptido de fusión en dicha forma insoluble.

30 En otra realización, se proporciona un método para la producción de un péptido de interés que comprende:

a) sintetizar una construcción genética que codifica un péptido de fusión que comprende una primera parte que comprende la presente etiqueta de cuerpo de inclusión unida de manera operativa a una segunda parte que comprende un péptido de interés; en la que dicha primera parte y dicha segunda parte están separadas por al menos un conector peptídico escindible;

35 b) transformar una célula huésped de expresión con la construcción genética de (a);

c) crecer la célula huésped transformada de (b) en condiciones en las que la construcción genética se exprese y el péptido de fusión codificado se produzca en una forma insoluble;

d) recuperar el péptido de fusión en dicha forma insoluble;

40 e) escindir dicho al menos un conector peptídico escindible mediante lo cual dicha primera parte del péptido de fusión no está ya fusionada con dicha segunda parte; y

f) recuperar dicho péptido de interés.

En otra realización, la invención proporciona una construcción genética quimérica que codifica una proteína de fusión que comprende al menos una de las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión y al menos un péptido de interés.

45 En otra realización más, la invención proporciona vectores de expresión y células huésped microbianas que comprenden las presentes construcciones genéticas quiméricas.

Descripción breve de las figuras

La Figura 1 es un alineamiento CLUSTALW de varias de las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión. Las regiones que representan la secuencia central están subrayadas.

5 La Figura 2 es un diagrama de del plásmido de expresión pLX121. La construcción de pLX121 se describe en la Publ. solíc. Patente U.S. No. 2008/0206809.

La Figura 3 es un diagrama del plásmido de expresión pSF032.

La Figura 4 es un diagrama del plásmido de expresión pLR186.

La Figura 5 es un diagrama del plásmido de expresión pSF043.

Descripción breve de las secuencias biológicas

10 Las secuencias siguientes cumplen con 37 C.F.R. 1.821-1.825 ("Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures - the Sequence Rules") y son consistentes con el Estándar ST.25 de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (WIPO) (1998) y los requerimientos de listado de secuencias de EPC y PCT (Normas 5.2 y 49.5 (a-bis) y Sección 208 y Anejo C de las Instrucciones Administrativas). Los
15 símbolos y formato usados para los datos de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos cumplen con las normas mostradas en 37 C.F.R §1.822.

La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos del plásmido pLX121.

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de nucleótidos del plásmido pSF032.

La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos del péptido de unión a pelo A09.

La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos del péptido de unión a pelo KF11.

20 La SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos del péptido de unión a pelo D21'.

La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de ácido nucleico que codifica HC77607.

La SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de HC77607.

La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de ácido nucleico que codifica HC77638.

La SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de HC77638.

25 La SEQ ID NO: 10 es la secuencia de ácido nucleico que codifica HC77643.

La SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de HC77643.

La SEQ ID NO: 12 es la secuencia de ácido nucleico que codifica HC77681.

La SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de HC77681.

La SEQ ID NO: 14 es la secuencia de ácido nucleico que codifica IBT 103.

30 La SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de IBT 103.

La SEQ ID NO: 16 es la secuencia de ácido nucleico que codifica IBT 136.

La SEQ ID NO: 17 es la secuencia de aminoácidos de IBT 136 y el péptido P₁₁-II descrito en Aggeli et al. (PNAS 98(21): 11857-11862 (2001).

La SEQ ID NO: 18 es la secuencia de ácido nucleico que codifica IBT 138.

35 La SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácidos de IBT 138.

La SEQ ID NO: 20 es la secuencia de ácido nucleico que codifica IBT 139.

La SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácidos de IBT 139.

ES 2 439 702 T3

- La SEQ ID NO: 22 es la secuencia de ácido nucleico que codifica HC776124.
- La SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácidos de HC776124.
- La SEQ ID NO: 24 es la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de fusión IBT 139.HC776124.
- La SEQ ID NO: 25 es la secuencia de aminoácidos de IBT 139.HC776124.
- 5 La SEQ ID NO: 26 es la secuencia de ácido nucleico que codifica IBT 186.
- La SEQ ID NO: 27 es la secuencia de aminoácidos de IBT 186.
- La SEQ ID NO: 28 es la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de fusión IBT 186.HC776124.
- La SEQ ID NO: 29 es la secuencia de aminoácidos de IBT 186.HC776124.
- La SEQ ID NO: 30 es la secuencia de ácido nucleico que codifica IBT 139.CCPGCC.
- 10 La SEQ ID NO: 31 es la secuencia de aminoácidos de IBT 139.CCPGCC.
- La SEQ ID NO: 32 es la secuencia de ácido nucleico que codifica el resto de cisteína entrecruzable CCPGCC.
- La SEQ ID NO: 33 es la secuencia de aminoácidos del resto de cisteína entrecruzable CCPGCC.
- Las SEQ ID NOs: 34-35 son las secuencias de ácido nucleico de los oligonucleótidos usados para preparar IBT 139.CCPGCC.
- 15 La SEQ ID NO: 36 es la secuencia de ácido nucleico del péptido de fusión IBT 139.CCPGCC.HC776124.
- La SEQ ID NO: 37 es la secuencia de aminoácidos del péptido de fusión IBT 139.CCPGCC.HC776124.
- La SEQ ID NO: 38 es la secuencia de ácido nucleico que codifica IBT 182.
- La SEQ ID NO: 39 es la secuencia de aminoácidos de IBT 182.
- La SEQ ID NO: 40 es la secuencia de ácido nucleico que codifica IBT 183.
- 20 La SEQ ID NO: 41 es la secuencia de aminoácidos de IBT 183.
- La SEQ ID NO: 42 es la secuencia de ácido nucleico que codifica IBT 184.
- La SEQ ID NO: 43 es la secuencia de aminoácidos de IBT 184.
- La SEQ ID NO: 44 es la secuencia de ácido nucleico que codifica IBT 185.
- La SEQ ID NO: 45 es la secuencia de aminoácidos de IBT 185.
- 25 La SEQ ID NO: 46 es la secuencia de ácido nucleico que codifica IBT 187a.
- La SEQ ID NO: 47 es la secuencia de aminoácidos de IBT 187a.
- La SEQ ID NO: 48 es la secuencia de ácido nucleico que codifica IBT 187b.
- La SEQ ID NO: 49 es la secuencia de aminoácidos de IBT 187b.
- La SEQ ID NO: 50 es la secuencia de ácido nucleico del plásmido pSF043.
- 30 La SEQ ID NO: 51 es la secuencia de ácido nucleico del plásmido pLR186.
- La SEQ ID NO: 52 es la secuencia de ácido nucleico del KSI(C4).
- La SEQ ID NO: 53 es la secuencia de aminoácidos de KSI(C4).
- La SEQ ID NO: 54 es la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de fusión KSI (C4)-HC7643.
- La SEQ ID NO: 55 es la secuencia de aminoácidos del péptido de fusión KSI (C4)-HC77643.

Las SEQ ID NOs: 56-57 son las secuencias de aminoácidos de espaciadores usados en las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión.

La SEQ ID NO: 58 es la secuencia de aminoácidos de la secuencia central encontrada en las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión.

5 Las SEQ ID NOs: 59-147 son las secuencias de aminoácidos de péptidos de unión a pelo.

Las SEQ ID NOs: 148-155 son las secuencias de aminoácidos de péptidos de unión a la piel.

Las SEQ ID NOs: 156-157 son las secuencias de aminoácidos de péptidos de unión a uñas.

Las SEQ ID NOs: 158-186 son las secuencias de aminoácidos de péptidos antimicrobianos.

10 Las SEQ ID NOs: 187-211 son las secuencias de aminoácidos de péptidos de unión a pigmento. Específicamente, SEQ ID NOs: 187-190 se unen a negro carbón, SEQ ID NOs: 191-199 se unen a CROMOPHTAL® amarillo (Ciba Specialty Chemicals, Basilea, Suiza), SEQ ID NOs: 200-202 se unen a SUNFAST® magenta (Sun Chemical Corp., Parsippany, NJ) y SEQ ID NOs: 203-211 se unen a SUNFAST® azul.

Las SEQ ID NOs: 212-217 son péptidos de unión a celulosa.

15 Las SEQ ID NOs: 218-244 son las secuencias de aminoácidos de péptidos de unión a polímeros. Específicamente, SEQ ID NO: 218 se une a poli(etilen tereftalato), SEQ ID NOs: 219-229 se unen a poli(metil metacrilato), SEQ ID NOs: 230-235 se unen a Nilón y SEQ ID NOs: 236-244 se unen a poli(tetrafluoroetileno).

Las SEQ ID NOs: 245-260 son las secuencias de aminoácidos de péptidos de unión a arcilla.

La SEQ ID NO: 261 es la secuencia de aminoácidos de la secuencia de escisión de Caspasa-3.

20 La SEQ ID NO: 262 es la secuencia de aminoácidos de la etiqueta de cuerpo de inclusión preferida de la invención que comprende un espaciador.

La SEQ ID NO: 263 es la secuencia de ácido nucleico del plásmido pLR435.

La SEQ ID NO: 264 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la etiqueta de cuerpo de inclusión IBT 139(5C).

La SEQ ID NO: 265 es la secuencia de aminoácidos de la etiqueta de cuerpo de inclusión IBT 139(5C).

La SEQ ID NO: 266 es la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de fusión IBT 139(5C).HC776124.

25 La SEQ ID NO: 267 es la secuencia de aminoácidos del péptido de fusión IBT 139(5C).HC776124.

Las SEQ ID NOs: 268-307 son las secuencias de aminoácidos de péptidos de unión a dientes (Solicitud de Patente U.S. No. 11/877.692).

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención describe un conjunto de etiquetas peptídicas (etiquetas de cuerpo de inclusión) que pueden acoplarse con un péptido de interés para formar un péptido de fusión. El péptido de fusión, así ensamblado, se expresa en forma insoluble y se acumula en cuerpos de inclusión en la célula huésped que lo expresa. Los cuerpos de inclusión se recuperan y se escinden posteriormente para separar el péptido de interés de la etiqueta de cuerpo de inclusión. En una realización preferida, la proteína de fusión comprende al menos un conector peptídico escindible que separa la etiqueta de cuerpo de inclusión del péptido de interés. En otra realización preferida, el conector peptídico escindible
35 comprende al menos un resto ácido aspártico-prolina escindible con ácido.

En una realización preferida adicional, la etiqueta de cuerpo de inclusión comprende un número eficaz de residuos de cisteína entrecruzables útiles durante el procesamiento posterior para separar la etiqueta de cuerpo de inclusión del péptido de interés. En una realización preferida adicional más, la etiqueta de cuerpo de inclusión comprende al menos un resto de cisteína entrecruzable CCPGCC (SEQ ID NO: 33) en el extremo amino y/o carboxi de la IBT.

40 La invención es útil para la expresión y recuperación de cualquier péptido y proteína bioactivo que se expresa recombinantemente. Dichas proteínas tienen típicamente un alto valor en varias aplicaciones incluyendo, pero no limitado a, aplicaciones médicas, biomédicas, de diagnóstico, de cuidado personal y de afinidad en las que los péptidos de interés se usan como conectores a varias superficies.

Las definiciones siguientes se usan en la presente memoria y debe hacerse referencia a ellas para la interpretación de las reivindicaciones y la especificación.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "que comprende" significa la presencia de las características, números enteros, etapas o componentes indicados según se refiere en las reivindicaciones, pero esto no descarta la presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas, componentes o grupos de éstos.

10 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a modificar la cantidad de un ingrediente o reactante de la invención o empleado se refiere a la variación en la cantidad numérica que puede ocurrir, por ejemplo, mediante los procedimientos típicos de medición y manejo de líquidos usados para preparar concentrados o disoluciones usadas en la mundo real; mediante error inadvertido en estos procedimientos; mediante diferencias en la fabricación, fuente o pureza de los ingredientes empleados para preparar las composiciones o llevar a cabo los métodos; y semejantes. El término "aproximadamente" también engloba cantidades que son diferentes debido a diferentes condiciones de equilibrio para una composición que resulta de una mezcla inicial particular.

15 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "molécula de ácido nucleico aislada" es un polímero de ARN o ADN que es mono o bicatenario, que contiene opcionalmente bases nucleotídicas sintéticas, no naturales o alteradas. Una molécula de ácido nucleico aislada en la forma de un polímero de ADN puede estar comprendida por uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "pigmento" se refiere a un colorante insoluble, orgánico o inorgánico.

20 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "pelo" como se usa en la presente memoria se refiere a pelo humano, cejas y pestañas.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "piel" como se usa en la presente memoria se refiere a piel humana o sustitutos para la piel humana, tal como piel de cerdo, VITRO-SKIN® y EPIDERM™. La piel, tal y como se usa en la presente memoria, se referirá a una superficie corporal que comprende generalmente una capa de células epiteliales y puede comprender además una capa de células endoteliales.

25 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "uñas" como se usa en la presente memoria se refiere a uñas humanas de los dedos de las manos y dedos de los pies.

30 Tal y como se usa en la presente memoria, "TBP" significa péptido de unión a diente. Un péptido de unión a diente es un péptido que se une con alta afinidad a una superficie dental de mamífero o humana. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "péptido de unión a diente" se referirá a un péptido que se une al esmalte dental o película dental. En una realización, los péptidos de unión a diente tienen una longitud de aproximadamente 7 aminoácidos hasta aproximadamente 50 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de aproximadamente 7 aminoácidos hasta aproximadamente 25 aminoácidos, lo más preferiblemente una longitud de aproximadamente 7 aminoácidos hasta aproximadamente 20 aminoácidos. En una realización preferida, los péptidos de unión a diente son péptidos generados combinatoriamente.

35 Los ejemplos de péptidos de unión a diente se han descrito en Publ. Solic. U.S. en tramitación con la presente y en co-propiedad No. 2008/0280810. En una realización preferida, el péptido de unión a diente se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 268-307.

40 El término "superficie dental" se referirá a una superficie comprendida por esmalte dental (expuesto típicamente después de limpieza o pulido profesional) o película dental (una superficie adquirida que comprende glicoproteínas salivares). Puede recubrirse hidroxiapatito con glicoproteínas salivares para mimetizar una superficie de película dental natural (el esmalte dental está comprendido principalmente por hidroxiapatito).

45 Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "película" y "película dental" se referirán a la película delgada (que varía típicamente de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 200 µm de espesor) derivada de glicoproteínas salivares que se forma sobre la superficie de la corona dental. El cepillado de dientes diario tiende a eliminar sólo una parte de la superficie de la película mientras que la limpieza de dientes abrasiva y/o el pulido (típicamente por un odontólogo profesional) expondrá más de la superficie del esmalte dental.

50 Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "esmalte" y "esmalte dental" se referirán al tejido altamente mineralizado que forma la capa externa del diente. La capa de esmalte está compuesta principalmente por fosfato de calcio cristalino (es decir, hidroxiapatito; $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) junto con agua y algún material orgánico. En una realización, la superficie de los dientes se selecciona el grupo que consiste en esmalte dental y película dental.

Tal y como se usa en la presente memoria, "PBP" significa péptido de unión a polímeros. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "péptido de unión a polímeros" se refiere a secuencias peptídicas que se unen con alta afinidad a un polímero específico (Publ. Solic. Patente U.S. No. 2008/0206809).

5 Los ejemplos incluyen péptidos que se unen a poli(etilen tereftalato) (SEQ ID NO: 218), poli(metil metacrilato) (SEQ ID NOs: 219-229), Nilón (SEQ ID NOs: 230-235) y poli(tetrafluoroetileno) (SEQ ID NOs: 236-244).

10 Tal y como se usa en la presente memoria, "HBP" significa péptido de unión a pelo. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "péptido de unión a pelo" se refiere a secuencias peptídicas que se unen con alta afinidad al pelo. El péptido de unión a pelo puede estar comprendido por un único dominio de unión a pelo o múltiples dominios de unión en los que al menos uno de los dominios de unión se une al pelo (es decir, péptidos multi-bloque). Se han publicado ejemplos de péptidos de unión a pelo (Publ. Solic. Patente U.S. No. 2005/0226839 de Huang *et al.*; WO 0179479; Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2002/0098524 de Murray *et al.*; Janssen *et al.*, Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2003/0152976 de Janssen *et al.*; WO 2004048399; Publ. Solic. U.S. No. 2007/0067924 y Publ. Solic. Patente U.S. No. 2007/0249805. Los ejemplos de péptidos de unión a pelo se proporcionan como SEQ ID NOs: 3-5, 7, 9, 11, 13, 23 y 59-147.

15 Tal y como se usa en la presente memoria, "SBP" significa péptido de unión a piel. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "péptido de unión a piel" se refiere a secuencias peptídicas que se unen con alta afinidad a la piel. También se han publicado ejemplos de péptidos de unión a piel (Publ. Solic. Patente U.S. No. 2007/0274931 de Buseman-Williams; Rothe *et al.*, WO 2004/000257; y Publ. Solic. Patente U.S. No. 2007/0249805). Piel tal y como se usa en la presente memoria como una superficie corporal comprenderá generalmente una capa de células epiteliales y puede comprender además una capa de células endoteliales. Los ejemplos de péptidos de unión a piel se proporcionan como SEQ ID NOs: 148-155.

20

Tal y como se usa en la presente memoria, "NBP" significa péptido de unión a uñas. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "péptido de unión a uñas" se refiere a secuencias peptídicas que se unen con alta afinidad a la uña. Se han publicado ejemplos de péptidos de unión a uñas (Publ. Solic. Patente U.S. No. 2007/0249805). Los ejemplos de péptidos de unión a uñas se proporcionan como SEQ ID NOs: 156-157.

25

Tal y como se usa en la presente memoria, un "péptido antimicrobiano" es un péptido que tiene la capacidad de matar poblaciones de células microbianas (Publ. Solic. Patente U.S. No. 2008/0206809).

Los ejemplos de péptidos antimicrobianos se proporcionan como SEQ ID NOs: 158-186.

30 Tal y como se usa en la presente memoria, "péptido de unión a celulosa" se refiere a un péptido que se une con alta afinidad a la celulosa. Los ejemplos de péptidos de unión a celulosa se proporcionan como SEQ ID NOs: 212 a 217.

Tal y como se usa en la presente memoria, "péptido de unión a arcilla" se refiere a un péptido que se une con alta afinidad a la arcilla (Publ. Solic. Patente U.S. No. 2007/0249805). Los ejemplos de péptidos de unión a arcilla se proporcionan como SEQ ID NOs: 245 a 260.

35 Tal y como se usa en la presente memoria, "péptidos multi-bloque" se refiere a un péptido que comprende la menos dos restos de unión. Cada resto de unión tiene una afinidad para un sustrato diana (por ejemplo, pelo, piel, un pigmento, etc). Los restos de unión pueden tener una afinidad para el mismo sustrato o sustratos diferentes (por ejemplo, un resto de unión a pelo fusionado con un resto de unión a pigmento para la administración dirigida de un pigmento al pelo o un péptido que tiene una pluralidad de restos de unión al pelo).

40 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "etiqueta de cuerpo de inclusión" se abreviará como "IBT" y se referirá a un polipéptido que facilita la formación de cuerpos de inclusión cuando se fusiona con un péptido de interés. El péptido de interés es típicamente soluble en la célula huésped y/o lisado de la célula huésped cuando no está fusionado con una etiqueta de cuerpo de inclusión. La fusión del péptido de interés con la etiqueta de cuerpo de inclusión produce una proteína de fusión que se aglomera en cuerpos intracelulares (cuerpos de inclusión) en la célula huésped.

45 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "espaciador" se referirá a un péptido en las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión usado para separar las secuencias centrales (SEQ ID NO: 58). En una realización, el espaciador tiene una longitud de 2-10 aminoácidos, preferiblemente una longitud de 3 a 6 aminoácidos y lo más preferiblemente una longitud de 3 a 4 aminoácidos y está comprendido por aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en prolina, glicina, cisteína, arginina y ácido glutámico. En una realización, el espaciador se selecciona del grupo que consiste en Pro-Arg-Gly, Pro-Cys-Gly, Pro-Arg-Cys-Gly (SEQ ID NO: 56), Pro-Glu-Gly y Pro-Glu-Cys-Gly (SEQ ID NO: 57).

50 Tal y como se usan en la presente memoria, "elementos conectores escindibles", "conectores peptídicos", "conectores peptídicos escindibles" y "sitio de escisión" se usarán indistintamente y se refieren a segmentos peptídicos escindibles

localizados entre la etiqueta de cuerpo de inclusión y el péptido de interés. Después de que los cuerpos de inclusión se separen y/o purifiquen parcialmente o se purifiquen del lisado celular, los elementos conectores escindibles pueden escindirse químicamente y/o enzimáticamente para separar la etiqueta de cuerpo de inclusión del péptido de interés. El péptido de fusión también puede incluir una pluralidad de regiones que codifican uno o más péptidos de interés separadas por uno o más conectores peptídicos escindibles. El péptido de interés puede aislarse entonces de la etiqueta de cuerpo de inclusión, si es necesario. En una realización, la(s) etiqueta(s) de cuerpo de inclusión y el péptido de interés presentan diferentes solubilidades en un medio definido (típicamente un medio acuoso), lo que facilita la separación de la etiqueta de cuerpo de inclusión del polipéptido de interés. En una realización preferida, la etiqueta de cuerpo de inclusión es insoluble en una disolución acuosa mientras que la proteína/polipéptido de interés es soluble de manera apreciable en una disolución acuosa. El pH, temperatura y/o fuerza iónica de la disolución acuosa puede ajustarse para facilitar la recuperación del péptido de interés. En una realización preferida, la solubilidad diferencial entre la etiqueta de cuerpo de inclusión y el péptido de interés ocurre en una disolución acuosa que tiene un pH de 5 a 10 y una temperatura que varía de 15°C a 50°C. El conector peptídico escindible puede tener una longitud de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos, preferiblemente de 1 a aproximadamente 20 aminoácidos. Un ejemplo de un conector peptídico escindible enzimáticamente se proporciona por SEQ ID NO: 261 (secuencia de escisión de Caspasa-3). En una realización preferida, el sitio de escisión es un resto de dipéptido ácido aspártico-prolina (D-P) escindible por ácido. Los conectores peptídicos escindibles pueden incorporarse en las proteínas de fusión usando cualquier número de técnicas muy conocidas en la técnica. En una realización adicional, la presente etiqueta de cuerpo de inclusión comprende un número eficaz de residuos de cisteína entrecruzables mediante lo cual puede usarse entrecruzamiento oxidativo para precipitar selectivamente la IBT una vez escindida del POI.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "número eficaz de residuos de cisteína" y "número eficaz de residuos de cisteína entrecruzables" se usan para describir el número de residuos de cisteína requeridos para obtener entrecruzamiento oxidativo cuando las IBT se someten a condiciones oxidantes. Un experto en la técnica reconocerá que el uso de entrecruzamiento oxidativo para precipitar selectivamente la IBT del POI (después de la escisión del péptido de fusión) requerirá un POI desprovisto de residuos de cisteína. Está dentro de la capacidad de un experto en la técnica variar el número y/o localización de los residuos de cisteína en el péptido de fusión para llevar a la práctica el presente proceso. En una realización, el número eficaz de residuos de cisteína es al menos 3, preferiblemente al menos 4. En otra realización, el número eficaz de residuos de cisteína es 3 a 20, preferiblemente 3 a 10, más preferiblemente 4 a aproximadamente 6 y lo más preferiblemente 4 ó 5 residuos de cisteína entrecruzables.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "entrecruzamiento", "entrecruzamiento oxidativo" y "entrecruzamiento de cisteínas" se refiere al proceso de entrecruzar los grupos tiol de los residuos de cisteína (es decir, formando puentes disulfuro intermoleculares e intramoleculares) en condiciones oxidantes. Por definición, la formación de puentes disulfuro intermoleculares ocurre entre dos o más moléculas (es decir, una "pluralidad") que comprenden un número eficaz de residuos de cisteína entrecruzables. Tal y como se usa en la presente memoria, una "pluralidad" de moléculas se referirá alternativamente en la presente memoria como una "población" de moléculas. Con el fin de estimular el entrecruzamiento intermolecular, un número eficaz (es decir, al menos 3) de residuos de cisteína entrecruzables se incorpora en la etiqueta de cuerpo de inclusión con la condición de que la parte que comprende el POI carece de residuos de cisteína entrecruzables. En una realización preferida, los residuos de cisteína entrecruzables se preparan por ingeniería en la etiqueta de cuerpo de inclusión de manera que el péptido de interés (que no contiene un residuo de cisteína entrecruzable) se aísla como un péptido soluble de las etiquetas de cuerpo de inclusión insolubles, entrecruzadas.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "condiciones oxidantes" se refiere a condiciones de reacción que favorecen y estimulan la formación de puentes disulfuro entre residuos de cisteína. La formación de puentes disulfuro puede inducirse por cualquier número de medios muy conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitado a, poner en contacto los residuos de cisteína entrecruzables con un gas que comprende oxígeno (es decir, oxígeno diatómico y/o triatómico) y/o añadir oxidantes químicos. Se prefiere el uso de gas que comprende oxígeno molecular. En una realización adicional, se hace burbujear y/o se introduce por presión un gas que comprende oxígeno diatómico y/o triatómico a través de la disolución acuosa de reacción durante un periodo de tiempo para conseguir entrecruzamiento oxidativo eficaz. La etapa de entrecruzamiento oxidativo puede incluir opcionalmente el acto de mezclar y/o agitar la mezcla acuosa de reacción para resultados óptimos. Los ejemplos de oxidantes químicos son muy conocidos en la técnica y pueden incluir, pero no están limitados a, compuestos peróxido, hipoclorito, halógenos y sales permanganato; por nombrar algunos.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "condiciones reductoras" se refiere a condiciones de reacción que favorecen y estimulan la reducción de puentes disulfuro entre residuos de cisteína (es decir, rompe el puente disulfuro usado para el entrecruzamiento). Los puentes disulfuro pueden reducirse por cualquier número de medios muy conocidos tales como el uso de purga de nitrógeno y/o un agente reductor químico tal como Na₂SO₃, DTT (ditiotreitól), TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina), 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina, y mezclas de éstos. Generalmente, los agentes

reductores incluyen aquellos que contienen grupos tiol, aquellos que son fosfinas y sus derivados así como sulfitos y tiosulfitos.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "unido de manera operativa" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico de manera que la función de uno se ve afectada por el otro. Por ejemplo, un promotor está unido de manera operativa a una secuencia codificadora cuando es capaz de influir en la expresión de esa secuencia codificadora (es decir, que la secuencia codificadora está bajo el control transcripcional del promotor). En una realización adicional, la definición de "unido de manera operativa" también puede extenderse para describir los productos de genes quiméricos, tales como péptidos de fusión. Como tal, "unido de manera operativa" también se referirá a la unión de una etiqueta de cuerpo de inclusión a un péptido de interés que se quiere producir y recuperar. La etiqueta de cuerpo de inclusión está "unida de manera operativa" al péptido de interés si después de la expresión, la proteína de fusión es insoluble y se acumula como cuerpos de inclusión en la célula huésped que la expresa.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "proteína de fusión", "péptido de fusión", "proteína quimérica" y "péptido quimérico" se usarán indistintamente y se referirán a un polímero de aminoácidos (péptido, oligopéptido, polipéptido o proteína) que comprende al menos dos partes, comprendiendo cada parte una función distinta. Al menos una primera parte del péptido de fusión comprende al menos una de las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión. Al menos una segunda parte del péptido de fusión comprende al menos un péptido de interés.

Los medios para preparar los presentes péptidos (etiquetas de cuerpo de inclusión, conectores peptídicos escindibles, péptidos de interés, péptidos espaciadores y péptidos de fusión) son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1984; Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Nueva York, 1984; y Pennington et al., Peptide Synthesis Protocols, Humana Press, Totowa, NJ, 1994). Los distintos componentes de los péptidos de fusión (etiqueta de cuerpo de inclusión, péptido de interés y la secuencia conectora/de escisión escindible) descritos en la presente memoria pueden combinarse usando agentes de acoplamiento carbodiimida (véase, por ejemplo, Hermanson, Greg T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, Nueva York (1996)), cloruros de diácido, diisocianatos y otros reactivos de acoplamiento bifuncionales que son reactivos frente a grupos amino y/o ácido carboxílico terminales en los péptidos. Sin embargo, la síntesis química está frecuentemente limitada a péptidos con una longitud de menos de aproximadamente 50 aminoácidos debido a coste y/o impurezas. En una realización preferida, las moléculas biológicas (IBT, POI, péptidos de fusión, etc) descritas en la presente memoria se preparan usando técnicas estándar de ADN recombinante y de clonación molecular.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "polipéptido" y "péptido" se usarán indistintamente para referirse a un polímero de dos o más aminoácidos unidos entre sí por un enlace peptídico, en el que el péptido tiene una longitud no especificada, así, los péptidos, oligopéptidos, polipéptidos y proteínas están incluidos en la presente definición. En un aspecto, este término también incluye modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y semejantes. En la definición están incluidos, por ejemplo, péptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido o aminoácidos marcados y peptidomiméticos. En una realización preferida, las presentes IBT están comprendidas por L-aminoácidos.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "proteína de interés", "polipéptido de interés", "péptido de interés", "proteína diana", "polipéptido diana", "péptido diana", "proteína expresable" y "polipéptido expresable" se usarán indistintamente y se refieren a una proteína, polipéptido o péptido que es bioactivo y puede expresarse por la maquinaria genética de una célula huésped.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "bioactivo" o "actividad del péptido de interés" se refiere a la actividad o característica asociada con el péptido y/o proteína de interés. Los péptidos bioactivos pueden usarse en una variedad de aplicaciones incluyendo, pero no limitado a, agentes curativos para enfermedades (por ejemplo, insulina, interferón, interleuquinas, péptidos anti-angiogénicos (Patente U.S. 6.815.426) y polipéptidos que se unen a dianas celulares definidas (con la condición de que el péptido de interés no sea un anticuerpo o el fragmento F_{ab} de un anticuerpo) tales como receptores, canales, lípidos, proteínas citosólicas y proteínas de membrana, por nombrar algunos), péptidos que tienen actividad antimicrobiana, péptidos que tienen una afinidad para un material particular (por ejemplo, polipéptidos de unión a pelo, polipéptidos de unión a la piel, polipéptidos de unión a uñas, polipéptidos de unión a celulosa, polipéptidos de unión a polímeros, polipéptidos de unión a arcilla, polipéptidos de unión a sílice, polipéptidos de unión a nanotubos de carbono y péptidos que tienen una afinidad para tejidos particulares de animales o plantas) para la administración dirigida de agentes beneficiosos. El péptido de interés típicamente no tiene más de 300 aminoácidos de longitud, preferiblemente menos de 200 aminoácidos de longitud, y lo más preferiblemente menos de 100 aminoácidos de longitud. En una realización preferida, el péptido de interés es un péptido seleccionado de una biblioteca generada de manera combinatoria en la que el péptido se selecciona tomando como base una afinidad específica para un sustrato diana.

Tal y como se usa en la presente memoria, el "agente beneficioso" se refiere a una molécula que confiere una funcionalidad deseada a un complejo que implica el péptido de interés para una aplicación definida. El agente beneficioso puede ser el péptido de interés en sí mismo o puede ser una o más moléculas unidas a (covalentemente o no covalentemente) o asociadas con el péptido de interés, en el que la afinidad de unión del polipéptido diana se usa para dirigir selectivamente el agente beneficioso al material diana. En otra realización, el polipéptido diana comprende al menos una región que tiene una afinidad para al menos un material diana (por ejemplo, moléculas biológicas, polímeros, pelo, piel, uña, arcillas, otros péptidos, etc.) y al menos una región que tienen una afinidad para el agente beneficioso (por ejemplo, agentes farmacéuticos, pigmentos, acondicionadores, colorantes, fragancias, etc.). En otra realización, el péptido de interés comprende una pluralidad de regiones que tienen una afinidad para el material diana y una pluralidad de regiones que tienen una afinidad para el agente beneficioso. En otra realización más, el péptido de interés comprende al menos una región que tiene una afinidad para un material diana y una pluralidad de regiones que tienen una afinidad para una variedad de agentes beneficiosos en el que los agentes beneficiosos pueden ser el mismo o diferentes. Los ejemplos de agentes beneficiosos pueden incluir, pero no están limitados a, acondicionadores para productos de cuidado personal, pigmentos, colorantes, fragancias, agentes farmacéuticos (por ejemplo, administración dirigida de agentes de tratamiento del cáncer), agentes de diagnóstico/marcaje, agentes bloqueantes de la luz ultravioleta (es decir, agentes activos en protectores con pantalla solar) y agentes antimicrobianos (por ejemplo, péptidos antimicrobianos), por nombrar algunos.

Tal y como se usa en la presente memoria, un "cuerpo de inclusión" es un depósito intracelular amorfo que comprende proteína agregada que se encuentra en el citoplasma de una célula. Los péptidos de interés que son típicamente solubles en la célula huésped y/o lisados celulares pueden fusionarse con una o más de las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión para facilitar la formación de una proteína de fusión insoluble. En una realización alternativa, el péptido de interés puede ser parcialmente insoluble en la célula huésped pero producirse a niveles relativamente bajos cuando no se produce la formación significativa de cuerpos de inclusión. Como tal, la formación de cuerpos de inclusión incrementará la producción de péptidos. En una realización adicional, la fusión del péptido de interés con una o más etiquetas de cuerpo de inclusión (IBT) incrementa la cantidad de proteína producida en la célula huésped. La formación del cuerpo de inclusión facilita la purificación sencilla y eficaz del péptido de fusión del lisado celular usando técnicas muy conocidas en la técnica tales como centrifugación y filtración. En otra realización, la etiqueta de cuerpo de inclusión comprende un número eficaz de residuos de cisteína entrecruzables útiles para separar la IBT del péptido de interés (después de la escisión en una mezcla de fragmentos peptídicos) con la condición de que el péptido de interés carece de residuos de cisteína. La proteína de fusión incluye típicamente uno o más conectores peptídicos escindibles usados para separar la proteína/polipéptido de interés de la(s) etiqueta(s) de cuerpo de inclusión. El conector peptídico escindible se diseña de manera que la(s) etiqueta(s) de cuerpo de inclusión y la(s) proteína/polipéptido(s) de interés puedan separarse fácilmente escindiendo el elemento conector. El conector peptídico puede escindirse químicamente (por ejemplo, hidrólisis ácida) o enzimáticamente (es decir, el uso de una proteasa/peptidasa que reconoce preferiblemente un sitio y/o secuencia de escisión de aminoácidos en el conector peptídico escindible).

"Degeneración de codones" se refiere a la naturaleza del código genético que permite la variación de la secuencia de nucleótidos sin afectar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado. De acuerdo con esto, la presente invención se refiere a cualquier fragmento de ácido nucleico que codifica las presentes secuencias de aminoácidos. El experto en la técnica es muy consciente del "sesgo de codones" presentado por una célula huésped específica en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Por lo tanto, cuando se sintetiza un gen para expresión mejorada en una célula huésped, es deseable diseñar el gen de manera que su frecuencia de uso de codones se aproxime a la frecuencia de uso de codones preferido de la célula huésped.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "solubilidad" se refiere a la cantidad de una sustancia que puede disolverse en una unidad de volumen de un líquido en condiciones especificadas. En la presente solicitud, el término "solubilidad" se usa para describir la capacidad de un péptido (etiqueta de cuerpo de inclusión, péptido de interés o péptidos de fusión) de ser resuspendido en un volumen de disolvente, tal como un tampón biológico. En una realización, los péptidos diana para la producción ("péptidos de interés") son solubles normalmente en la célula y/o lisado celular en condiciones fisiológicas normales. La fusión de una o más etiquetas de cuerpo de inclusión (IBT) con el péptido diana resulta en la formación de un péptido de fusión que es insoluble en condiciones fisiológicas normales, lo que resulta en la formación de cuerpos de inclusión. En una realización, el péptido de interés es insoluble en una matriz acuosa que tiene un intervalo de pH de 5-12, preferiblemente 6-10; y un intervalo de temperatura de 5°C a 50°C, preferiblemente 10°C a 40°C.

El término "aminoácido" se refiere a la unidad estructural química básica de una proteína o polipéptido. Las abreviaturas siguientes se usan en la presente memoria para identificar aminoácidos específicos:

55

Aminoácido	Abreviatura de Tres Letras	Abreviatura de Una Letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V
Cualquier aminoácido natural	Xaa	X

(o como se define en la presente memoria)

"Gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, incluyendo secuencias reguladoras que preceden a (secuencia no codificadoras en 5') y están después de (secuencias no codificadoras en 3') la secuencia codificadora. "Gen nativo" se refiere a un gen como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. "Gen quimérico" se refiere a cualquier gen que no es un gen nativo, que comprende secuencias reguladoras y codificadoras (incluyendo regiones codificadoras preparadas por ingeniería para codificar péptidos de fusión) que no se encuentran conjuntamente en la naturaleza. De acuerdo con esto, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que derivan de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que derivan de la misma fuente pero organizadas de una manera diferente de la encontrada en la naturaleza. Un gen "extraño" se refiere a un gen que normalmente no se encuentra en el organismo huésped, pero que se introduce en el organismo huésped por transferencia génica. Los genes extraños pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo, o genes quiméricos.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "secuencia codificadora" se refiere a una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos específica. "Secuencias reguladoras adecuadas" se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas aguas arriba (secuencias no codificadoras en 5'), en, o aguas abajo (secuencias no codificadoras en 3') de una secuencia codificadora y que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad del ARN o traducción de la secuencia codificadora asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, potenciadores, sitios de unión a ribosomas, secuencias líder de la traducción, intrones, secuencias de reconocimiento de poliadenilación, sitio de procesamiento de ARN, sitios de unión de efectores y estructuras en horquilla. Un experto en la técnica reconoce que la selección de secuencias reguladoras adecuadas dependerá de la célula huésped y/o del sistema de expresión usado.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "construcción genética" se refiere a una serie de ácidos nucleicos contiguos útiles para modular el genotipo o fenotipo de un organismo. Los ejemplos no limitativos de construcciones genéticas incluyen pero no están limitados a una molécula de ácido nucleico y marco de lectura abierto, un gen, un plásmido y semejantes.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "rango de expresión" significa el rendimiento relativo de proteína de fusión insoluble estimado visualmente y puntuado en una escala relativa de 0 (sin péptido de fusión insoluble) a 3 (rendimiento máximo de péptido de fusión insoluble). Un experto en la técnica puede usar cualquier número de medios para evaluar la formación de cuerpos de inclusión con una célula huésped recombinante. Como se describe en los presentes ejemplos, el rendimiento relativo del péptido de fusión insoluble se estimó visualmente a partir de geles de poliacrilamida teñidos. Cualquier IBT capaz de generar un rango de expresión por encima de cero (es decir, 1, 2, ó 3) se considera una etiqueta de solubilidad eficaz. A la inversa, las etiquetas de solubilidad eficaces también pueden identificarse usando una evaluación cualitativa (es decir, cuerpos de inclusión observados).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "célula huésped" se refiere a una célula que se ha transformado o transfectado, o que es capaz de transformación o transfección, con una secuencia polinucleotídica exógena.

15 Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "plásmido", "vector" y "casete" se refieren a un elemento extracromosómico que frecuentemente porta genes que no son parte del metabolismo central de la célula y habitualmente en la forma de moléculas de ADN bicatenarias circulares. Dichos elementos pueden ser secuencias con replicación autónoma, secuencias que se integran en el genoma, secuencias de fago o nucleótido, lineales o circulares de un ADN o ARN mono o bicatenario, derivadas de cualquier fuente, en las que un número de secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado en una construcción única que es capaz de introducir un fragmento de promotor y secuencia de ADN para un producto génico seleccionado junto con secuencia no traducida en 3' apropiada en una célula. "Casete de transformación" se refiere a un vector específico que contiene un gen extraño y que tiene elementos además del gen extraño que facilita la transformación de una célula huésped particular. "Casete de expresión" se refiere a un vector específico que contiene un gen extraño y que tiene elementos además del gen extraño que permiten una expresión aumentada de ese gen en un huésped extraño.

Las técnicas estándar de ADN recombinante y clonación molecular usadas en la presente memoria son muy conocidas en la técnica y se describen por Sambrook, J. y Russell, D., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001); y por Silhavy, T.J., Bennan, M.L. y Enquist, L.W., *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory Cold Press Spring Harbor, NY (1984); y por Ausubel, F.M. et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 5ª Ed. Current Protocols y John Wiley and Sons, Inc., N.Y., 2002.

Etiquetas de cuerpo de inclusión

Las proteínas semejantes a amiloide tienen a tener morfologías fibrilares amiloides y las proteínas agregadas presentan frecuentemente una arquitectura de lámina β en cintas. Se ha descrito un péptido sintético de 11 aminoácidos (es decir, péptido "P11-2"; también conocido como péptido "DN1") capaz de autoensamblarse en láminas β en cintas, cintas en flecha, fibrillas y fibras en agua (Aggeli et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 125: 9619-9628 (2003); Aggeli et al., *PNAS*, 98 (21): 11857-11862 (2001); Aggeli et al., *Nature*, 386: 259-262 (1997); y Aggeli et al., *J. Mater Chem*, 7 (7): 1135-1145 (1997).

El péptido P11-2 (idéntico a IBT-136; SEQ ID NO: 17) se seleccionó como el material de partida para la preparación de una familia de etiquetas de cuerpo de inclusión estructuralmente relacionadas que comprende al menos dos copias de la secuencia central Gln-Gln-Xaa1-Phe-Xaa2-Trp-Xaa3-Phe-Xaa4-Xaa5-Gln (SEQ ID NO: 58) en la que Xaa1= Arg, His o Lys; Xaa2= Gln, His o Lys; Xaa3= Gln, His o Lys; Xaa4= Glu o Gln; y Xaa5= Gln o Lys (véase la parte en negrita de la Fórmula 1, más adelante).

Se preparó y se evaluó una serie de análogos de IBT-136. Se adoptaron varias estrategias incluyendo variar el número de copias, alterar la carga de la etiqueta, alterar la composición de los elementos espaciadores que separan las secuencias centrales y alterar el número de residuos/restos de cisteína entrecruzables. Se insertó una secuencia espaciadora corta entre las secuencias centrales. En una realización, el "espaciador" de Fórmula 1 es un péptido con una longitud de 2 a 10 aminoácidos, preferiblemente una longitud de 3 a 6 aminoácidos y lo más preferiblemente una longitud de 3 a 4 aminoácidos y está comprendido por aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en prolina, glicina, cisteína, arginina y ácido glutámico. En una realización más, las secuencias "espaciadoras" se seleccionan del grupo que consiste en Pro-Arg-Gly, Pro-Cys-Gly, Pro-Arg-Cys-Gly (SEQ ID NO: 56), Pro-Glu-Gly, y Pro-Glu-Cys-Gly (SEQ ID NO: 57).

La estructura de las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión se define por la Fórmula 1 (se usan abreviaturas de 3 letras de los distintos aminoácidos a no ser que se indique otra cosa).

Fórmula 1. Gln-Gln-Xaa1-Phe-Xaa2-Trp-Xaa3-Phe-Xaa4-Xaa5-Gln-Espaciador-[[Gln-Gln-Xaa1-Phe-Xaa2-Trp-Xaa3-Phe-Xaa4-Xaa5-Gln]-[Espaciador]_m]_n (SEQ ID NO: 262)

en la que

Xaa1= Arg, His o Lys;

5 Xaa2= Gln, His o Lys;

Xaa3= Gln, His o Lys;

Xaa4= Glu o Gln;

Xaa5= Gln o Lys;

n=1 a 10;

10 m= n-1; y

en la que el Espaciador= es un péptido que comprende aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en prolina, arginina, glicina, ácido glutámico y cisteína.

En una realización preferida, n= 1 a 3.

15 Cada una de las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión se unió de manera operativa a un péptido de interés (POI) corto que es soluble de manera apreciable en la célula huésped en condiciones fisiológicas normales. Las proteínas/péptidos de fusión resultantes se produjeron como cuerpos de inclusión insolubles. Cada péptido de fusión se expresó recombinantemente en una célula huésped apropiada y se evaluó para formación de péptido de fusión insoluble. Los medios para determinar la formación de los cuerpos de inclusión son conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitado a, técnicas de separación y análisis en gel (por ejemplo, SDS-PAGE).

20 En otra realización, la etiqueta de cuerpo de inclusión comprende además al menos un resto de cisteína entrecruzable (CCPGCC; SEQ ID NO: 33). En una realización adicional, el al menos un resto de cisteína entrecruzable está localizado en el extremo amino y/o carboxi de la etiqueta de cuerpo de inclusión definida por la Fórmula 1.

25 En otra realización, la etiqueta de cuerpo de inclusión se selecciona del grupo que consiste en IBT 103 (SEQ ID NO: 15), IBT 138 (SEQ ID NO: 19), IBT 139 (SEQ ID NO: 21), IBT 139(5C); IBT 139.CCPGCC (SEQ ID NO: 31), IBT 182 (SEQ ID NO: 39), IBT 183 (SEQ ID NO: 41), IBT 184 (SEQ ID NO: 43), IBT 185 (SEQ ID NO: 45), IBT 186 (SEQ ID NO: 27), IBT 187a (SEQ ID NO: 47) e IBT 187b (SEQ ID NO: 49). Un alineamiento CLUSTALW de varias de las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión se proporciona en la Figura 1 (la secuencia central repetida está subrayada).

30 En otra realización, se proporciona una proteína de fusión insoluble que comprende al menos una de las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión (IBT) unida de manera operativa a un péptido de interés (POI) y separada por al menos una secuencia conectora peptídica escindible (CS). En un aspecto preferido, el conector peptídico escindible (CS) comprende al menos un resto ácido aspártico-prolina (Asp-Pro) escindible por ácido.

IBT-CS-POI

o

POI-CS-IBT

35 En una realización preferida, el péptido de fusión comprende una etiqueta de cuerpo de inclusión que comprende un número eficaz de residuos de cisteína entrecruzables. La inclusión de un número eficaz de residuos de cisteína entrecruzables es útil para precipitar y separar selectivamente la etiqueta de cuerpo de inclusión del péptido de interés durante el procesamiento. Después de la escisión del péptido de fusión, la mezcla de fragmentos (IBT y POI) se somete a condiciones oxidantes durante un periodo de tiempo suficiente para entrecruzar el número eficaz de residuos de cisteína incorporados en la IBT. El entrecruzamiento oxidativo precipita selectivamente las IBT del péptido de interés soluble con la condición de que el péptido de interés carezca de residuos de cisteína entrecruzables.

40 Las IBT que comprenden residuos de cisteína pueden usarse eficazmente como etiquetas de solubilidad en combinación con un péptido de interés que tiene residuos de cisteína entrecruzables. Sin embargo, en dichas situaciones se omitirá típicamente una etapa de entrecruzamiento oxidativo durante el aislamiento posterior del POI.

45 **Péptidos de interés expresables**

- El péptido de interés ("péptido expresable") diana para la producción usando el presente método es un péptido lineal que es soluble de manera apreciable en la célula huésped y/o lisado líquido de la célula huésped en condiciones fisiológicas normales. En un aspecto preferido, los péptidos de interés son generalmente cortos (con una longitud < 300 aminoácidos) y difíciles de producir en cantidades suficientes debido a degradación proteolítica. La fusión del péptido de interés con al menos una de las presentes etiquetas formadoras de cuerpos de inclusión crea un péptido de fusión que es insoluble en la célula huésped y/o lisado de la célula huésped en condiciones fisiológicas normales. La producción del péptido de interés se incrementa típicamente cuando se expresa y acumula en la forma de un cuerpo de inclusión insoluble ya que el péptido está generalmente más protegido de la degradación proteolítica. Además, la proteína de fusión insoluble puede separarse fácilmente del lisado de la célula huésped usando centrifugación o filtración.
- 5
- 10 En general, las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión pueden usarse en un proceso para producir cualquier péptido de interés que es (1) típicamente soluble en la célula y/o lisado celular en condiciones fisiológicas típicas y/o (2) aquellos que pueden producirse en niveles significativamente mayores cuando se expresan en la forma de un cuerpo de inclusión. En una realización preferida, el péptido de interés es soluble de manera apreciable en la célula huésped y/o lisado celular correspondiente en condiciones fisiológicas normales y/o del proceso.
- 15 La longitud del péptido de interés puede variar siempre que (1) el péptido sea soluble de manera apreciable en la célula huésped y/o lisado celular y/o (2) la cantidad del péptido diana producida se incremente significativamente cuando se expresa en la forma de un péptido de fusión/cuerpo de inclusión insoluble (es decir, la expresión en la forma de una proteína de fusión protege al péptido de interés de la degradación proteolítica). Típicamente, el péptido de interés tiene una longitud de menos de 300 aminoácidos, preferiblemente una longitud de menos de 100 aminoácidos, más
- 20 preferiblemente una longitud de menos de 75 aminoácidos, aún más preferiblemente una longitud de menos de 50 aminoácidos y lo más preferiblemente una longitud de menos de 25 aminoácidos.
- La función del péptido de interés no está limitada por el presente método y puede incluir, pero no está limitada a, moléculas bioactivas tales como agentes curativos para enfermedades (por ejemplo, insulina, interferón, interleuquinas, hormonas peptídicas, péptidos anti-angiogénicos y péptidos (con la condición de que el péptido no sea un anticuerpo o una parte F_{ab} de un anticuerpo o un anticuerpo de fragmento variable de cadena única; scFv) que se unen a y afectan dianas celulares definidas tales como receptores, canales, lípidos, proteínas citosólicas y proteínas de membrana; véase Patente U.S. No. 6.696.089), péptidos que tienen una afinidad para un material particular (por ejemplo, tejidos biológicos, moléculas biológicas, péptidos de unión a pelo (Publ. Solic. Patente U.S. No. 2005/0226839; WO 0179479; Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2002/0098524; Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2003/0152976; WO
- 25 04048399; Publ. Solic. Patente U.S. No. 2007/0067924;
- 30 Publ. Solic. Patente U.S. No. 2008/0206809; y Publ. Solic. Patente U.S. No. 2007/0249805), péptidos de unión a la piel (Publ. Solic. Patente U.S. No. 2007/0274931; WO 2004/000257; Publ. Solic. Patente U.S. No. 2008/0206809; y Publ. Solic. Patente U.S. No. 2007/0249805), péptidos de unión a uñas (Publ. Solic. Patente U.S. No. 2005/0226839; Publ. Solic. Patente U.S. No. 2007/0249805), péptidos de unión a celulosa, péptidos de unión a polímeros (Publ. Solic. Patente U.S. Nos. 2007/0141629, 2007/0264720, 2008/0207872, 2007/0141628 y 2007/0261775) y péptidos de unión a arcilla (Publ. Solic. Patente U.S. No. 2007/0249805), para la administración dirigida de al menos un agente beneficioso (véase Publ. Solic. Patente U.S. No. 2005/0050656; Publ. Solic. Patente U.S. No. 2005/0226839; y Publ. Solic. Patente U.S. No. 2007/0249805).
- 35
- 40 En un aspecto preferido, el péptido de interés es un péptido de afinidad identificado de una biblioteca de péptidos generada combinatoriamente. En un aspecto adicional, el péptido se selecciona de una biblioteca generada combinatoriamente, en el que dicha biblioteca se preparó usando una técnica seleccionada del grupo que consiste en exposición en fago, exposición en levadura, exposición en bacteria, exposición en ribosoma y exposición en ARNm.
- En un aspecto preferido, el péptido de interés se selecciona del grupo de péptidos de unión a pelo, péptidos de unión a la piel, péptidos de unión a uñas, péptidos de unión a dientes, péptidos antimicrobianos, péptidos de unión a pigmentos, péptidos de unión a arcilla y péptidos de unión a polímeros. En otro aspecto preferido, el péptido de interés se selecciona del grupo que consiste en un péptido de unión a pelo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 23 y 59-147, un péptido de unión a la piel que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 148 a 155, un péptido de unión a uñas que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 156 y 157 y un péptido de unión a dientes que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 268 a 307. En una realización adicional, el péptido de interés es un péptido de unión a pelo multi-bloque. Los ejemplos de péptidos de unión a pelo multi-bloque incluyen, pero no están limitados a HC77607 (SEQ ID NO: 7), HC77638 (SEQ ID NO: 9), HC77643 (SEQ ID NO: 11), HC77681 (SEQ ID NO: 13) y HC776124 (SEQ ID NO: 23).
- 45
- 50
- 55 Los péptidos de afinidad son particularmente útiles para dirigir agentes beneficiosos que confieren una funcionalidad deseada a un material diana (por ejemplo, pelo, piel, etc.) para una aplicación definida (Publ. Solic. Patente U.S. No.

2005/0050656; Publ. Solic. Patente U.S. No. 2005/0226839; Publ. Solic. Patente U.S. No. 2007/0067924; y Publ. Solic. Patente U.S. No. 2007/0249805 para una lista de agentes beneficiosos típicos tales como acondicionadores, pigmentos/colorantes, fragancias, etc). El agente beneficioso puede ser el péptido de interés en sí mismo o puede ser una o más moléculas unidas a (covalentemente o no covalentemente) o asociadas con, el péptido de interés, en el que la afinidad de unión del péptido de interés se usa para dirigir selectivamente el agente beneficioso al material diana. En otra realización, el péptido de interés comprende al menos una región que tiene una afinidad para al menos un material diana (por ejemplo, moléculas biológicas, polímeros, pelo, piel, uña, otros péptidos, etc.) y al menos una región que tienen una afinidad para el agente beneficioso (por ejemplo, agentes farmacéuticos, agentes antimicrobianos, pigmentos, acondicionadores, colorantes, fragancias, etc.). En otra realización, el péptido de interés comprende una pluralidad de regiones que tienen una afinidad para el material diana y una pluralidad de regiones que tienen una afinidad para el uno o más agentes beneficiosos. En otra realización más, el péptido de interés comprende al menos una región que tiene una afinidad para un material diana y una pluralidad de regiones que tienen una afinidad para una variedad de agentes beneficiosos en el que los agentes beneficiosos pueden ser el mismo o diferentes. Los ejemplos de agentes beneficiosos pueden incluir, pero no están limitados a, acondicionadores para productos de cuidado personal, pigmentos, colorantes, fragancias, agentes farmacéuticos (por ejemplo, administración dirigida de agentes para el tratamiento del cáncer), agentes de diagnóstico/marcaje, agentes bloqueantes de la luz ultravioleta (es decir, agentes activos en protectores con pantalla solar) y agentes antimicrobianos (por ejemplo, péptidos antimicrobianos), por nombrar algunos.

Conectores peptídicos escindibles

El uso de conectores peptídicos escindibles (es decir, sitios de escisión o secuencias de escisión) es muy conocido en la técnica. Los péptidos de fusión que comprenden las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión incluirán típicamente al menos una secuencia escindible que separa la etiqueta de cuerpo de inclusión del polipéptido de interés. La secuencia escindible facilita la separación de la(s) etiqueta(s) de cuerpo de inclusión del o de los péptidos de interés. En una realización, la secuencia escindible puede proporcionarse por una parte de la etiqueta de cuerpo de inclusión y/o el péptido de interés (por ejemplo, inclusión de un resto ácido aspártico-prolina escindible por ácido). En una realización preferida, la secuencia escindible se proporciona mediante la inclusión (en el péptido de fusión) al menos de un conector peptídico escindible entre la etiqueta de cuerpo de inclusión y el péptido de interés.

Los medios para escindir los conectores peptídicos son muy conocidos en la técnica y pueden incluir hidrólisis química, agentes de escisión enzimática y combinaciones de éstos. En una realización, se incluyen uno o más conectores peptídicos escindibles químicamente en la construcción de fusión para facilitar la recuperación del péptido de interés de la proteína de fusión con el cuerpo de inclusión. Los ejemplos de reactivos de escisión química incluyen bromuro de cianógeno (escinde residuos de metionina), N-cloro succinimida, ácido yodobenzoico o BNPS-escatol [2-(2-nitrofenilsulfenil)-3-metilindol] (escinde residuos de triptófano), ácidos diluidos (escinden en enlaces aspartilo-prolilo) e hidroxilamina (escinde en enlaces asparagina-glicina a pH 9,0); véase Gavit, P. y Better, M., J. Biotechnol., 79: 127-136 (2000); Szoka et al., DNA, 5 (1): 11-20 (1986); y Walker, J.M., The Proteomics Protocols Handbook, 2005, Humana Press, Totowa, NJ.). En una realización preferida, uno o más sitios de reconocimiento ácido aspártico-prolina escindibles por ácido (es decir, un conector peptídico escindible que comprende uno o más restos de dipéptido D-P) se incluyen en la construcción de la proteína de fusión para facilitar la separación de la(s) etiqueta(s) de cuerpo de inclusión del péptido de interés. En otra realización, el péptido de fusión puede incluir múltiples regiones que codifican péptidos de interés separados por uno o más conectores peptídicos escindibles.

En otra realización, una o más secuencias de escisión enzimática se incluyen en la construcción de la proteína de fusión para facilitar la recuperación del péptido de interés. Las enzimas proteolíticas y sus especificidades para sitios de escisión respectivas son muy conocidas en la técnica. En una realización preferida, la enzima proteolítica se selecciona para escindir específicamente sólo el conector peptídico que separa la etiqueta de cuerpo de inclusión y el péptido de interés. Los ejemplos de enzimas útiles para escindir el conector peptídico incluyen, pero no están limitados a, Arg-C proteinasa, Asp-N endopeptidasa, quimiotripsina, clostripaína, enteroquinasa, Factor Xa, glutamil endopeptidasa, Granzima B, proteinasa I de Achromobacter, pepsina, prolina endopeptidasa, proteinasa K, peptidasa I de Staphylococcus, termolisina, trombina, tripsina y miembros de la familia Caspasa de enzimas proteolíticas (por ejemplo, Caspasas 1-10) (Walker, J.M., *supra*). Un ejemplo de una secuencia de sitio de escisión se proporciona por SEQ ID NO: 261 (sitio de escisión de Caspasa-3; Thornberry et al., J. Biol. Chem., 272: 17907-17911 (1997) y Tyas et al., EMBO Reports, 1 (3): 266-270 (2000)).

Típicamente la etapa de escisión ocurre después de que los cuerpos de inclusión insolubles y/o los péptidos de fusión insolubles se han aislado del lisado celular. Las células pueden lisarse usando cualquier número de medios muy conocidos en la técnica (por ejemplo, lisis mecánica y/o química). Los métodos para aislar los cuerpos de inclusión/péptidos de fusión insolubles del lisado celular son muy conocidos en la técnica (por ejemplo, centrifugación, filtración y combinaciones de éstos). Una vez recuperados del lisado celular, los cuerpos de inclusión y/o péptidos de fusión insolubles pueden tratarse con un agente de escisión (químico o enzimático) para escindir la etiqueta de cuerpo de inclusión del péptido de interés. En una realización, la proteína de fusión y/o cuerpo de inclusión se diluye y/o disuelve

en un disolvente adecuado antes del tratamiento con el agente de escisión. En una realización adicional, la etapa de escisión puede omitirse si la etiqueta de cuerpo de inclusión no interfiere con la actividad del péptido de interés.

5 Después de la etapa de escisión, y en una realización preferida, el péptido de interés puede separarse y/o aislarse de la proteína de fusión y las etiquetas de cuerpo de inclusión tomando como base una solubilidad diferencial de los componentes. Los parámetros tales como pH, concentración de sal y temperatura pueden ajustarse para facilitar la separación de la etiqueta de cuerpo de inclusión del péptido de interés. En una realización, el péptido de interés es soluble mientras que la etiqueta de cuerpo de inclusión y/o proteína de fusión es insoluble en la matriz del proceso definida (típicamente una matriz acuosa). En otra realización, el péptido de interés es insoluble mientras que la etiqueta de cuerpo de inclusión es soluble en la matriz del proceso definida.

10 En una realización preferida, la etiqueta de cuerpo de inclusión comprende un número eficaz de residuos de cisteína entrecruzables con la condición de que el péptido de interés carezca de residuos de cisteína. Después de la escisión, se usa entrecruzamiento oxidativo para entrecruzar selectivamente las IBT (típicamente insolubles). Las condiciones se controlan de manera que las IBT entrecruzadas sean insolubles mientras que el péptido de interés permanece soluble. El péptido de interés soluble se separa posteriormente de las IBT entrecruzadas usando una técnica de separación sencilla tal como centrifugación y/o filtración.

15 En una realización opcional, el péptido de interés puede purificarse adicionalmente usando cualquier número de técnicas de purificación muy conocidas en la técnica tales como intercambio iónico, técnicas de purificación en gel y cromatografía en columna (véase US 5.648.244), por nombrar algunas.

Péptidos de fusión

20 Las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión se usan para crear polipéptidos quiméricos ("péptidos de fusión" o "proteínas de fusión") que son insolubles en la célula huésped, formando cuerpos de inclusión. La síntesis y expresión de construcciones genéticas expresables que codifican los presentes péptidos de fusión son muy conocidas para un experto en la técnica, dadas las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión.

25 Los presentes péptidos de fusión incluirán al menos una de las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión (IBT) unida de manera operativa al menos a un péptido de interés. Típicamente, los péptidos de fusión también incluirán al menos un conector peptídico escindible que tiene un sitio de escisión entre la etiqueta de cuerpo de inclusión y el péptido de interés. En una realización, la etiqueta de cuerpo de inclusión puede incluir un sitio de escisión mediante lo cual puede no ser necesaria la inclusión de un conector peptídico escindible separado. En una realización preferida, el método de escisión se elige para asegurar que el péptido de interés no se ve afectado adversamente por el o los agentes de escisión empleados. En una realización adicional, el péptido de interés puede modificarse para eliminar posibles sitios de escisión con el péptido siempre que no se vea afectada adversamente la actividad deseada del péptido.

30 Un experto en la técnica reconocerá que los elementos de la proteína de fusión pueden estructurarse de varias maneras. Típicamente, la proteína de fusión incluirá al menos una IBT, al menos un péptido de interés (POI) y al menos un conector peptídico escindible (CL) que comprende un sitio de escisión (CS) localizado entre la IBT y el POI. La etiqueta de cuerpo de inclusión puede estar organizada como una secuencia líder o una secuencia terminadora respecto a la posición del péptido de interés en el péptido de fusión. En otra realización, se usan una pluralidad de IBT, POI y CL cuando se prepara por ingeniería el péptido de fusión. En una realización adicional, el péptido de fusión puede incluir una pluralidad de IBT (como se define en la presente memoria), POI y CL que son iguales o diferentes.

40 El péptido de fusión debe ser insoluble en una matriz acuosa a una temperatura de 10⁰C a 50⁰C, preferiblemente 10⁰C a 40⁰C. La matriz acuosa comprende típicamente un intervalo de pH de 5 a 12, preferiblemente 6 a 10 y lo más preferiblemente 6 a 8. La temperatura, pH y/o fuerza iónica de la matriz acuosa pueden ajustarse para obtener las características de solubilidad deseadas del péptido de fusión/cuerpo de inclusión.

Método para preparar un péptido de interés usando péptidos de fusión insolubles

45 Las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión se usan para preparar péptidos de fusión que forman cuerpos de inclusión en el huésped productor. Este método es particularmente atractivo para producir cantidades significativas del péptido de interés soluble que (1) son difíciles de aislar de otros componentes solubles del lisado celular y/o (2) son difíciles de producir en cantidades significativas en el huésped productor diana.

50 En los presentes métodos, un péptido de interés se fusiona con al menos una de las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión, formando una proteína de fusión insoluble. La expresión de la construcción genética que codifica la proteína de fusión produce una forma insoluble del péptido de interés que se acumula en la forma de cuerpos de inclusión en la célula huésped. La célula huésped se crece durante un periodo de tiempo suficiente para que el péptido de fusión insoluble se acumule en el interior de la célula.

La célula huésped se lisa posteriormente usando cualquier número de técnicas muy conocidas en la técnica. El péptido de fusión/cuerpos de inclusión insolubles se separan de los componentes solubles del lisado celular usando una técnica sencilla y económica tal como centrifugación y/o filtración en membrana. El péptido de fusión/cuerpo de inclusión insoluble puede procesarse entonces con el fin de aislar el péptido de interés. Típicamente, esto incluirá la resuspensión del péptido de fusión/cuerpo de inclusión en una matriz líquida adecuada para escindir el péptido de fusión, separando la etiqueta de cuerpo de inclusión del péptido de interés. La proteína de fusión se diseña típicamente para incluir un conector peptídico escindible que separa la etiqueta de cuerpo de inclusión del péptido de interés. La etapa de escisión puede realizarse usando cualquier número de técnicas muy conocidas en la técnica (escisión química, escisión enzimática y combinaciones de éstas). El péptido de interés puede separarse de la(s) etiqueta(s) de cuerpo de inclusión y/o péptidos de fusión usando cualquier número de técnicas muy conocidas en la técnica (centrifugación, filtración, precipitación, cromatografía en columna, etc.). Preferiblemente, el péptido de interés (una vez escindido del péptido de fusión) tiene una solubilidad que es significativamente diferente de la de la etiqueta de cuerpo de inclusión y/o péptido de fusión remanente. En una realización preferida adicional, se usa entrecruzamiento oxidativo para precipitar selectivamente la IBT (que comprende un número eficaz de residuos de cisteína entrecruzables) del péptido de interés (cuando carece de residuos de cisteína entrecruzables). Como se muestra en la presente memoria, se diseñaron los derivados IBT-136 (es decir, IBT 139.CCPGCC, IBT 139 (5C), IBT 185 e IBT 186) para incluir un número eficaz de residuos de cisteína entrecruzables.

Transformación y expresión

Una vez que la etiqueta de cuerpo de inclusión se ha identificado y emparejado con el péptido de interés apropiado, la construcción de casetes y vectores que pueden transformarse en un huésped de expresión apropiado es común y muy conocida en la técnica. Típicamente, el vector o casete contiene secuencias que dirigen la transcripción y traducción del gen quimérico relevante, un marcador seleccionable y secuencias que permiten la replicación autónoma o integración cromosómica. Los vectores adecuados comprenden una región 5' del gen que porta los controles de inicio de la transcripción y una región 3' del fragmento de ADN que controla la terminación de la transcripción. Lo más preferido es cuando ambas regiones de control derivan de genes homólogos a la célula huésped transformada, aunque debe entenderse que dichas regiones de control no necesitan derivar de los genes nativos de la especie específica elegida como huésped productor.

Las regiones de control del inicio de la transcripción o promotores, que son útiles para dirigir la expresión de las construcciones genéticas que codifican los péptidos de fusión en la célula huésped deseada, son numerosas y familiares para los expertos en la técnica. Virtualmente cualquier promotor capaz de dirigir estas construcciones es adecuado para la presente invención incluyendo pero no limitado a *CYC1*, *HIS3*, *GAL1*, *GAL10*, *ADH1*, *PGK*, *PHO5*, *GAPDH*, *ADC1*, *TRP1*, *URA3*, *LEU2*, *ENO*, *TPI* (útil para la expresión en *Saccharomyces*); *AOX1* (útil para la expresión en *Pichia*); y *lac*, *ara* (*pBAD*), *tet*, *trp*, *IP_L*, *IP_R*, *T7*, *tac*; y *trc* (útil para la expresión en *Escherichia coli*) así como los promotores *amy*, *apr*, *npr* y varios promotores de fago útiles para la expresión en *Bacillus*.

Las regiones de control de la terminación también pueden derivar de varios genes nativos de los huéspedes preferidos. Opcionalmente, puede ser innecesario un sitio de terminación; sin embargo, lo más preferido es que se incluya.

Las células huésped preferidas para la expresión de los presentes péptidos de fusión son huéspedes microbianos que pueden encontrarse ampliamente en las familias de hongos o bacterias y que crecen en un amplio rango de valores de temperatura, pH y tolerancias de disolvente. Por ejemplo, se contempla que cualquier bacteria, levadura y hongo filamentoso serán huéspedes adecuados para la expresión de las presentes moléculas de ácido nucleico que codifican los péptidos de fusión. Como la transcripción, traducción y el aparato biosintético de proteínas es el mismo independientemente de la alimentación celular, los genes se expresan independientemente de la fuente de carbono usada para generar la biomasa celular. El crecimiento microbiano a gran escala y la expresión génica funcional pueden utilizar un amplio rango de carbohidratos simples o complejos, ácidos orgánicos y alcoholes (es decir, metanol), hidrocarburos saturados tales como metano o dióxido de carbono en el caso de huéspedes fotosintéticos o quimioautotróficos. Sin embargo, los genes funcionales pueden regularse, reprimirse o deprimirse por condiciones específicas de crecimiento, que pueden incluir la forma y cantidad de nitrógeno, fósforo, azufre, oxígeno, carbono o cualquier micronutriente traza incluyendo iones inorgánicos pequeños. Además, la regulación de los genes funcionales puede conseguirse por la presencia o ausencia de moléculas reguladoras específicas que se añaden al cultivo y que típicamente no se consideran fuentes de nutrientes o energía. La velocidad del crecimiento también puede ser un factor regulador importante en la expresión génica. Los ejemplos de cepas huésped incluyen, pero no están limitadas a, especies fúngicas o de levadura tales como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Candida*, *Hansenula*, o especies bacterianas tales como *Salmonella*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Zymomonas*, *Agrobacterium*, *Erythrobacter*, *Chlorobium*, *Chromatium*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Rhodobacter*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Corynebacteria*, *Mycobacterium*, *Deinococcus*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylosinus*, *Methylomicrobium*, *Methylocystis*, *Alcaligenes*, *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Anabaena*, *Thiobacillus*, *Methanobacterium*, *Klebsiella* y *Myxococcus*. Las

cepas huésped bacterianas preferidas incluyen *Escherichia*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. En un aspecto altamente preferido, la cepa huésped bacteriana es *Escherichia coli*.

Medios de fermentación

5 Los medios de fermentación en la presente invención deben contener sustratos de carbono adecuados. Los sustratos adecuados pueden incluir pero no están limitados a monosacáridos tales como glucosa y fructosa, oligosacáridos tales como lactosa o sacarosa, polisacáridos tales como almidón o celulosa o mezclas de éstos y mezclas no purificadas de alimentaciones renovables tales como permeado de suero de queso, licor de maíz fermentado, melazas de remolacha de azúcar y malta de cebada. Además, el sustrato de carbono también puede ser sustratos de un carbono tales como dióxido de carbono o metanol para los que se ha demostrado la conversión metabólica en intermedios bioquímicos clave.

10 Además de sustratos de uno y dos carbonos también se sabe que los organismos metilotróficos utilizan varios compuestos distintos que contienen carbono tales como metilamina, glucosamina y una variedad de aminoácidos para la actividad metabólica. Por ejemplo, se sabe que las levaduras metilotróficas utilizan el carbono de la metilamina para formar trealosa o glicerol (Bellion et al., *Microb. Growth C1 Compd.*, [Int. Symp.], 7^o (1993), 415-32. Editor(es): Murrell, J. Collin; Kelly, Don P. Editor: Intercept, Andover, Reino Unido). De manera similar, varias especies de *Candida*

15 metabolizarán alanina o ácido oleico (Sulter et al., *Arch. Microbiol.* 153: 485-489) (1990)). Por lo tanto, se contempla que la fuente de carbono utilizada en la presente invención puede englobar una amplia variedad de sustratos que contienen carbono y sólo estará limitada por la elección del organismo.

Aunque se contempla que todos los sustratos de carbono mencionados anteriormente y mezclas de éstos son adecuados en la presente invención, los sustratos de carbono preferidos son glucosa, fructosa y sacarosa.

20 Además de una fuente de carbono apropiada, los medios de fermentación deben contener minerales, sales, cofactores, tampones y otros componentes adecuados, conocidos por los expertos en la técnica, adecuados para el crecimiento de los cultivos y estimulación de la expresión de los presentes péptidos de fusión.

Condiciones de cultivo

25 Las condiciones adecuadas de cultivo pueden seleccionarse dependiendo del huésped productor elegido. Típicamente, las células se crecen a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25^oC a aproximadamente 40^oC en un medio apropiado. Los medios de crecimiento adecuados pueden incluir medios comunes, preparados comercialmente tales como caldo de Luria Bertani (LB), caldo de Dextrosa Sabouraud (SD) o caldo de medio de levadura (YM). También pueden usarse otros medios de crecimiento definidos o sintéticos y el medio apropiado para el crecimiento del microorganismo particular será conocido por un experto en la técnica de la ciencia de microbiología o fermentación. El uso de agentes que se sabe que modulan la represión catabólica directamente o indirectamente, por ejemplo, adenosina

30 2':3'-monofostato cíclica, también puede incorporarse en el medio de fermentación.

Los intervalos adecuados de pH para la fermentación están típicamente entre pH 5,0 y pH 9,0, en el que se prefiere el pH 6,0 a pH 8,0.

35 Las fermentaciones pueden realizarse en condiciones aeróbicas o anaeróbicas en las que se prefieren generalmente las condiciones aeróbicas.

Fermentaciones industriales discontinuas y continuas

Una fermentación discontinua es un sistema cerrado en el que la composición del medio se ajusta al comienzo de la fermentación y no se somete a alteraciones artificiales durante la fermentación. Así, al comienzo de la fermentación el medio se inocula con el organismo u organismos deseados y se permite que ocurra la fermentación sin añadir nada al sistema. Típicamente, una fermentación "discontinua" es discontinua respecto a la adición de la fuente de carbono y frecuentemente se intentan controlar factores tales como pH y concentración de oxígeno. En los sistemas discontinuos, las composiciones de metabolitos y biomasa del sistema cambian constantemente hasta el momento en el que se para la fermentación. En los cultivos discontinuos, las células pasan a través de una fase de latencia estática hasta una fase de alto crecimiento logarítmico y finalmente a una fase estacionaria en la que la velocidad del crecimiento disminuye o se para. Si no se tratan, las células en la fase estacionaria morirán eventualmente. Las células en la fase logarítmica son generalmente responsables de la mayor parte de la producción del producto final o intermedio.

40

45

Una variación del sistema discontinuo estándar es el sistema de alimentación discontinua. Los procesos de fermentación con alimentación discontinua también son adecuados en la presente invención y comprenden un sistema discontinuo típico con la excepción de que se añade el sustrato en incrementos al progresar la fermentación. Los sistemas de alimentación discontinua son útiles cuando la represión catabólica puede inhibir el metabolismo de las células y cuando es deseable tener cantidades limitadas de sustrato en los medios. La medida de la concentración real de sustrato en los sistemas de alimentación discontinua es difícil y por lo tanto se estima tomando como base los cambios de factores

50

5 mensurables tales como pH, oxígeno disuelto y la presión parcial de gases residuales tales como CO₂. Las fermentaciones discontinuas y de alimentación discontinua son comunes y muy conocidas en la técnica y se pueden encontrar ejemplos en Thomas D. Brock en *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Segunda Edición (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. (de aquí en adelante "Brock") o Deshpande, Mukund V., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 36: 227 (1992).

10 Aunque la presente invención se realiza típicamente en modo discontinuo se contempla que el método sería adaptable a métodos de fermentación continuos. La fermentación continua es un sistema abierto en el que un medio de fermentación definido se añade continuamente a un biorreactor y una cantidad igual de medio condicionado se retira simultáneamente para procesamiento. La fermentación continua mantiene generalmente los cultivos a una densidad alta constante en los que las células están principalmente en la fase logarítmica de crecimiento.

15 La fermentación continua permite la modulación de un factor o cualquier número de factores que afectan el crecimiento celular o la concentración del producto final. Por ejemplo, un método mantendrá un nutriente limitante tal como la fuente de carbono o nivel de nitrógeno en una proporción fija y permite moderar todos los demás parámetros. En otros sistemas, un número de factores que afecta el crecimiento puede alterarse continuamente mientras la concentración celular, medida por turbidez del medio, se mantiene constante. Los sistemas continuos tratan de mantener condiciones de crecimiento en estado estacionario y así la pérdida celular debida al consumo del medio debe equilibrarse frente a la velocidad de crecimiento celular en la fermentación. Los métodos para modular nutrientes y factores de crecimiento para los procesos de fermentación continua así como las técnicas para maximizar la velocidad de la formación del producto son muy conocidos en la técnica de la microbiología industrial y una variedad de métodos se detallan por Brock, *supra*.

20 Se contempla que la presente invención puede llevarse a la práctica usando procesos discontinuos, de alimentación discontinua o continuos y que sería adecuado cualquier modo conocido de fermentación.

25 Debe indicarse que cuando una cantidad, concentración u otro valor o parámetro se proporciona como un intervalo, intervalo preferido o una lista de valores superiores preferibles y valores inferiores preferibles, esto debe entenderse como una descripción específica de todos los intervalos formados por cualquier pareja de cualquier límite superior del intervalo o valor preferido y cualquier límite inferior del intervalo o valor preferido, independientemente de si los intervalos se describen separadamente. Cuando se cita en la presente memoria un intervalo de valores numéricos, a no ser que se indique otra cosa, se pretende que el intervalo incluya los puntos de los extremos de éste, y todos los números enteros y fracciones en el intervalo. No se pretende que el alcance de la invención esté limitado a los valores específicos citados cuando se define un intervalo.

30 Ejemplos

La presente invención se define adicionalmente en los Ejemplos siguientes. Debe entenderse que estos Ejemplos, a la vez que indican realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan sólo como ilustración.

35 El significado de las abreviaturas usadas es como sigue: "min" significa minuto(s), "h" significa hora(s), "µL" significa microlitro(s), "mL" significa mililitro(s), "L" significa litro(s), "nm" significa nanometro(s), "mm" significa milímetro(s), "cm" significa centímetro(s), "µm" significa micrómetro(s), "mM" significa milimolar, "M" significa molar, "mmol" significa milimol(es), "µmol" significa micromol(es), "pmol" significa picomol(es), "g" significa gramo(s), "µg" significa microgramo(s), "mg" significa miligramo(s), "g" significa la constante gravitacional, "rpm" significa revoluciones por minuto, "DTT" significa ditiotreitól y "cat#" significa número de catálogo.

Métodos generales:

40 Las técnicas estándar de ADN recombinante y de clonación molecular usadas en la presente memoria son muy conocidas en la técnica y se describen por Sambrook, J. y Russell, D., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001); y por Silhavy, T.J., Bennis, M.L. y Enquist, L.W., *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY (1984); y por Ausubel, F.M. et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 5ª Ed. Current Protocols and John Wiley and Sons, Inc., N.Y., 2002.

Los materiales y métodos adecuados para el mantenimiento y crecimiento de los cultivos bacterianos también son muy conocidos en la técnica. Las técnicas adecuadas para uso en los Ejemplos siguientes pueden encontrarse en *Manual of Methods for General Bacteriology*, Phillip Gerhardt, R.G.E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg y G. Briggs Phillips, eds., American Society for Microbiology, Washington, DC., 1994 o en Brock (*supra*).

50 Todos los reactivos, enzimas de restricción y materiales usados para el crecimiento y el mantenimiento de las células bacterianas se obtuvieron de BD Diagnostics Systems (Sparks, MD), Invitrogen (Carlsbad, CA), Life Technologies (Rockville, MD), QIAGEN (Valencia, CA) o Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO), a no ser que se especifique otra cosa.

Ejemplo 1

Construcción de plásmidos de expresión

Se usaron varios sistemas de expresión para producir las proteínas de fusión en una célula huésped *E. coli*. Un sistema de expresión se basó en la cepa de *E. coli* BL21-AI (Invitrogen) en combinación con un vector de expresión basado en T7 (pLX121; SEQ ID NO: 1; Figura 2) en el que la expresión de la ARN polimerasa T7 está controlada por el promotor araBAD. Otro sistema de expresión se basó en la cepa derivada de *E. coli* MG1655 (ATCC 46076™) en combinación con un vector de expresión basado en pBAD (pSF032, Figura 3, SEQ ID NO: 2 y pLR186, Figura 4, SEQ ID NO: 51) en el que la copia cromosómica endógena del operón araBAD se deletionó (la cepa de *E. coli* modificada MG1655 que comprende una disrupción en el operón endógeno araBAD se refiere en la presente memoria como cepa de *E. coli* KK2000). La región 3' aguas abajo y unida de manera operativa con el promotor respectivo en cada uno de los vectores se diseñó para facilitar el intercambio sencillo del ADN que codifica la etiqueta de cuerpo de inclusión y/o el péptido de interés respectivo. Los sitios de restricción *Nde*I y *Bam*HI flanquearon la región que codifica la etiqueta de cuerpo de inclusión (IBT). Los sitios de restricción *Bam*HI y *As*cl flanquearon la región que codifica el péptido de interés (POI):

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los diferentes péptidos de fusión se diseñaron para incluir al menos una región que codifica una etiqueta de cuerpo de inclusión (IBT) unida a un péptido de interés (POI). Como se ha descrito anteriormente, las moléculas de ácido nucleico que codifican los componentes del péptido de fusión se diseñaron para incluir los sitios de restricción apropiados *Nde*I/*Bam*HI (región que codifica la etiqueta de cuerpo de inclusión) y *Bam*HI/*As*cl (región que codifica el péptido de interés) para facilitar la inserción en el vector de expresión. La inserción de las moléculas de ácido nucleico creó un gen quimérico que codifica un péptido de fusión unido de manera operativa al promotor respectivo. El péptido de fusión se diseñó para tener una etiqueta de cuerpo de inclusión (IBT) unida a un péptido de interés (POI) en el que los dos componentes estaban separados por un conector peptídico escindible (CS; por ejemplo, un resto DP escindible con ácido).

Construcción del plásmido de expresión pLX121 (expresión basada en T7):

Se preparó una construcción genética para evaluar el comportamiento de las etiquetas de cuerpo de inclusión cuando se fusionaban con un péptido de interés soluble. Se usó un plásmido (pLX121; Figura 2; SEQ ID NO: 1) que contiene un origen de replicación pBR322 y el gen *bla* para conferir resistencia a ampicilina. La expresión del gen quimérico estaba dirigida por un promotor T7. La construcción de este plásmido se ha descrito previamente en la Publ. Solic. patente U.S. en tramitación con la presente No. 2008/0206809.

Brevemente, el vector de expresión pLX121 se diseñó a partir del plásmido objetivo pDEST17 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El vector de expresión se modificó de manera que el gen quimérico que codifica la proteína de fusión se expresó bajo el control del promotor T7. Se usaron los sitios de restricción *Nde*I y *Bam*HI para el intercambio sencillo de las diferentes etiquetas de cuerpo de inclusión. Se usaron los sitios de restricción *Bam*HI y *As*cl para facilitar el intercambio de los diferentes péptidos de interés. La secuencia que codifica la unión entre la etiqueta de cuerpo de inclusión y el péptido de interés se diseñó para codificar un resto D-P escindible con ácido.

35 Construcción del vector de expresión pSF043

El vector pKSI (C4)-HC77623 se derivó del vector disponible comercialmente pDEST17 (Invitrogen). La construcción de este vector se ha descrito previamente en la Publ. Solic. Patente U.S. en tramitación con la presente No. 2006/0222609.

Incluye secuencias derivadas del vector disponible comercialmente pET31 b (Novagen, Madison, WI) que codifican un fragmento de la enzima quetoesteroido isomerasa (KSI; Kuliopulos, A. y Walsh, C.T., J. Am. Chem. Soc. 116: 4599-4607 (1994)). El fragmento KSI se usó como una etiqueta de cuerpo de inclusión para estimular la división de los péptidos en cuerpos de inclusión insolubles en *E. coli*. La molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia KSI de pET31 b se modificó usando procedimientos estándar de mutagénesis (QuickChange II; Stratagene, La Jolla, CA) para incluir tres codones adicionales de cisteína, además del codón de cisteína encontrado en la secuencia KSI de tipo salvaje, lo que resulta en la etiqueta de cuerpo de inclusión KSI (C4) (SEQ ID NOs: 52 y 53). El plásmido pKSI (C4)-HC77623 se construyó usando métodos estándar de ADN recombinante muy conocidos para los expertos en la técnica. Los sitios de restricción *Bam*HI y *As*cl facilitaron el intercambio de las moléculas de ácido nucleico que codifican los diferentes péptidos de interés. Los insertos se diseñaron para codificar un resto DP escindible con ácido útil en la separación de la etiqueta de cuerpo de inclusión del péptido de interés.

El gen HC77643 se sintetizó por DNA 2.0 con sitios de restricción apropiados en cada extremo y se clonó en el vector KSI (C4)-HC77623 como se ha descrito anteriormente, creando pSF043 (SEQ ID NO: 50; Figura 5). Las secuencias del gen quimérico y el producto génico correspondiente (péptido de fusión KSI (C4)-HC77643) se proporcionan como SEQ ID NOs: 54 y 55, respectivamente).

Construcción del plásmido de expresión pSF032 (Expresión basada en pBAD)

El plásmido pSF032 (SEQ ID NO: 2; Figura 3) contiene un origen de replicación de tipo ColE1 y el gen *bla* para conferir resistencia a ampicilina. La construcción de fusión etiqueta/péptido está dirigida por el promotor *araBAD*. El plásmido también codifica el gen para el regulador *araC*.

- 5 El plásmido pSF032 se derivó del plásmido disponible comercialmente pBAD-HisA (Invitrogen). Brevemente, se clonó un sitio de clonación múltiple modificado (MCS) en pBAD-HisA y el sitio de restricción *NdeI* en la posición 2844 se eliminó para crear un único sitio *NdeI* aguas abajo del promotor pBAD. El plásmido resultante se denominó pBAD-HisA_MCSmod. El fragmento *NdeI/EcoRI* del plásmido pKSIC4-HC77623 se insertó en el sitio *NdeI/EcoRI* de pBAD-HisA_MCSmod, creando el plásmido pSF004_pBAD-KSIC4-HC77623. El plásmido pSF032 se creó a partir del plásmido pSF004 eliminando la región codificadora para el péptido HC77623 e insertando la región codificadora para el péptido HC77638 (véase el Ejemplo 2).

Construcción del plásmido de expresión pLR186 (Expresión basada en *araBAD*):

- 15 El plásmido pLR186 (SEQ ID NO: 51; Figura 4) contiene un origen de replicación de tipo ColE1, el gen *bla* para conferir resistencia a ampicilina y el gen *aadA-1* para conferir resistencia a espectinomicina (Spec). La construcción de fusión etiqueta/péptido está dirigida por el promotor *araBAD*. El plásmido también codifica el gen para el regulador *araC*.

- 20 El plásmido pLR186 se derivó del plásmido disponible comercialmente pBAD-HisA (Invitrogen). Brevemente, se clonó un sitio de clonación múltiple modificado (MCS) en pBAD-HisA y el sitio de restricción *NdeI* en la posición 2844 se eliminó para crear un único sitio *NdeI* aguas abajo del promotor pBAD. El plásmido resultante se denominó pBAD-HisA_MCSmod. El fragmento *NdeI/EcoRI* del plásmido pKSIC4-HC77623 (Publ. Solic. Patente U.S. No. 2006/0222609) se insertó en el sitio *NdeI/EcoRI* de pBAD-HisA_MCSmod, creando el plásmido pSF004_pBAD-KSIC4-HC77623. El fragmento *HindIII* del plásmido pCL1920 (Lerner e Inouye, Nucleic Acids Research, 18: 4631 (1990); GENBANK® No. de Registro AB236930) que comprende el gen de resistencia a espectinomicina (*aadA-1*) se insertó en pSF04_pBAD-KSIC4-HC77623, creando el plásmido pLR042. El plásmido pLR186 (Figura 4; SEQ ID NO: 49) se creó a partir del plásmido pLR042 eliminando la región codificadora para el péptido de fusión KSIC4-HC77623 e insertando la región codificadora para el péptido de fusión IBT 139-HC776124 (es decir, un péptido de fusión que comprende la etiqueta de cuerpo de inclusión IBT-139 unida al péptido de interés HC776124; véase el Ejemplo 4).

Ejemplo 2

Construcción de varios péptidos de interés

- 30 Se diseñaron cinco péptidos de unión a pelo multi-bloque con las secuencias de aminoácidos siguientes. Se ha publicado la construcción de los péptidos de unión a pelo multi-bloque (véase Publ. Solic. Patente U.S. en tramitación con la presente No. 2006/0222609 y 2005/0226839). Los péptidos multi-bloque solubles (es decir, los "péptidos de interés") se usaron para evaluar las presentes etiquetas de cuerpo de inclusión. Cada uno de los péptidos de unión a pelo multi-bloque comprende uno o más dominios de unión a pelo. Los dominios de unión funcionales se proporcionan en la Tabla 1. Los dominios de unión a pelo (negrita) incluyen A09 (IPWWNIRAPLNA; SEQ ID NO: 3 que también se ha encontrado que se une a polimetilmetacrilato), KF11 (NTSQLST; SEQ ID NO: 4) y D21' (RTNAADHP; SEQ ID NO: 5). Los dominios de afinidad con los péptidos multi-bloque están separados típicamente por espaciadores peptídicos cortos. Los restos DP escindibles con ácido están en *italica*.

Ejemplo 3

Identificación de etiquetas de cuerpo de inclusión

Se evaluaron varias secuencias de parejas de fusión ("etiquetas de cuerpo de inclusión") para su capacidad de dirigir a los péptidos de fusión resultantes (cuando se unen de manera operativa a un péptido de interés corto, generalmente soluble) a cuerpos de inclusión insolubles intracelulares. Se clonaron varias construcciones de péptido de unión a pelo (HC77607, HC77638, HC77643 y HC77681) en la biblioteca de etiquetas (plásmido parental pLX121, véase la secuencia más adelante). La expresión de los productos de fusión está dirigida a partir de un promotor T7. En *E. coli* BL21-AI, la expresión del gen de la ARN polimerasa T7 está bajo el control del promotor araBAD (es decir, expresión inducible por arabinosa). Además, HC77638 también se clonó en una biblioteca de etiquetas compuesta por las mismas etiquetas pero con un plásmido parental diferente (pSF032 parental, véase la secuencia más adelante) que dirige la expresión de los productos de fusión a partir de un promotor *araBAD*. Los genes que codifican los péptidos de unión a pelo solubles (por ejemplo, péptidos de interés) se clonaron aguas abajo de las secuencias de etiqueta en una estrategia de clonación discontinua usando los sitios de las enzimas de restricción *Bam*HI en el 5' y *Asc*I en el extremo 3'.

Todas las construcciones en el plásmido parental pLX121 se transformaron en células *E. coli* BL21-AI (Invitrogen), las construcciones en el plásmido parental pSF032 se transformaron en *E. coli* MG1655 (ATCC 46076™) con una delección en la copia cromosómica endógena del operón araBAD. Se cribaron aproximadamente 1.000 transformantes para cada biblioteca. Los descubrimientos positivos se corrieron en geles de SDS-PAGE. Para confirmar los resultados, se inocularon 3 mL de crecimientos en LB (más 100 µg/mL de ampicilina) con 30 µL de un cultivo de toda la noche de las construcciones respectivas. Los cultivos se crecieron hasta DO₆₀₀ de aproximadamente 0,4 y se indujeron con 0,2% arabinosa y se crecieron durante 3 horas. Para determinar el contenido celular soluble frente a insoluble, las células se lisaron y las fracciones soluble e insoluble se corrieron en un gel de SDS-PAGE.

Después del análisis de los resultados fue evidente que para cada biblioteca que se cribó, al menos una de cuatro etiquetas de cuerpo de inclusión que estaban compuestas por secuencias similares fue capaz de dirigir a las proteínas de fusión a cuerpos de inclusión (Tabla 2). Un miembro de esta familia de etiquetas no sólo fue capaz de dirigir cada péptido ensayado en IB insolubles sino que también fue capaz de hacerlo en diferentes cepas de *E. coli* y con diferentes promotores dirigiendo la expresión.

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos por las diferentes etiquetas de IB. La información de las etiquetas se muestra en la mitad izquierda de la tabla. La mitad derecha de la tabla muestra el nivel de expresión obtenido para cada una de las construcciones HC en su cepa de *E. coli* respectiva. El valor 1 se refiere a un nivel de expresión medio, 2 se refiere a un nivel de expresión alto. nd= no detectado en el cribado.

Etiqueta de Cuerpo de Inclusión		Péptido de Interés y Sistema de Expresión y la Clasificación de Expresión Relativa				
Etiqueta de Solubilidad	Secuencia de Aminoácidos (SEQ ID NO:)	HC77607	HC77638	HC77638	HC77643	HC77681
IBT103	QQRFWQFEQQPRGQQRFFQ WQFEQQPEGQQRFFQWQFEQQ (SEQ ID NO: 15)	2	1	2	1	nd
IBT136	QQRFWQFEQQ (SEQ ID NO: 17)	1	nd	nd	nd	nd
IBT138	QQRFWQFEQQPEGQQRFFQ WQFEQQ (SEQ ID NO: 19)	2	nd	nd	nd	2
IBT139	QQRFWQFEQQPRGQQR FQWQFEQQPRGQQRFFQW QFEQQPEGQQRFFQWQFEQQ (SEQ ID NO: 21)	1	nd	nd	2	nd

Ejemplo 4

Uso de IBT 139 para dirigir a los péptidos de interés adicionales a cuerpos de inclusión

Para determinar si esta familia de etiquetas es útil generalmente para dirigir proteínas a cuerpos de inclusión, se evaluó adicionalmente el miembro mayor de esta familia, IBT 139, con una proteína que no ha experimentado el proceso de cribado con la biblioteca de etiquetas.

Construcción del péptido de fusión IBT 139.HC776124

La molécula de ácido nucleico (SEQ ID NO: 22) que codifica HC776124 (SEQ ID NOs: 23) se encargó a DNA2.0 (Menlo Park, CA) y se clonó en los sitios de restricción *Bam*HI (5') y *As*cl (3') del plásmido parental pLR042, creando el plásmido pLR186 (SEQ ID NO: 49). La molécula de ácido nucleico que codifica IBT 139 (SEQ ID NO: 20) se clonó en los sitios de restricción *Nde*I (5') y *Bam*HI (3'), resultando en un gen quimérico (SEQ ID NO: 24) que codifica la proteína de fusión IBT 139.HC776124 (SEQ ID NO: 25).

Construcción: IBT 139.HC776124

El diseño del péptido HC776124 se proporciona en la Tabla 3. El péptido HC776124 (un dímero de HC77643) está comprendido por varios dominios de unión a pelo incluyendo A09 (SEQ ID NO: 3) y KF11 (SEQ ID NO: 4). Los restos DP escindibles con ácido están en itálica (Tabla 3).

Tabla 3. Organización de HC776124.

Nombre del Péptido	Fórmula	Secuencia de Aminoácidos	Ácido Nucleico SEQ ID NO:	Aminoácidos SEQ ID NO:
HC776124	GSD(PG-A09-GAGA09-GGSGPGSSG-KF11-GGG-KF11-GGPKKPGD) 2	GSDPGIPWWNIRAP LNAGAGIPWWNIRA PLNAGGSGPGSSG NTSQLSTGGGNTS QLSTGGPKKPGDP GIPWWNIRAPLNAG AGIPWWNIRAPLNA GGSGPGSSGNTSQ LSTGGGNTSQLSTG GPKKPGD	22	23

Crecimiento de la cepa y análisis de IB

Se inocularon 3 mL de crecimiento en LB (más 100 µg/mL de ampicilina) con 30 µL de un cultivo de toda la noche de las construcciones respectivas. El cultivo se creció hasta DO₆₀₀ de aproximadamente 0,4 y se indujo con 0,2% arabinosa y se creció durante 3 horas. Para determinar el contenido celular soluble frente a insoluble, las células se lisaron y las fracciones soluble e insoluble se corrieron en un gel de SDS-PAGE.

Resultado:

La proteína de fusión IBT 139.HC776124 se produjo en la forma de cuerpos de inclusión insolubles.

Ejemplo 5

La etiqueta de cuerpo de inclusión pequeña (IBT 186) que comprende un número eficaz de cisteínas entrecruzables puede separarse de la mezcla de péptidos escindidos por entrecruzamiento oxidativo y precipitación

El propósito de este ejemplo es mostrar que una etiqueta de cuerpo de inclusión pequeña (por ejemplo, IBT 186; SEQ ID NOs: 26 y 27) que contiene un número eficaz de residuos de cisteína entrecruzables (IBT 186 contiene 4 residuos de cisteína) puede dirigir la formación de cuerpos de inclusión a la vez que es fácil de separar usando entrecruzamiento oxidativo. El ejemplo también muestra que una etiqueta de cuerpo de inclusión pequeña que previamente se ha mostrado que es eficaz en la inducción de la formación de cuerpos de inclusión puede modificarse para contener una cantidad eficaz de residuos de cisteína entrecruzables (IBT 186 deriva de la etiqueta pequeña IBT 139 (Ejemplos 3-4) con cuatro cisteínas entrecruzables distribuidas en su secuencia) a la vez que mantiene su capacidad de dirigir eficazmente la formación de cuerpos de inclusión. La presencia de cuatro cisteínas permite una precipitación sencilla de la etiqueta después de la escisión de la etiqueta y el péptido.

10 Construcción, clonación y análisis inicial de IBT 186.HC776124:

La molécula de ácido nucleico (SEQ ID NO: 26) que codifica IBT 186 se sintetizó por DNA2.0 (Menlo Park, CA) y se clonó en los sitios de restricción *Nde*I (5') y *Bam*HI (3') del plásmido pLR186 (expresión dirigida por el promotor pBAD) para preparar una fusión con la construcción HC776124, creando un gen quimérico (SEQ ID NO: 28) que codifica el péptido de fusión IBT 186.HC776124 (SEQ ID NO: 29). El plásmido resultante (pLR238) se transformó en *E. coli* MG1655 (ATCC 46076™) con el operón *araBAD* delecionado.

Se inocularon 3 mL de crecimiento en LB (más 100 µg/mL de ampicilina) con 30 µL de un cultivo de toda la noche. El cultivo se creció hasta DO₆₀₀ de aproximadamente 0,4 y se indujo con 0,2% arabinosa y se creció durante 3 horas. Para determinar el contenido celular soluble frente a insoluble, las células se lisaron y las fracciones soluble e insoluble se corrieron en un gel de SDS-PAGE. La proteína de fusión se produjo en la forma de cuerpos de inclusión insolubles.

20 Preparación a gran escala y aislamiento de la proteína de fusión IBT 186.HC776124:

Condiciones de crecimiento:

Se fermentaron células de *E. coli* en un recipiente de 10 L a no ser que se indique otra cosa. La fermentación transcurrió en tres estadios:

1. Preparación de 125 mL de inóculo de siembra. Las células que contienen la construcción de interés se inocularon en 125 mL de medio de siembra 2YT (10 g/L de extracto de levadura, 16 g/L de triptona, 5 g/L de NaCl y antibiótico apropiado) y se crecieron durante varias horas a 37°C.

2. Crecimiento en fase discontinua. Los 125 mL de inóculo de añadieron a 6 L de medio discontinuo (9 g/L de KH₂PO₄, 4 g/L de (NH₄)₂HPO₄, 1,2 g/L de MgSO₄·7 H₂O, 1,7 g/L de ácido cítrico, 5 g/L de extracto de levadura, 0,1 mL/L de antiespumante Biospumex 153K, 4,5 mg/L de Tiamina.HCl, 23 g/L de glucosa, 10 mL/L de elementos traza, 50 mg/L de uracilo, antibiótico apropiado, pH 6,7) a 37°C.

3. Crecimiento en fase de alimentación discontinua. Después de aproximadamente 12 horas de crecimiento en la fase discontinua, se inició la fase de alimentación discontinua. Se añadió medio de alimentación discontinua (2 g/L de MgSO₄·7 H₂O, 4 g/L de (NH₄)₂HPO₄, 9 g/L de KH₂PO₄, 1-2 g/min de Glucosa) a una velocidad constante al reactor durante aproximadamente 15 horas a 37°C. 4 horas antes del final de la fase de alimentación discontinua, las células se indujeron para expresar el POI mediante la adición de 2 g/L de L-arabinosa.

Procesamiento del caldo de fermentación, entrecruzamiento oxidativo y análisis

El caldo completo de la fermentación se pasó a través de un homogeneizador de tipo Gaulin APV modelo 2000 a 12.000 psi (82.700 kPa) durante tres pasadas. El caldo se enfrió hasta por debajo de 5°C antes de cada homogeneización. El caldo homogeneizado se procesó inmediatamente mediante una centrifuga de discos apilados WHISPERFUGE™ Westfalia (Westfalia Separator Inc., Northvale, NJ) a 600 mL/min y una fuerza centrífuga relativa (RCF) de 12.000 para separar los cuerpos de inclusión de los restos celulares suspendidos e impurezas disueltas. La pasta recuperada se resuspendió a 15 g/L (en seco) en agua y el pH se ajustó a aproximadamente 10,0 usando NaOH. La suspensión se pasó a través del homogeneizador de tipo Gaulin APV 2000 a 12.000 psi (82.700 kPa) en un único paso para proporcionar mezclado vigoroso. La suspensión homogeneizada a pH 10 se procesó inmediatamente en una centrifuga de discos apilados WHISPERFUGE™ Westfalia a 600 mL/min y 12.000 RCF para separar los cuerpos de inclusión lavados de los restos celulares suspendidos e impurezas disueltas. La pasta recuperada se resuspendió a 15 gm/L (en seco) en agua pura. La suspensión se pasó a través del homogeneizador de tipo Gaulin APV 2000 a 12.000 psi (82.700 kPa) en un único paso para proporcionar mezclado vigoroso. La suspensión homogeneizada se procesó inmediatamente en una centrifuga de discos apilados WHISPERFUGE™ Westfalia a 600 mL/min y 12.000 RCF para separar los cuerpos de inclusión lavados de los restos celulares suspendidos residuales y NaOH. La pasta recuperada se resuspendió en agua pura a 25 gm/L (en seco) y el pH de la mezcla se ajustó a 2,2 usando HCl. La suspensión acidificada se calentó hasta 70°C durante 14 horas para completar la escisión del sitio DP separando el péptido de fusión del péptido producto.

5 Se neutralizó el pH del producto (nota: el pH usado puede variar dependiendo de la solubilidad del péptido que se está recuperando) y se enfrió hasta $\sim 5^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo durante 12 horas. Durante esta etapa la suspensión se mantuvo en una botella de 500 mL ó 1 L llena no más de 3/4 para asegurar la presencia adecuada de oxígeno para asegurar el entrecruzamiento de cisteínas mediante la formación de disulfuro. La mezcla se centrifugó a 9.000 RCF durante 30 minutos y el sobrenadante se decantó para análisis de HPLC.

Análisis por HPLC

10 El sobrenadante se filtró con una membrana de 0,2 micrómetros. El producto filtrado se cargó en una columna de cromatografía de fase inversa de 22 x 250 mm GraceVydac® (218TP1022) que contenía medio C18 de 10 micrómetros que se preacondicionó con 10% acetonitrilo (ACN), 90% agua con 0,1% v/v ácido trifluoroacético (TFA). El producto se recuperó en un estado purificado eluyendo la columna con un gradiente de agua y acetonitrilo (ACN) que subió de 10% a 25% de acetonitrilo (ACN) en agua con TFA a 0,1% v/v a temperatura ambiente y aproximadamente 10 mL/min. Se usó detección espectrofotométrica a 220 nm para monitorizar y seguir la elución del péptido producto.

Entrecruzamiento oxidativo para separar la IBT del péptido de interés

15 La proteína se purificó como se ha descrito anteriormente. Después de la escisión con ácido y neutralización del pH, la mezcla se almacenó a $\sim 5^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 6 horas para permitir que las cisteínas formaran enlaces de entrecruzamiento. La exposición al aire ambiente proporcionó oxígeno para producir el entrecruzamiento de las cisteínas. La mezcla se centrifugó a 9.000 RCF durante 30 minutos y la etiqueta de cuerpo de inclusión precipitada se separó del péptido de interés soluble.

Resultados después del entrecruzamiento oxidativo:

20 El análisis en gel por SDS-PAGE tanto de la pasta de precipitado como de la fracción soluble remanente mostró la presencia de IBT 186 en la pasta insoluble y HC776124 que permanecía en la fracción soluble. Esto se confirmó adicionalmente por HPLC, que mostró la presencia de HC776124 sólo en la fracción soluble (véase la Tabla 4).

Ejemplo 6

25 La etiqueta de cuerpo de inclusión pequeña IBT 139(5C) que comprende una cantidad eficaz de cisteínas entrecruzables puede separarse de la mezcla de péptidos escindidos por entrecruzamiento oxidativo y precipitación

30 El propósito de este ejemplo es mostrar que otra etiqueta de cuerpo de inclusión pequeña (por ejemplo, IBT 139(5C); SEQ ID NO: 265) que contiene un número eficaz de residuos de cisteína entrecruzables (IBT 139(5C) contiene 5 residuos de cisteína) puede dirigir la formación de cuerpos de inclusión a la vez que es fácil de separar usando entrecruzamiento oxidativo. El ejemplo también muestra que una etiqueta de cuerpo de inclusión pequeña que previamente se ha mostrado que es eficaz induciendo la formación de cuerpos de inclusión puede modificarse para contener una cantidad eficaz de residuos de cisteína entrecruzables (IBT 139 (5C) deriva de la etiqueta pequeña IBT 139 (Ejemplo 4) con cinco cisteínas distribuidas en su secuencia) a la vez que mantiene su capacidad de dirigir eficazmente la formación de cuerpos de inclusión. La presencia de cinco cisteínas permite una precipitación sencilla de la etiqueta después de la escisión de la etiqueta y el péptido de interés.

35 Construcción: IBT 139(5C)-HC776124 (pLR435) (SEQ ID NOs: 266-267)

Clonación y análisis inicial de IBT 139(5C).HC776124:

40 La secuencia codificadora (SEQ ID NO: 264) que codifica IBT 139(5C) (SEQ ID NO: 265) se sintetizó por DNA2.0 (Menlo Park, CA) y se clonó en los sitios de restricción *Nde*I (5') y *Bam*HI (3') del plásmido pLR186 (expresión dirigida por el promotor pBAD) para preparar una fusión con la construcción HC776124 (SEQ ID NO: 22), creando el plásmido pLR435 (SEQ ID NO: 263). El plásmido se transformó en *E. coli* MG1655 (ATCC 46076™) con el operón araBAD nativo deletado. La secuencia de IBT 139(5C) que comprende los 5 residuos de cisteína (en negrita) se proporciona a continuación.

IBT 139(5C):

MASCGQQRFQWQFEQQPRCGQQRFQWQFEQQPRCGQQRFQWQ
FEQQPECGQQRFQWQFEQQPC (SEQ ID NO: 265).

Se inocularon 3 mL de crecimiento en LB (más 100 µg/mL de ampicilina) con 30 µL de un cultivo de toda la noche. El cultivo se creció hasta DO₆₀₀ de aproximadamente 0,4 y se indujo con 0,2% arabinosa y se creció durante 3 horas. Para determinar el contenido celular soluble frente a insoluble, las células se lisaron y las fracciones soluble e insoluble se corrieron en un gel de SDS-PAGE. La proteína de fusión producida se produjo de nuevo como cuerpos de inclusión insolubles.

Producción de la proteína producto:

La proteína se produjo y se procesó como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 5). Después de la escisión con ácido y neutralización del pH, la mezcla se almacenó a ~5°C durante aproximadamente 6 horas para permitir que los residuos de cisteína se oxiden y formen enlaces de entrecruzamiento. La exposición al aire ambiente proporcionó oxígeno suficiente para producir el entrecruzamiento de las cisteínas. La mezcla se centrifugó posteriormente a 9.000 RCF durante 30 minutos y la etiqueta de cuerpo de inclusión precipitada se separó del péptido de interés soluble.

Resultados:

El análisis en gel por SDS-PAGE tanto de la pasta de precipitado como de la fracción soluble remanente mostró la presencia de IBT 139(5C) en la pasta insoluble y HC776124 que permanecía en la fracción soluble. Esto se confirmó adicionalmente por HPLC (véase el método descrito en el Ejemplo 5), que mostró la presencia de HC776124 sólo en la fracción soluble. Los resultados de los experimentos de entrecruzamiento se resumen en la Tabla 4.

Ejemplo 7

La introducción de múltiples cisteínas en el extremo de una etiqueta de cuerpo de inclusión estimula el entrecruzamiento oxidativo mientras retiene la capacidad de dirigir eficazmente a los péptidos de fusión en cuerpos de inclusión

El propósito de este ejemplo es mostrar que la adición de al menos un resto de cisteína entrecruzable que comprende un número eficaz de residuos de cisteína al extremo de una etiqueta de cuerpo de inclusión crea una IBT entrecruzable, incluso cuando las cisteínas están espaciadas cercanas entre sí. Se añadió un resto de cisteína entrecruzable a una etiqueta de cuerpo de inclusión desprovista normalmente de residuos de cisteína entrecruzables (es decir, IBT 139; SEQ ID NO: 21), creando una etiqueta modificada con cisteína "IBT 139.CCPGCC" (SEQ ID NOs: 30-31). La adición del resto no alteró la capacidad de la IBT de dirigir la formación de cuerpos de inclusión mientras que la modificación facilitó la separación sencilla de la etiqueta usando entrecruzamiento oxidativo. Los resultados de los experimentos de entrecruzamiento se resumen en la Tabla 4.

Clonación y análisis inicial del péptido de fusión IBT 139.CCPGCC.HC776124:

Para facilitar el entrecruzamiento, se introdujo la etiqueta de tetracisteína CCPGCC (SEQ ID NOs: 32-33) en el extremo de la secuencia estimuladora de cuerpo de inclusión IBT 139 (SEQ ID NO: 21) que no contiene naturalmente residuos de cisteína, resultando en IBT 139.CCPGCC (SEQ ID NOs: 30 y 31). La etiqueta de tetracisteína CCPGCC es el resto de unión al marcador de bismutógeno LUMIO™. El kit de detección LUMIO™ Green se obtuvo de Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Los oligonucleótidos que codifican la etiqueta de tetracisteína fueron sintetizados por Sigma Genosys. El oligo de la cadena superior 5'-GATCTTGCTGTCCGGGCTGTTGCG-3' (SEQ ID NO: 34) y el oligo de la cadena inferior 5'-GATCCGCAACAGCCCGGACAGCAA-3' (SEQ ID NO: 35) se hibridaron con una protuberancia *Bgl*II en el extremo 5' y una protuberancia *Bam*HI en el extremo 3'. El fragmento bicatenario hibridado se clonó en el sitio *Bam*HI de un plásmido de expresión de péptido pLR186, creando el plásmido pLR199. El plásmido pLR199 contenía el péptido de interés HC776124 fusionado con la secuencia estimuladora de cuerpo de inclusión IBT 139 expresada por el promotor *P_{BAD}*. El clon resultante contenía la etiqueta de tetracisteína CCPGCC (SEQ ID NO: 33) insertada después de la secuencia estimuladora de cuerpo de inclusión y antes del sitio de escisión con ácido. La molécula de ácido nucleico que codifica el péptido de fusión IBT 139.CCPGCC.HC776124 se proporciona como SEQ ID NO: 36 y el péptido de fusión resultante se proporciona como SEQ ID NO: 37.

La introducción del resto de tetracisteína no afectó la expresión o localización de los péptidos corriendo un número equivalente de células en un gel de proteínas y observando los mismos niveles de expresión. Se mostró que la proteína sobreexpresada estaba en la forma de cuerpos de inclusión tratando las células con CELLYTIC™ Express y verificando que estaban en la fracción insoluble. La secuencia estimuladora de cuerpo de inclusión IBT 139 con la adición de la etiqueta entrecruzable CCPGCC no alteró la capacidad de la etiqueta de cuerpo de inclusión de formar cuerpos de inclusión (Tabla 4).

Producción de proteína producto:

La proteína se produjo purificada como se describe en el Ejemplo 5. Después de la escisión con ácido y neutralización del pH, la mezcla se almacenó a -5°C durante al menos 6 horas para permitir que las cisteínas formaran enlaces de entrecruzamiento. La exposición al aire ambiente proporcionó oxígeno para producir el entrecruzamiento de las cisteínas. La mezcla se centrifugó a 9.000 RCF durante 30 minutos y la etiqueta precipitada se separó del péptido soluble.

Resultados:

El análisis en gel por SDS-PAGE tanto de la pasta precipitada como de la fracción soluble remanente mostró la presencia de la etiqueta de cuerpo de inclusión (IBT 139.CCPGCC) en la pasta insoluble y el péptido de interés (HC776124) que permanecía en la fracción soluble. Esto se confirmó adicionalmente por análisis HPLC, que mostró la presencia de HC776124 sólo en la fracción soluble. Los resultados de los experimentos de entrecruzamiento se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Resumen de los resultados de entrecruzamiento

Construcción Evaluada	IBT Induce la Formación de IB en la Célula	Número de Cisteínas en la etiqueta de cuerpo de inclusión	Separación mediante Entrecruzamiento Oxidativo y Centrifugación
IBT 139.HC776124	Sí	Ninguno	No
IBT 186.HC776124	Sí	4	Sí
IBT 139.CCPGCC.HC776124	Sí	4	Sí
IBT 139(5C).HC776124	Sí	5	Sí

15 Ejemplo 8

Preparación de etiquetas de cuerpo de inclusión adicionales

Se diseñaron etiquetas de cuerpo de inclusión adicionales basadas en IBT 136. El esquema global para ensayar secuencias de pareja de fusión (IBT 182, IBT 183, IBT 184, IBT 185, IBT 186 (también evaluada con HC776124 como se ha descrito anteriormente), IBT 187a e IBT 187b) fue diseñar oligonucleótidos de ADN que (cuando hibridan) generan los extremos cohesivos requeridos para la clonación direccional de la pareja de fusión en marco con el péptido de expresión de ensayo, HC77643.

Se ensamblaron varias combinaciones de oligonucleótidos sintéticos complementarios que tenían codones con uso sesgado de codón de *E. coli*. Se diseñaron las parejas de oligonucleótidos para ensayar varias modificaciones de secuencia basadas en la secuencia de IBT 136 (Tabla 5).

25 Generación y ensayo de posibles IBT

Una molécula de ácido nucleico (SEQ ID NO: 38) que codifica la secuencia de aminoácidos de IBT 182 (QQHFHWHFQQQPRGQQHFHWHFQQQPEGQQHFHWHFQQQ; SEQ ID NO: 39) se ensambló a partir de dos oligonucleótidos sintéticos complementarios con uso sesgado de codón de *E. coli* (Sigma-Genosys). Se incluyeron protuberancias en cada oligonucleótido para generar extremos hibridables compatibles con los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*.

Los oligonucleótidos se hibridaron combinando 100 pmoles de cada oligonucleótido en agua desionizada en un tubo y calentando en un baño de agua ajustado a 99°C durante 10 minutos después de lo cual el baño de agua se apagó. Se dejó que los oligonucleótidos hibridaran lentamente hasta que el baño de agua alcanzó la temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$). Los oligonucleótidos hibridados se diluyeron en $100\ \mu\text{L}$ de agua antes de ligación en el vector de ensayo. El vector pSF043 (SEQ ID NO: 50) comprende el péptido de interés HC77643 unido a la etiqueta de cuerpo de inclusión KSI(C4) (SEQ ID NOs: 52-53), resultando en el péptido de fusión KSI(C4).HC77643 (SEQ ID NOs: 54-55). El vector se digirió en Tampón 2 (New England BioLabs, Beverly MA) que comprende 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl, 1 mM ditiotreitil (DTT); pH ~ 7.9 con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* para liberar un fragmento de 381 pares de bases (pb) correspondiente a IBT KSI(C4).

Los fragmentos *NdeI-BamHI* del plásmido digerido se separaron por electroforesis en gel de agarosa y el vector se purificó del gel usando el Kit de Extracción de Gel Qiagen QIAquick® (QIAGEN Valencia, CA; cat# 28704).

5 Los oligonucleótidos diluidos e hibridados (aproximadamente 0,2 pmoles) se ligaron con ADN Ligasa T4 (New England BioLabs Beverly, MA; catálogo #M0202) al plásmido digerido con *NdeI-BamHI*, purificado en gel (aproximadamente 50 ng) a 12°C durante 18 horas. El análisis de la secuencia de ADN confirmó la secuencia plasmídica esperada.

10 El vector de expresión que comprende el gen quimérico que codifica IBT 182 fusionada con el péptido de interés HC77643 se transformó en la cepa de *E. coli* BL21-A1 con expresión inducible por arabinosa (Invitrogen). Para producir la proteína recombinante, se inocularon 3 mL de caldo LB-ampicilina (10 g/L de bacto-triptona, 5 g/L de extracto de bacto-levadura, 10 g/L de NaCl, 100 mg/L de ampicilina; pH 7,0) con una colonia de las bacterias transformadas y el cultivo se agitó a 37°C hasta que la DO₆₀₀ alcanzó 0,6. La expresión se indujo añadiendo 0,03 mL de 20% L-arabinosa (concentración final 0,2%, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) al cultivo y la agitación se continuó durante otras 3 horas. Para el análisis de células completas, 0,1 mL de células DO₆₀₀ se recogió, se sedimentó y se añadieron 0,06 mL de tampón de muestra de SDS PAGE (1X Tampón de Muestra LDS (Invitrogen cat# NP0007), 6 M urea, 100 mM DTT) directamente a las células completas. Las muestras se calentaron a 99°C durante 10 minutos para solubilizar las proteínas. Las proteínas solubilizadas se cargaron en geles con gradiente 4-12% MES NUPAGE® (geles NUPAGE® cat #NP0322, Tampón MES cat#NP0002; Invitrogen) y se visualizó con tinción COOMASSIE® G-250 (SimplyBlue™ SafeStain; Invitrogen; cat# LC6060) para la formación de cuerpos de inclusión.

20 El esquema anterior de clonación y expresión se repitió para IBT 183, IBT 184, IBT 185, IBT 186, IBT 187a e IBT 187b. Se generó IBT 187b como un artefacto de clonación de IBT 187a. Se determinó la presencia o ausencia del péptido de fusión en la forma de cuerpos de inclusión. Se determinó la secuencia de las diferentes etiquetas de cuerpo de inclusión así como su capacidad para dirigir la formación de cuerpos de inclusión de un péptido de interés normalmente soluble (HC77643) y se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Resumen de los resultados obtenidos por IBT adicionales derivadas de IBT 136. Se determinó la presencia o ausencia de la formación de cuerpos de inclusión.

Tabla 5.

Etiqueta de Solubilidad	Secuencia de Aminoácidos (SEQ ID NO.)	Formación de Cuerpos de Inclusión con HC77643
IBT182	QQHFHWHFQQQPRGQQHFHWHFQQQPEGQ QHFHWHFQQQ (SEQ ID NO: 39)	Sí
IBT183	QQHFHWHFQQQPRGQQKFKWKFQQQPEGQ QHFHWHFQQQ (SEQ ID NO: 41)	Sí
IBT184	QQKFHWHFQQQPRGQQKFHWHFQQQPEGQ QKFHWHFQQQ (SEQ ID NO: 43)	Sí
IBT185	MASPCGQQRFQWQFEQQPCGQQRFQWQFE QQPCGQQRFQWQFEQQPCG (SEQ ID NO: 45)	Sí
IBT186	MASCGQQRFQWQFEQQPCGQQRFQWQFE QQPECGQQRFQWQFEQQPC (SEQ ID NO: 27)	Sí
IBT187a	QQKFKWKFQQQPRGQQKFKWKFQQQPEGQ QKFKWKFQQQ (SEQ ID NO: 47)	Sí
IBT187b	QQKFKWKFQQQPRGQQKFKWKFQQQPRGQ QKFKWKFQQQPEGQQKFKWKFQKQ (SEQ ID NO: 49)	Sí

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	E.I. duPont de Nemours and Co.	
	<120>	ETIQUETAS DE SOLUBILIDAD PARA LA EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS	
	<130>	CL3617 PCT	
5	<150>	US 11/782.836	
	<151>	25-07-2007	
	<160>	307	
	<170>	PatentIn version 3.5	
	<210>	1	
10	<211>	4945	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	plásmido	
15	<400>	1	
		agatctcgat cccgcgaaat taatagcact cactataggg agaccacaac ggtttccctc	60
		tagaaataat tttgtttaac ttttaagaagg agatatacat atgtcgtact accatcacca	120
		tcaccatcac ctcgaaatcaa caagtttgta caaaaaagca ggctccgcgg ccgccccctt	180
		caccggatcc atcgatccac gtttccacga aaactggccg tctgccggcg gtacctctac	240
		ttccaaagct tccaccacta cgacttctag caaaaccacc actacatcct ctaagactac	300
		cacgactacc tccaaaacct ctactacctc tagctcctct acgggcggcg ccaactcacia	360
		gacctctact cagcgtctgc tggctgcata atgaaagggg gggcgcgccg acccagcttt	420
		cttgtaaaa gtggttgatt cgaggctgct aacaaagccc gaaaggaagc tgagttggct	480
		gctgccaccg ctgagcaata actagcataa ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg	540
		ggttttttgc tgaaaggagg aactatatcc ggatatccac aggacgggtg tggtcgccat	600
		gatcgcgtag tcgatagtgg ctccaagtag cgaagcgagc aggactgggc ggcgccaaa	660
		gcggtcggac agtgctccga gaacgggtgc gcatagaaat tgcataacg catatagcgc	720
		tagcagcacg ccatagtgac tggcgatgct gtcggaatgg acgatatccc gcaagaggcc	780
		cggcagtacc ggcataacca agcctatgcc tacagcatcc agggtgacgg tgccgaggat	840
		gacgatgagc gcattgttag atttcataca cgggtgcctga ctgcgttagc aatttaactg	900
		tgataaacta ccgcattaaa gcttatcgat gataagctgt caaacatgag aattcttgaa	960
		gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggtaa tgcatagata ataatggttt	1020

ES 2 439 702 T3

cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgvcgcy aaccctatt tgtttatfff 1080
 tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 1140
 aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgcctt attccctfff 1200
 ttgvcgcatf ttgccttctt gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 1260
 ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaaat ggatctcaac agcggtaaga 1320
 tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactfff aaagttctgc 1380
 tatgtggcgc ggtattatcc cgtgttgacg ccgggcaaga gcaactcggf cgcgcatac 1440
 actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 1500
 gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgvcgcca 1560
 acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 1620
 gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 1680
 acgagvcgta caccacgatg cctgcagcaa tggcaacaac gttgvcgcaa ctattaactg 1740
 vcgaaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 1800
 ttgcaggacc acttctgcgc tvcgcccctc cvgctggtg gtttattgct gataaatctg 1860
 gagccvcgta gcgtgggtct cvcggatca ttgcagcact ggggvcagat ggtaagccct 1920
 cccgatvcgt agttatctac acgacvcgga gtcagvcgca tatggatgaa cvgaaatagac 1980
 agatvcgtga gataggtgcc tcaactgatta agcattvcgta actgvcgac caagtttact 2040
 catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 2100
 tcctttttga taatctcatg accaaaaatcc cttaacgtga gttttcgtc cactgagvcgt 2160
 cagacccvcgt agaaaagatc aaagvatctt cttgagatcc tttttttctg cvcgtaatct 2220
 gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccvcctac cagvcggtggf ttgtttgvcg gatcaagagc 2280
 taccaactct ttttccgaag gtaactvcgt tcagcagagc gcagatacca aatactvcct 2340
 ttctagtgta gccgtagtta gvcaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 2400
 tvcctctgct aatcctgta ccagtvgtg ctgvcagtv gataagtv tgtcttaccg 2460
 ggttgactc aagacvatag ttaccvcgata agvcvcagvc gtcvcggtga acvcgvcggt 2520
 cvtgcacaca gccagcttg gagvcgaaac cctacaccga actgagatac ctacagvcgt 2580
 agctatgaga aagvcccacg ctcccgaag gvagaaagvc gvacagvat ccggtaaagvc 2640
 gcagvcgvcg aacagvcagag cvcagvcagvc agcttccagvc gvcgaaacvc ttgvatcttt 2700
 atagtcctgt cvggtttvcg cacctctgac ttgagvcctg atttttgtga tvcctvcgac 2760
 gvcgvcgvcg cctatvcgaaa aacvcccagca acvcgvcctt tttacvcgtc ctgvcctttt 2820

ES 2 439 702 T3

gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 2880
ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt 2940
cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcctga tgcggtatTT tctccttacg catctgtgcg 3000
gtatttcaca ccgcatatat ggtgcaactc cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt 3060
aagccagtat aactcgcgt atcgctacgt gactgggtca tggctgcgcc ccgacacccg 3120
ccaacacccg ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgctcc cggcatccgc ttacagacaa 3180
gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcacc accgaaacgc 3240
gcgaggcagc tgcggtaaag ctcatcagcg tggctcgtgaa gcgattcaca gatgtctgcc 3300
tgttcatccg cgtccagctc gttgagtttc tccagaagcg ttaatgtctg gcttctgata 3360
aagcgggcca tgtaagggc ggttttttcc tgtttggca ctgatgcctc cgtgtaaggg 3420
ggatttctgt tcatgggggt aatgataccg atgaaacgag agaggatgct cacgatacgg 3480
gttactgatg atgaacatgc ccggttactg gaacgttggtg agggtaaaca actggcggta 3540
tggatgcggc gggaccagag aaaaatcaact cagggtcaat gccagcgctt cgttaataca 3600
gatgtagggt tccacaggg tagccagcag catcctgcga tgcagatccg gaacataatg 3660
gtgcagggcg ctgacttccg cgtttccaga ctttacgaaa cacggaaacc gaagaccatt 3720
catgttggtg ctgaggtcgc agacgttttg cagcagcagt cgttcaactc tcgctcgcgt 3780
atcggtgatt cattctgcta accagtaagg caaccccgcc agcctagccg ggtcctcaac 3840
gacaggagca cgatcatgcg caccctggc caggacccaa cgctgcccga gatgcgccgc 3900
gtgcggctgc tggagatggc ggacgcgatg gatatggtct gccaaagggt ggtttgcgca 3960
ttcacagttc tccgaagaa ttgattggct ccaattcttg gagtggtgaa tccgttagcg 4020
aggtgccgcc ggcttcatt caggtcgagg tggcccggct ccatgcaccg cgacgcaacg 4080
cggggaggca gacaaggat agggcggcgc ctacaatcca tgccaacccg ttccatgtgc 4140
tcgccgaggc ggcataaatc gccgtgacga tcagcggctc agtgatcgaa gttaggctgg 4200
taagagccgc gagcgatcct tgaagctgtc cctgatggtc gtcactacc tgccctggaca 4260
gcatggcctg caacgcgggc atcccgatgc cggcgaagc gagaagaatc ataatgggga 4320
aggccatcca gcctcgcgtc gcgaacgcca gcaagacgta gccagcgcg tcggccgcca 4380
tgccggcgat aatggcctgc ttctcgccga aacgtttggt ggcgggacca gtgacgaagg 4440
cttgagcgag ggcgtgcaag attccgaata ccgcaagcga caggccgatc atcgtcgcgc 4500
tccagcgaaa gcggtcctcg ccgaaaatga cccagagcgc tgccggcacc tgcctacga 4560
gttgcgatgat aaagaagaca gtcataagtg cggcgacgat agtcatgcc ccgcccacc 4620
ggaaggagct gactgggttg aaggctctca agggcatcgg tcgatcgacg ctctccctta 4680

ES 2 439 702 T3

```

tgcgactcct gcattaggaa gcagcccagt agtaggttga ggccgttgag caccgcccgc 4740
gcaaggaatg gtgcatgcaa ggagatggcg cccaacagtc ccccggccac ggggcctgcc 4800
accataccca cgccgaaaca agcgctcatg agcccgaagt ggcgagcccg atcttcccca 4860
tcggtgatgt cggcgatata ggcgccagca accgcacctg tggcgccggt gatgccggcc 4920
acgatgcgtc cggcgtagag gatcg 4945

```

```

<210> 2
<211> 5113
<212> ADN
5 <213> secuencia artificial

```

```

<220>
<223> plásmido

```

```

<400> 2

```

```

aagaaaccaa ttgtccatat tgcacagac attgccgtca ctgcgctctt tactggctct 60
tctcgtaac caaacggta accccgctta ttaaagcat tctgtaacaa agcgggacca 120
aagccatgac aaaaacgct aacaaaagt tctataatca cggcagaaaa gtccacattg 180
attatgtgca cggcgtcaca ctttgcctat ccatagcatt tttatccata agattagcgg 240
atcttacctg acgcttttta tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg ttttttgggc 300
taacaggagg aattacatat gcatacccca gaacacatca ccgccgtggt acagcgcttt 360
gtggctgcgc tcaatgccgg cgatctggac ggcacgtcgc cgctgtttgc cgatgacgcc 420
acggtggaag agcccggtgg ttccgagccc aggtccggtg cggctgcgtg tcgtgagttt 480
tacgccaact cgctcaaact gcctttggcg gtggagctga cgcaggagtg ccgcgcggtc 540
gccaacgaag cggccttcgc tttaccgctc agcttcgagt atcagggccg caagaccgta 600
gttgccctct gtgatcactt tcgcttcaat ggcgccggca aggtggtgag catccgccc 660
ttgtttggcg agaagaatat tcacgcatgc cagggatccg acccaggtaa tacttctcaa 720
ctgtccactg gtaaaggtaa cacctctcag ctgtctaccg gcaaaggtaa tacctctcaa 780
ctgagcacgg gtaaaggctg gggatgatcc ggtaacacca gccagctgtc tacgggtaaa 840
ggtaacacgt cccagctgag cactggcaaa ggtaaacact ctcagctgtc cacgggcaaa 900
ggttggggtg actaataagg cgcgccgacc cagctttctt gtacaaagtg gttgattcga 960
ggctgctaac aaagcccga aggaagctga gttggctgct gccaccgctg agcaataact 1020
agcataacc cttggggcct ctaaacgggt cttgaggggt tttttgctga aaggaggaac 1080
tatatccgga tatecacagg acgggtgtgg tcgcatgat cgcgtagtcg atagtggctc 1140
caagtagcga agcgagcagg actgggcggc ggccaaagcg gtcggacagt gctccgagaa 1200

```

ES 2 439 702 T3

cgggtgcgca tagaaattgc atcaacgcat atagcgctag cagcacgcca tagtgactgg 1260
 cgatgctgtc ggaatggacg atatcccgca agaggcccgg cagtaccggc ataaccaagc 1320
 ctatgcctac agcatccagg gtgacggtgc cgaggatgac gatgagcgca ttgttagatt 1380
 tcatacacgg tgcctgactg cgttagcaat ttaactgtga taaactaccg cattaagct 1440
 tatcgatgat aagctgtcaa acatgagaat tcgaagcttg gctgttttgg cggatgagag 1500
 aagattttca gcctgataca gattaaatca gaacgcagaa gcggctctgat aaaacagaat 1560
 ttgcctggcg gcagtagcgc ggtggtccca cctgaccca tgccgaactc agaagtgaaa 1620
 cgccgtagcg ccgatggtag tgtgggtct ccccatgcga gagtagggaa ctgccaggca 1680
 tcaaataaaa cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt cgttttatct gttgtttgtc 1740
 ggtgaacgct ctctgagta ggacaaatcc gccgggagcg gatttgaacg ttgcgaagca 1800
 acggcccgga ggggtggcggg caggacgccc gccataaact gccaggcatc aaattaagca 1860
 gaaggccatc ctgacggatg gcctttttgc gtttctacaa actcttttgt ttatttttct 1920
 aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 1980
 attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg 2040
 cggcattttg ccttctgtt tttgtcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 2100
 aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 2160
 ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaa gttctgctat 2220
 gtggcgcggt attatccgt gttgacgccc ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact 2280
 attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 2340
 tgacagtaag agaattatgc agtctgcca taacatgag tgataacact gcggccaact 2400
 tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc tttttgcac aacatggggg 2460
 atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 2520
 agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaaacta ttaactggcg 2580
 aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg 2640
 caggaccact tctgcgtcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag 2700
 ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc 2760
 gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 2820
 tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggttaact gtcagaccaa gtttactcat 2880
 atatacttta gattgattta aaacttcatt ttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc 2940
 ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 3000
 accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 3060

ES 2 439 702 T3

gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac 3120
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc 3180
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 3240
ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtgccga taagtctgtg cttaccgggt 3300
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 3360
gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 3420
tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcggga caggtatccg gtaagcggca 3480
gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 3540
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 3600
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct 3660
ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tateccctga ttctgtggat aaccgtatta 3720
ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag 3780
tgagcgagga agcgggaagag cgcctgatgc ggtattttct ccttacgcat ctgtgcggta 3840
ttcacaccg catatatggt gactctcag tacaatctgc tctgatgccg catagttaag 3900
ccagtataca ctccgctatc gctacgtgac tgggtcatgg ctgcgccccg acaccgcca 3960
acaccgctg acgcgcctg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct 4020
gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg 4080
aggcagcaga tcaattcgcg cgcgaaggcg aagcggcatg cataatgtgc ctgtcaaatg 4140
gacgaagcag ggattctgca aaccctatgc tactccgtca agccgtcaat tgtctgattc 4200
gttaccaatt atgacaactt gacggctaca tcattcactt tttcttcaca accggcacgg 4260
aactcgctcg ggctggcccc ggtgcatttt ttaaataccc gcgagaaata gagttgatcg 4320
tcaaaaccaa cattgcgacc gacgggtggc ataggcatcc ggggtgtgct caaaagcagc 4380
ttcgctggc tgatacgttg gtcctcgcgc cagcttaaga cgctaatccc taactgctgg 4440
cggaaaagat gtgacagacg cgacggcgac aagcaaacat gctgtgcgac gctggcgata 4500
tcaaaattgc tgtctgccag gtgatcgctg atgtactgac aagcctcgcg taccgatta 4560
tccatcgggtg gatggagcga ctcgttaatc gcttccatgc gccgcagtaa caattgctca 4620
agcagattta tcgccagcag ctccgaatag cgccttccc cttgcccggc gttaatgatt 4680
tgcccaaaca ggtcgtgaa atgcggctgg tgcgcttcat ccgggcgaaa gaaccccgta 4740
ttggcaaata ttgacggcca gttaagccat tcatgccagt aggcgcgcgg acgaaagtaa 4800
accactggt gataccattc gcgagcctcc ggatgacgac cgtagtgatg aatctctcct 4860

ES 2 439 702 T3

ggcgggaaca gcaaaatata acccggtcgg caaacaatt ctcgtccctg atttttcacc 4920

accccctgac cgcgaatggt gagattgaga atataacctt tcattcccag cggtcggtcg 4980

ataaaaaaat cgagataacc gttggcctca atcggcgta aaccggccac cagatgggca 5040

ttaaacgagt atcccggcag caggggatca ttttgcgctt cagccatact tttcatactc 5100

ccgccattca gag 5113

<210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Péptidos de unión al pelo

<400> 3

Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala
 1 5 10

10 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 15 <223> Péptidos de unión al pelo

<400> 4

Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr
 1 5

20 <210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Péptidos de unión al pelo

<400> 5

Arg Thr Asn Ala Ala Asp His Pro
 1 5

25 <210> 6
 <211> 210
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> Construcción sintética. secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de unión al pelo multi-bloque

<400> 6

ES 2 439 702 T3

ggatccgata cgaacaccag tcagctgagt accggcggcg gccgcaccaa cgccgcggat 60
 catccgaaat gtggcggcgg caacaccage cagctgagca cgggtggcgg ccgtaccaat 120
 gcggcggatc atccgaaatg tgggtggtggc aatacctctc agctgagcac gggcggcggc 180
 cgtaccaatg ccgcggatca tccgaaatgc 210

<210> 7
 <211> 70
 <212> PRT
 5 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética. Péptido de unión al pelo multi-bloque
 <400> 7

Gly Ser Asp Pro Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Gly Arg Thr
 1 5 10 15

Asn Ala Ala Asp His Pro Lys Cys Gly Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu
 20 25 30

Ser Thr Gly Gly Gly Arg Thr Asn Ala Ala Asp His Pro Lys Cys Gly
 35 40 45

Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Gly Arg Thr Asn Ala
 50 55 60

Ala Asp His Pro Lys Cys
 65 70

10 <210> 8
 <211> 219
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 15 <223> Construcción sintética. Secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de unión al pelo multi-bloque
 <400> 8

ggatccgacc caggtaatac ttctcaactg tccactggta aaggtaaacac ctctcagctg 60
 tctaccggca aaggtaatac ctctcaactg agcacgggta aaggctgggg tgatccgggt 120
 aacaccagcc agctgtctac gggtaaaggt aacacgtccc agctgagcac tggcaaaggt 180
 aacaattctc agctgtccac gggcaaaggt tggggtgac 219

<210> 9
 <211> 73
 <212> PRT
 20 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> péptido de unión al pelo

ES 2 439 702 T3

<400> 9

Gly Ser Asp Pro Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Lys Gly Asn
1 5 10 15

Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Lys Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr
20 25 30

Gly Lys Gly Trp Gly Asp Pro Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly
35 40 45

Lys Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Lys Gly Asn Thr Ser Gln
50 55 60

Leu Ser Thr Gly Lys Gly Trp Gly Asp
65 70

<210> 10

<211> 195

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética. Secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de unión al pelo multi-bloque

<400> 10

ggatccgacc ctggtatccc gtggtggaac attcgcgcac ctctgaatgc tggtgctggt 60

attccgtggt ggaacatccg tgctcctctg aacgcgggtg gctccggtec gggctccggt 120

ggcaacacga gccaaactgag caccggtggt ggcaaacactt cccagctgtc caccggcggt 180

10 ccgaaaaagt aataa 195

<210> 11

<211> 63

<212> PRT

<213> secuencia artificial

15 <220>

<223> péptido de unión al pelo

<400> 11

Gly Ser Asp Pro Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn
1 5 10 15

ES 2 439 702 T3

Ala Gly Ala Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala
 20 25 30

Gly Gly Ser Gly Pro Gly Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr
 35 40 45

Gly Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Pro Lys Lys
 50 55 60

<210> 12

<211> 120

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética. Secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de unión al pelo multi-bloque

<400> 12

ggatccgacc ctaatacttc tcaactgtct actggtggtg gtggtcatgg ccaccagaaa 60

cagcatggtc tgggccacgg ccacaaacac ggccacggtc acggtcatgg ccacggcaaa 120

10 <210> 13

<211> 40

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> péptido de unión al pelo

<400> 13

Gly Ser Asp Pro Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Gly Gly His
 1 5 10 15

Gly His Gln Lys Gln His Gly Leu Gly His Gly His Lys His Gly His
 20 25 30

Gly His Gly His Gly His Gly Lys
 35 40

<210> 14

<211> 117

20 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética. Secuencia de ácido nucleico que codifica una etiqueta de cuerpo de inclusión IBT103

<400> 14

25 cagcagcgtt tccagtggca gttcgaacag cagccgcgtg gtcagcagcg tttccagtgg 60
 cagttcgaac agcagccgga aggtcagcag cgtttccagt ggcagttcga acagcag 117

<210> 15

<211> 39

<212> PRT

ES 2 439 702 T3

<213> secuencia artificial

<220>

<223> etiqueta de cuerpo de inclusión IBT103

<400> 15

Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Arg Gly Gln Gln
 1 5 10 15

Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Glu Gly Gln Gln Arg Phe
 20 25 30

Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln
 5 35

<210> 16
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética. Secuencia de ácido nucleico que codifica una etiqueta de cuerpo de inclusión IBT136

<400> 16

atgcagcagc gttccagtg gcagttcgaa cagcag 36

15 <210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> etiqueta de cuerpo de inclusión IBT136

20 <400> 17

Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln
 1 5 10

<210> 18
 <211> 78
 <212> ADN
 25 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética. Secuencia de ácido nucleico que codifica una etiqueta de cuerpo de inclusión IBT138

<400> 18

atgcagcagc gtttccagtg gcagttcgaa cagcagccgg aaggtcagca gcgtttccag 60

tggcagttcg aacagcag 78

30 <210> 19
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 35 <223> etiqueta de cuerpo de inclusión IBT138

ES 2 439 702 T3

<400> 19
 Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Glu Gly Gln Gln
 1 5 10 15
 Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln
 20 25
 <210> 20
 <211> 162
 5 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética. Secuencia de ácido nucleico que codifica una etiqueta de cuerpo de inclusión IBT139
 <400> 20
 atgcagcagc gtttccagtg gcagttcgaa cagcagccgc gtggtcagca gcgtttccag 60
 tggcagttcg aacagcagcc gcgtggtcag cagcgtttcc agtggcagtt cgaacagcag 120
 10 ccggaaggtc agcagcgttt ccagtggcag ttcgaacagc ag 162
 <210> 21
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 15 <220>
 <223> etiqueta de cuerpo de inclusión IBT139
 <400> 21
 Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Arg Gly Gln Gln
 1 5 10 15
 Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Arg Gly Gln Gln Arg Phe
 20 25 30
 Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Glu Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp
 35 40 45
 Gln Phe Glu Gln Gln
 50
 20 <210> 22
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Construcción sintética. Secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de unión al pelo multi-bloque
 <400> 22

ES 2 439 702 T3

gacctggca ttccgtggtg gaacattcgt gtcctctga atgcaggtgc gggcatcct 60
 tggtggaata ttcgtgctcc gctgaacgcc ggtggttccg gtccgggtag cggtggtaat 120
 acttctcagc tgtccacggg tggcggtaac actagccagc tgagcacggg cggccctaaa 180
 aagccgggcg acccgggtat tccgtggtgg aatattcgtg ccccgctgaa cgcaggtgcc 240
 ggcattccgt ggtggaacat tcgtgcacct ctgaatgctg gtggttccgg tccaggctct 300
 ggcggcaaca cttcccagct gtccaccggc ggtggcaaca ccagccagct gtctactggt 360
 ggtccgaaga aaccgggtga ctaataa 387

<210> 23
 <211> 129
 <212> PRT
 5 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética. Péptido de unión al pelo multi-bloque

<400> 23

Gly Ser Asp Pro Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn
 1 5 10 15

Ala Gly Ala Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala
 20 25 30

Gly Gly Ser Gly Pro Gly Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr
 35 40 45

Gly Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Pro Lys Lys Pro
 50 55 60

Gly Asp Pro Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala
 65 70 75 80

Gly Ala Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala Gly
 85 90 95

Gly Ser Gly Pro Gly Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly
 100 105 110

Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Pro Lys Lys Pro Gly
 115 120 125

10 Asp

<210> 24
 <211> 555

ES 2 439 702 T3

<212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética – gen quimérico que codifica un péptido de fusión IBT139-HC776124

5 <400> 24
 atgcagcagc gtttccagtg gcagttcgaa cagcagccgc gtggtcagca gcgtttccag 60
 tggcagttcg aacagcagcc gcgtggtcag cagcgtttcc agtggcagtt cgaacagcag 120
 ccggaaggtc agcagcgttt ccagtggcag ttcgaacagc agggatccga ccctggcatt 180
 ccgtggtgga acattcgtgc tcctctgaat gcaggtgcgg gcatcccttg gtggaatatt 240
 cgtgctccgc tgaacgccgg tggttccggc ccgggtagcg gtggaatac ttctcagctg 300
 tccacgggtg gcggtaacac tagccagctg agcacgggcg gccctaaaa gccgggagac 360
 ccgggtatcc cgtggtggaa tatccgtgcc ccgctgaacg caggtgccgg catcccgtgg 420
 tggaacattc gtgcacctct gaatgctggt ggttccggtc caggctctgg cggcaacact 480
 tcccagctgt ccaccggcgg tggcaacacc agccagctgt ctactggtgg tccgaagaaa 540
 ccgggtgact aataa 555

<210> 25
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido de fusión IBT139-HC776124

<400> 25
 Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Arg Gly Gln Gln
 1 5 10 15

ES 2 439 702 T3

Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Arg Gly Gln Gln Arg Phe
 20 25 30

Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Glu Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp
 35 40 45

Gln Phe Glu Gln Gln Gly Ser Asp Pro Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile
 50 55 60

Arg Ala Pro Leu Asn Ala Gly Ala Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg
 65 70 75 80

Ala Pro Leu Asn Ala Gly Gly Ser Gly Pro Gly Ser Gly Gly Asn Thr
 85 90 95

Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly
 100 105 110

Gly Pro Lys Lys Pro Gly Asp Pro Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg
 115 120 125

Ala Pro Leu Asn Ala Gly Ala Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala
 130 135 140

Pro Leu Asn Ala Gly Gly Ser Gly Pro Gly Ser Gly Gly Asn Thr Ser
 145 150 155 160

Gln Leu Ser Thr Gly Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly
 165 170 175

Pro Lys Lys Pro Gly Asp
 180

<210> 26

<211> 144

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética. Secuencia de ácido nucleico que codifica una etiqueta de cuerpo de inclusión IBT186

<400> 26

atggcttctt gtggtcagca acgtttccaa tggcaatttg aacagcagcc tcgctgcggt 60

caacagcgct tccagtggca gtttgaacag cagccagaat gcggtcagca acgctttcag 120

tggcaatttg aacaacaacc gtgc 144

ES 2 439 702 T3

<210> 27
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética. Etiqueta de cuerpo de inclusión IBT186
 <400> 27

Met	Ala	Ser	Cys	Gly	Gln	Gln	Arg	Phe	Gln	Trp	Gln	Phe	Glu	Gln	Gln
1				5					10					15	
Pro	Arg	Cys	Gly	Gln	Gln	Arg	Phe	Gln	Trp	Gln	Phe	Glu	Gln	Gln	Pro
			20					25					30		
Glu	Cys	Gly	Gln	Gln	Arg	Phe	Gln	Trp	Gln	Phe	Glu	Gln	Gln	Pro	Cys
		35					40					45			

<210> 28
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10

<220>
 <223> Construcción sintética – Gen quimérico que codifica el péptido de fusión IBT186-HC776124

15

<400> 28

atggctagct	gtggtcagca	acgtttccaa	tggcaatttg	aacagcagcc	tcgctgcggt	60
caacagcgct	tccagtggca	gtttgaacag	cagccagaat	gcggtcagca	acgctttcag	120
tggcaatttg	aacaacaacc	gtgcggatcc	gaccctggca	ttcctgtgtg	gaacattcgt	180
gctcctctga	atgcaggtgc	gggcatccct	tggtggaata	ttcgtgctcc	gctgaacgcc	240
ggtggttccg	gtccgggtag	cggtggtaat	acttctcagc	tgtccacggg	tggcggtaac	300
actagccagc	tgagcacggg	cggccctaaa	aagccgggcg	acccgggtat	tccgtggtgg	360
aatatccgtg	ccccgctgaa	cgcaggtgcc	ggcatcccgt	ggtggaacat	tcgtgcacct	420
ctgaatgctg	gtggttccgg	tccaggctct	ggcggcaaca	cttcccagct	gtccaccggc	480
ggtggcaaca	ccagccagct	gtctactggt	ggtccgaaga	aaccgggtga	ctaa	534

<210> 29
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

20

<220>
 <223> Construcción sintética – Péptido de fusión IBT186-HC776124
 <400> 29

ES 2 439 702 T3

Met Ala Ser Cys Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln
 1 5 10 15

Pro Arg Cys Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro
 20 25 30

Glu Cys Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Cys
 35 40 45

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

Ala Gly Ala Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala
 65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Pro Gly Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr
 85 90 95

Gly Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Pro Lys Lys Pro
 100 105 110

Gly Asp Pro Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala
 115 120 125

Gly Ala Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala Gly
 130 135 140

Gly Ser Gly Pro Gly Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly
 145 150 155 160

Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Pro Lys Lys Pro Gly
 165 170 175

Asp

<210> 30

<211> 186

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Construto sintético. Secuencia de ácido nucleico que codifica una etiqueta de cuerpo de inclusión IBT139.CCPGCC

<400> 30

10 atgcagcagc gtttccagtg gcagttcgaac cagcagccgc gtggtcagca gcgtttccag 60

ES 2 439 702 T3

tggcagttcg aacagcagcc gcgtggtcag cagcgtttcc agtggcagtt cgaacagcag 120
 ccggaaggtc agcagcgttt ccagtggcag ttcgaacagc agggatcttg ctgtccgggc 180
 tgttgc 186

<210> 31
 <211> 61
 <212> PRT
 5 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética – etiqueta de cuerpo de inclusión IBT139.CCPGCC

<400> 31

Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Arg Gly Gln Gln
 1 5 10 15

Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Arg Gly Gln Gln Arg Phe
 20 25 30

Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Glu Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp
 35 40 45

Gln Phe Glu Gln Gln Gly Ser Cys Cys Pro Gly Cys Cys
 50 55 60

10 <210> 32
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 15 <223> Construcción sintética – secuencia de ácido nucleico que codifica la etiqueta de tetracisteína

<400> 32

tgctgtccgg gctgttgc 18

<210> 33
 <211> 6
 20 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética – etiqueta de tetracisteína

<400> 33

Cys Cys Pro Gly Cys Cys
 25 1 5

<210> 34
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador

ES 2 439 702 T3

<400> 34
 gatcttgctg tccgggctgt tgcg 24
 <210> 35
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 35
 10 gatccgcaac agcccggaca gcaa 24
 <210> 36
 <211> 579
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Construcción sintética – gen quimérico que codifica el péptido de fusión IBT139.CCPGCC-HC776124
 <400> 36
 atgcagcagc gtttccagtg gcagttcgaa cagcagccgc gtggtcagca gcgtttccag 60
 tggcagttcg aacagcagcc gcgtggtcag cagcgtttcc agtggcagtt cgaacagcag 120
 ccggaaggtc agcagcgttt ccagtggcag ttcgaacagc agggatcttg ctgtccgggc 180
 tgttgcggat ccgaccctgg cattccgtgg tggaacattc gtgctcctct gaatgcaggt 240
 gcgggcatcc cttggtggaa tattcgtgct ccgctgaacg ccggtggttc cgggccgggt 300
 agcggtggtg atacttctca gctgtccacg ggtggcggtg aactagcca gctgagcacg 360
 ggccggccta aaaagccggg cgaccgggtt attccgtggt ggaatatccg tgccccgctg 420
 aacgcaggtg ccggcatccc gtggtggaac attcgtgcac ctctgaatgc tggtggttcc 480
 ggtccaggct ctggcggcaa cacttcccag ctgtccaccg gcggtggcaa caccagccag 540
 ctgtctactg gtggtccgaa gaaaccgggt gactaataa 579
 <210> 37
 20 <211> 190
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética – péptido de fusión IBT139.CCPGCC-HC776124
 25 <400> 37

ES 2 439 702 T3

Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Arg Gly Gln Gln
 1 5 10 15

Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Arg Gly Gln Gln Arg Phe
 20 25 30

Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Glu Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp
 35 40 45

Gln Phe Glu Gln Gln Gly Ser Cys Cys Pro Gly Cys Cys Gly Ser Asp
 50 55 60

Pro Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala Gly Ala
 65 70 75 80

Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala Gly Gly Ser
 85 90 95

Gly Pro Gly Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Gly
 100 105 110

Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Pro Lys Lys Pro Gly Asp Pro
 115 120 125

Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala Gly Ala Gly
 130 135 140

Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala Gly Gly Ser Gly
 145 150 155 160

Pro Gly Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Gly Asn
 165 170 175

Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Pro Lys Lys Pro Gly Asp
 180 185 190

<210> 38

<211> 120

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética. Secuencia de ácido nucleico que codifica la etiqueta del cuerpo de inclusión IBT182

<400> 38

ES 2 439 702 T3

atgcagcagc attttcattg gcattttcag cagcagccgc gcggccagca gcattttcat 60

tggcattttc agcagcagcc ggaaggccag cagcattttc attggcattt tcagcagcag 120

<210> 39
 <211> 39
 <212> PRT
 5 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética. Etiqueta de cuerpo de inclusión IBT182

<400> 39

Gln Gln His Phe His Trp His Phe Gln Gln Gln Pro Arg Gly Gln Gln
 1 5 10 15

His Phe His Trp His Phe Gln Gln Gln Pro Glu Gly Gln Gln His Phe
 20 25 30

His Trp His Phe Gln Gln Gln
 35

10 <210> 40
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 15 <223> Construcción sintética. Secuencia de ácido nucleico que codifica la etiqueta del cuerpo de inclusión IBT183

<400> 40

atgcagcagc attttcattg gcattttcag cagcagccgc gcggccagca gaaatttaaa 60

tggaaatttc agcagcagcc ggaaggccag cagcattttc attggcattt tcagcagcag 120

<210> 41
 <211> 39
 <212> PRT
 20 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética. Etiqueta del cuerpo de inclusión IBT183

<400> 41

Gln Gln His Phe His Trp His Phe Gln Gln Gln Pro Arg Gly Gln Gln
 1 5 10 15

Lys Phe Lys Trp Lys Phe Gln Gln Gln Pro Glu Gly Gln Gln His Phe
 20 25 30

25 His Trp His Phe Gln Gln Gln
 35

ES 2 439 702 T3

```

<210> 42
<211> 120
<212> ADN
<213> secuencia artificial

5 <220>
<223> Construcción sintética. Secuencia de ácido nucleico que codifica la etiqueta del cuerpo de inclusión IBT184

<400> 42
atgcagcaga aatttcattg gcattttcag cagcagccgc gcggccagca gaaatttcat      60
tggcattttc agcagcagcc ggaaggccag cagaaatttc attggcattt tcagcagcag      120

10 <210> 43
<211> 39
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética. Etiqueta del cuerpo de inclusión IBT184

15 <400> 43
Gln Gln Lys Phe His Trp His Phe Gln Gln Gln Pro Arg Gly Gln Gln
1          5          10          15

Lys Phe His Trp His Phe Gln Gln Gln Pro Glu Gly Gln Gln Lys Phe
20          25          30

His Trp His Phe Gln Gln Gln
35

20 <210> 44
<211> 144
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética. Secuencia de ácido nucleico que codifica la etiqueta del cuerpo de inclusión IBT185

<400> 44
atggctagcc cttgtgggtca gcaacgtttc caatggcaat ttgaacagca gccttgcggt      60
caacagcget tccagtggca gtttgaacag cagccatgcg gtcagcaacg ctttcagtgg      120
caatttgaac aacaaccgtg cggc      144

25 <210> 45
<211> 48
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
30 <223> Construcción sintética. Etiqueta del cuerpo de inclusión IBT185

<400> 45

```

ES 2 439 702 T3

Met Ala Ser Pro Cys Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln
 1 5 10 15

Gln Pro Cys Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro
 20 25 30

Cys Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Cys Gly
 35 40 45

<210> 46

<211> 120

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética. Secuencia de ácido nucleico que codifica la etiqueta del cuerpo de inclusión IBT187a

<400> 46

atgcagcaga aattttaaag gaaatttcag cagcagccgc gcggccagca gaaatttaaa 60

tggaaatttc agcagcagcc ggaaggccag cagaaattta aatggaaatt tcagcagcag 120

10 <210> 47

<211> 39

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética. Etiqueta del cuerpo de inclusión IBT187a

<400> 47

Gln Gln Lys Phe Lys Trp Lys Phe Gln Gln Gln Pro Arg Gly Gln Gln
 1 5 10 15

Lys Phe Lys Trp Lys Phe Gln Gln Gln Pro Glu Gly Gln Gln Lys Phe
 20 25 30

Lys Trp Lys Phe Gln Gln Gln
 35

<210> 48

<211> 162

20 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética. Secuencia de ácido nucleico que codifica la etiqueta del cuerpo de inclusión IBT187b

<400> 48

atgcagcaga aattttaaag gaaatttcag cagcagccgc gcggccagca gaaatttaaa 60

tggaaatttc agcagcagcc gcgcggccag cagaaattta aatggaaatt tcagcagcag 120

25 ccggaaggcc agcagaaatt taaatggaaa tttcagaagc ag 162

ES 2 439 702 T3

<210> 49
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5 <220>
 <223> Construcción sintética. Etiqueta del cuerpo de inclusión IBT187b
 <400> 49

Gln Gln Lys Phe Lys Trp Lys Phe Gln Gln Gln Pro Arg Gly Gln Gln
 1 5 10 15

Lys Phe Lys Trp Lys Phe Gln Gln Gln Pro Arg Gly Gln Gln Lys Phe
 20 25 30

Lys Trp Lys Phe Gln Gln Gln Pro Glu Gly Gln Gln Lys Phe Lys Trp
 35 40 45

Lys Phe Gln Lys Gln
 50

10 <210> 50
 <211> 5214
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Plásmido

15 <400> 50

agatctcgat cccgcgaaat taatagcact cactataggg agaccacaac ggtttccctc 60
 tagaaataat tttgtttaac tttaagaagg agatatacat atgcataccc cagaacacat 120
 caccgccgtg gtacagcgct ttgtggctgc gctcaatgcc ggcgatctgg acggcatcgt 180
 cgcgctgttt gccgatgacg ccacgggtgga agagcccgtg ggttccgagc ccaggtccgg 240
 tacggctgcg tgtcgtgagt tttacgcaa ctcgctcaaa ctgcctttgg cgggtggagct 300
 gacgcaggag tgccgcgagg tcgccaacga agcggccttc gctttcaccg tcagcttoga 360
 gtatcagggc cgcaagaccg tagttgcgcc ctgtgatcac tttcgcttca atggcgccgg 420
 caagtggtg agcatccgag ccttggttgg cgagaagaat attcacgcat gccagggatc 480

ES 2 439 702 T3

cgaccctggg atcccgtggg ggaacattcg cgcacctctg aatgctggg ctggatttcc 540
 gtgggtggaac atccgtgctc ctctgaacgc ggggtggctcc ggtccgggct ccgggtggcaa 600
 cacgagccaa ctgagcaccg gtgggtggcaa cacttcccag ctgtccaccg gcgggtccgaa 660
 aaagtaataa ggcgcgccga cccagctttc ttgtacaaaag tggttgattc gaggtctgcta 720
 acaaagcccc aaaggaagct gagttggctg ctgccaccgc tgagcaataa ctagcataac 780
 cccttggggc ctctaaacgg gtcttgaggg gttttttgct gaaaggagga actatatccg 840
 gatataccaca ggacgggtgt ggtcgccatg atcgcgtagt cgatagtggc tccaagtagc 900
 gaagcgagca ggactgggcg gcggccaaaag cggtcggaca gtgctccgag aacgggtgcg 960
 catagaaatt gcatcaacgc atatagcgtc agcagcacgc catagtgact ggcgatgctg 1020
 tcggaatgga cgatataccg caagaggccc ggcagtaccg gcataaccaa gcctatgcct 1080
 acagcatcca ggggtgacggg gccgaggatg acgatgagcg cattgttaga tttcatacac 1140
 ggtgcctgac tgcgttagca atttaactgt gataaactac cgcattaaag cttatcgatg 1200
 ataagctgtc aaacatgaga attcttgaag acgaaagggc ctcgatgatac gcctatTTTT 1260
 ataggttaat gtcataataa taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa 1320
 tgtgcgcgga acccctatTT gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat 1380
 gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca 1440
 acatttccgt gtcgccctta ttccctTTTT tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca 1500
 cccagaaaacg ctggtgaaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta 1560
 catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgTTT 1620
 tccaatgatg agcactTTta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtggtgacgc 1680
 cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc 1740
 accagtccaca gaaaagcctc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgctgc 1800
 cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa 1860
 ggagctaacc gctTTTTtgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga 1920
 accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgcagcaat 1980
 ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca 2040
 attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttc 2100
 ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccgggtgag cgtgggtctc gcggtatcat 2160
 tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag 2220
 tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag ataggtgcct cactgattaa 2280

ES 2 439 702 T3

gcat tggtaa ctgtcagacc aagtttactc atataactt tagattgatt taaaacttca 2340
ttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc 2400
ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc 2460
ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc 2520
agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt 2580
cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt 2640
caagaactct gtgacaccgc ctacatacct cgtctgcta atcctgttac cagtggctgc 2700
tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa 2760
ggcgcagcgg tcgggctgaa cggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac 2820
ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgcacgc tccccgaagg 2880
gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcggg acaggagagc gcacgagggg 2940
gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtctgtc gggtttcgcc acctctgact 3000
tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaa acgccagcaa 3060
cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc 3120
gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg 3180
ccgcagccga acgaccgagc gcagcagctc agtgagcag gaagcgggag agcgcctgat 3240
gcggtat ttttctccttacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcatatatg gtgcaactctc 3300
agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagtata cactccgcta tcgctacgtg 3360
actgggtcat ggctgcgccc cgacaccgc caacaccgc tgacgcgccc tgacgggctt 3420
gtctgtccc ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc 3480
agaggtttc accgtcatca ccgaaacgc cgaggcagct gcggtaaagc tcatcagcgt 3540
ggtcgtgaag cgattcacag atgtctgctt gttcatccgc gtccagctcg ttgagtttct 3600
ccagaagcgt taatgtctgg cttctgataa agcgggccat gtttaaggcg gtttttctc 3660
gtttggcac tgatgcctcc gtgtaagggg gatttctgtt catgggggta atgataccga 3720
tgaaacgaga gaggatgctc acgatacggg ttactgatga tgaacatgcc cggttactgg 3780
aacgttgtga gggtaaacaa ctggcggtat ggatgcggcg ggaccagaga aaaatcactc 3840
agggtaaatg ccagcgttc gttataacag atgtaggtgt tccacaggt agccagcagc 3900
atcctgcgat gcagatccgg aacataatgg tgcagggcgc tgacttccgc gtttccagac 3960
tttacgaaac acggaaccg aagaccattc atggtgtgctc tcaggtcgca gacgttttgc 4020
agcagcagtc gcttcaagtt cgtctcgtga tcggtgattc attctgctaa ccagtaaggc 4080
aaccgccca gcctagccgg gtcctcaacg acaggagcac gatcatgccc acccgtggcc 4140

ES 2 439 702 T3

```

aggaccaac gctgcccgag atgcgccgcg tgcggctgct ggagatggcg gacgcgatgg      4200
atatgttctg ccaagggttg gtttgccat tcacagttct ccgcaagaat tgattggctc      4260
caattcttgg agtgggtaat ccgttagcga ggtgccgccg gcttccattc aggtcgaggt      4320
ggccccgctc catgcaccgc gacgcaacgc ggggaggcag acaaggtata gggcggcgcc      4380
tacaatccat gccaaaccgt tccatgtgct cgccgaggcg gcataaatcg ccgtgacgat      4440
cagcggcca gtgatcgaag ttaggctggt aagagccgag agcgatcctt gaagctgtcc      4500
ctgatggctg tcatctacct gcctggacag catggcctgc aacgcgggca tcccgatgcc      4560
gccggaagcg agaagaatca taatgggaa ggccatccag cctcgcgctg cgaacgccag      4620
caagacgtag ccagcgcgt cggccgccat gccggcgata atggcctgct tctcggcga      4680
acgtttggtg gcgggaccag tgacgaaggc ttgagcgagg gcgtgcaaga ttccgaatac      4740
cgcaagcgac aggccgatca tcgtcgcgt ccagcgaag cggtcctcgc cgaaatgac      4800
ccagagcgt gccggcacct gtcctacgag ttgcatgata aagaagacag tcataagtgc      4860
ggcgacgata gtcatgcccc gcgccaccg gaaggagctg actgggttga aggctctcaa      4920
gggcatcggc cgatcgacgc tctcccttat gcgactcctg cattaggaag cagcccagta      4980
gtaggttgag gccgttgagc accgccgccg caaggaatgg tgcattgcaag gagatggcgc      5040
ccaacagtcc cccggccacg gggcctgcca ccataccac gccgaaaca gcgctcatga      5100
gcccgaagtg gcgagcccga tcttccccat cgggtgatgtc ggcgatatag gcgccagcaa      5160
ccgcacctgt ggcgccggtg atgccggcca cgatgcgtcc ggcgtagagg atcg      5214

```

- <210> 51
- <211> 6010
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Plásmido

<400> 51

```

aagaaaccaa ttgtccatat tgcattcagac attgccgtca ctgcgtcttt tactggctct      60
tctcgctaac caaacggta accccgctta ttaaagcat tctgtaaca agcgggacca      120
aagccatgac aaaaacgcgt acaaaaagt tctataatca cggcagaaaa gtccacattg      180
attatgtgca cggcgtcaca ctttgctatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg      240
atcttacctg acgcttttta tcgcaactct ctactgtttc tccataccg tttttgggc      300
taacaggagg aattacatat gcagcagcgt ttccagtggc agttcgaaca gcagccgcgt      360
ggtcagcagc gtttccagtg gcagttcgaa cagcagccgc gtggtcagca gcgtttccag      420

```

ES 2 439 702 T3

tggcagttcg aacagcagcc ggaaggtcag cagcgtttcc agtggcagtt cgaacagcag 480
 ggatccgacc ctggcattcc gtggtggaac attcgtgctc ctctgaatgc aggtgcgggc 540
 atcccttggg ggaatattcg tgctccgctg aacgccggtg gttccggtcc gggtagcggg 600
 ggtaataactt ctcaactgct cacgggtggc ggtaaaccta gccagctgag cacgggcggc 660
 cctaaaaagc cgggcgaccc gggatttccg tgggtggaata tccgtgcccc gctgaacgca 720
 ggtgccggca tcccgtggtg gaacattcgt gcacctctga atgctggtgg ttccggtcca 780
 ggctctggcg gcaacacttc ccagctgtcc accggcgggtg gcaacaccag ccagctgtct 840
 actggtggtc cgaagaaacc gggtgactaa taaggcgcgc cgaccagct ttcttgta 900
 aagtggttga ttcgaggctg ctaacaaagc ccgaaaggaa gctgagttgg ctgctgccac 960
 cgctgagcaa taactagcat aacccttgg ggcctctaaa cgggtcttga ggggtttttt 1020
 gctgaaagga ggaactatat ccggatatcc acaggacggg tgtggtcgcc atgatcgct 1080
 agtcgatagt ggctccaagt agcgaagcga gcaggactgg gcggcgcca aagcggctcg 1140
 acagtgtccc gagaacgggt gcgcatagaa attgcatcaa ccgcatatagc gctagcagca 1200
 cgccatagtg actggcgatg ctgtcggaat ggacgatata ccgcaagagg cccggcagta 1260
 ccggcataac caagcctatg cctacagcat ccagggtgac ggtgccgagg atgacgatga 1320
 gcgcattggt agatttcata cacgggtgct gactgcgcta gcaatttaac tgtgataaac 1380
 taccgcatga aagcttgcag tggcggtttt catggcttgt tatgactgtt tttttgggg 1440
 acagtctatg cctcgggcat ccaagcagca agcgcgttac gccgtgggtc gatgtttgat 1500
 gttatggagc agcaacgatg ttacgcagca gggcagtcgc cctaaaacaa agttaaacad 1560
 catgagggaa gcggtgatcg ccgaagtatc gactcaacta tcagaggtag ttggcgtcat 1620
 cgagcggcat ctgaaaccga cgttgctggc cgtacatttg tacggctccg cagtggatgg 1680
 cggcctgaag ccacacagtg atattgattt gctggttacg gtgaccgtaa ggcttgatga 1740
 aacaacgcgg cgagctttga tcaacgacct tttgaaact tcggcttccc ctggagagag 1800
 cgagattctc cgcgctgtag aagtcacatc tgttgtgcac gacgacatca ttccgtggcg 1860
 ttatccagct aagcgcgaac tgcaatttgg agaattggcag cgcaatgaca ttcttgacgg 1920
 tatcttcgag ccagccacga tcgacattga tctggctatc ttgctgacaa aagcaagaga 1980
 acatagcgtt gccttggtag gtccagcggc ggaggaactc tttgatccgg ttctgaaca 2040
 ggatctattt gaggcgctaa atgaaacctt aacgctatgg aactcggcg ccgactgggc 2100
 tggcgatgag cgaatgtag tgcttacggt gtcccgcatt tggtagcagc cagtaaccgg 2160
 caaaatcgcg ccgaaggatg tcgctgccga ctgggcaatg gagcgcctgc cggcccagta 2220
 tcagcccgtc atacttgaag ctgacagggc ttatcttggg caagaagaag atcgcttggc 2280

ES 2 439 702 T3

ctcgcgcgca gatcagttgg aagaatttgt ccactacgtg aaagcgcgaga tcaccaaggt 2340
 agtcggcaaa taatgtctaa caattcgttc aagcttggct gttttggcgg atgagagaag 2400
 attttcagcc tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttg 2460
 cctggcggca gtagcgcggt ggtcccacct gaccccatgc cgaactcaga agtgaaacgc 2520
 cgtagcgcgg atggtagtgt ggggtctccc catgcgagag tagggaactg ccaggcatca 2580
 aataaaacga aaggctcagt cgaaagactg ggcccttctg tttatctggt gtttgcggt 2640
 gaacgctctc ctgagtagga caaatccgcc gggagcggat ttgaacgttg cgaagcaacg 2700
 gccggaggg tggcgggag gacgcccgcc ataaactgcc aggcacaaa ttaagcagaa 2760
 ggccatcctg acggatggcc tttttgcggt tctacaaact cttttgttta tttttctaaa 2820
 tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt 2880
 gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcgg 2940
 cattttgcct tcctgttttt gctcaccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag 3000
 atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg 3060
 agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg 3120
 gcgcggtatt atcccgtgtt gacgcccggc aagagcaact cggtcgcccgc atacactatt 3180
 ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga 3240
 cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac 3300
 ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc 3360
 atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc 3420
 gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac 3480
 tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag 3540
 gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg 3600
 gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtgag ccctcccgtg 3660
 tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg 3720
 ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata 3780
 tactttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt 3840
 ttgataatct catgaccaaa atccctaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc 3900
 ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct 3960
 tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa gagctaccaa 4020
 ctctttttcc gaaggttaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag 4080

ES 2 439 702 T3

tgtagccgta gttaggcoac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc 4140
 tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtcct accgggttgg 4200
 actcaagacg atagttaccg gataaaggcg agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca 4260
 cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat 4320
 gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg 4380
 tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgccctggat ctttatagtc 4440
 ctgtcggggt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc 4500
 ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttaag gttcctggcc ttttctggc 4560
 cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg 4620
 cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gaggcagtga 4680
 gcgaggaagc ggaagagcgc ctgatgcggg attttctcct tacgcatctg tgcggtatth 4740
 cacaccgcat atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca 4800
 gtatacactc cgctatcgct acgtgactgg gtcgatggtg cgcctcgaca cccgccaaca 4860
 cccgctgacg cgccctgacg ggcttgtctg ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg 4920
 accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg ttttaccgt catcacgaa acgcgcgagg 4980
 cagcagatca attcgcgcgc gaaggcgaag cggcatgcat aatgtgcctg tcaaatggac 5040
 gaagcagggg ttctgcaaac cctatgctac tccgtcaagc cgtcaattgt ctgattcgtt 5100
 accaattatg acaacttgac ggctacatca ttacttttt cttcacaacc ggcacggaac 5160
 tcgctcgggc tggccccggt gcatttttta aatacccgcg agaaatagag ttgatcgtca 5220
 aaaccaacat tgcgaccgac ggtggcgata ggcattccgg tgggtgctcaa aagcagcttc 5280
 gcctggctga tacgttggtc ctgcgcgcag cttaaagcgc taatccctaa ctgctggcgg 5340
 aaaagatgtg acagacgcga cggcgacaag caaacatgct gtgcgacgct ggcgatatca 5400
 aaattgctgt ctgccaggtg atcgtgatg tactgacaag cctcgcgtac ccgattatcc 5460
 atcggtgatg ggagcgactc gttaatcgt tccatgcgcc gcagtaacaa ttgctcaagc 5520
 agatttatcg ccagcagctc cgaatagcgc ccttcccctt gcccgcggtt aatgatttgc 5580
 ccaaacaggt cgctgaaatg cggctggtgc gcttcatccg ggcgaaagaa ccccgattg 5640
 gcaaatattg acggccagtt aagccattca tgccagtagg cgcgcggacg aaagtaaacc 5700
 cactgggtgat accattcggc agcctccgga tgacgaccgt agtgatgaat ctctcctggc 5760
 gggaacagca aaatatcacc cggtcggcaa acaaattctc gtcctgatt tttcaccacc 5820
 ccctgaccgc gaatggtgag attgagaata taacctttca ttcccagcgg tcggtcgata 5880
 aaaaaatcga gataaccggt gcctcaatc ggcgttaaac ccgccaccag atgggcatta 5940

ES 2 439 702 T3

aacgagtatc ccggcagcag gggatcattt tgcgcttcag ccatactttt cataactccc 6000

ccattcagag 6010

<210> 52
 <211> 381
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética. Secuencia de ácido nucleico que codifica KSI(C4)

<400> 52

atgcataccc cagaacacat caccgcccgtg gtacagcgtt ttgtggctgc gctcaatgcc 60

ggcgatctgg acggcatcgt cgcgctgttt gccgatgacg ccacgggtgga agagcccgtg 120

ggttccgagc ccaggtccgg tacggctgcg tgtcgtgagt tttacgcaa ctcgctcaaa 180

ctgcctttgg cgggtggagct gacgcaggag tgccgcgcgg tcgccaacga agcggccttc 240

gctttcaccg tcagcttcga gtatcagggc cgcaagaccg tagttgccc ctgtgatcac 300

tttcgcttca atggcgccgg caaggtggtg agcatccgcg ccttgtttgg cgagaagaat 360

attcacgcat gccagggatc c 381

10 <210> 53
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 15 <223> Construcción sintética. KSI(C4)

<400> 53

Met His Thr Pro Glu His Ile Thr Ala Val Val Gln Arg Phe Val Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Asn Ala Gly Asp Leu Asp Gly Ile Val Ala Leu Phe Ala Asp
 20 25 30

Asp Ala Thr Val Glu Glu Pro Val Gly Ser Glu Pro Arg Ser Gly Thr
 35 40 45

Ala Ala Cys Arg Glu Phe Tyr Ala Asn Ser Leu Lys Leu Pro Leu Ala
 50 55 60

Val Glu Leu Thr Gln Glu Cys Arg Ala Val Ala Asn Glu Ala Ala Phe
 65 70 75 80

Ala Phe Thr Val Ser Phe Glu Tyr Gln Gly Arg Lys Thr Val Val Ala

ES 2 439 702 T3

85 90 95

Pro Cys Asp His Phe Arg Phe Asn Gly Ala Gly Lys Val Val Ser Ile
 100 105 110

Arg Ala Leu Phe Gly Glu Lys Asn Ile His Ala Cys Gln
 115 120 125

<210> 54
 <211> 570
 <212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética. Gen quimérico que codifica el péptido de fusión KSI(C4)-HC77643

<400> 54

atgcataccc cagaacacat caccgccgtg gtacagcgtt ttgtggctgc gctcaatgcc 60
 ggcgatctgg acggcatcgt cgcgctgttt gccgatgacg ccacgggtgga agagcccgtg 120
 ggttccgagc ccaggtccgg tacggctgcg tgtcgtgagt tttacgcaa ctgctcaaa 180
 ctgcctttgg cgggtggagct gacgcaggag tgccgcgcgg tcgccaacga agcggccttc 240
 gctttcaccg tcagcttcca gtatcagggc cgcaagaccg tagttgcgcc ctgtgatcac 300
 tttcgttca atggcgccgg caaggtggtg agcatccgcg ccttgtttgg cgagaagaat 360
 attcacgcat gccagggatc cgaccctggg atcccgtggg ggaacattcg cgcacctctg 420
 aatgctggtg ctggtattcc gtggtggaac atccgtgctc ctctgaacgc ggggtggctcc 480
 ggtccgggct ccggtggcaa cacgagccaa ctgagcaccg gtggtggcaa cacttcccag 540
 ctgtccaccg gcggtccgaa aaagtaataa 570

10 <210> 55
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 15 <223> Construcción sintética. Péptido de fusión KSI(C4)-HC77643

<400> 55

Met His Thr Pro Glu His Ile Thr Ala Val Val Gln Arg Phe Val Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Asn Ala Gly Asp Leu Asp Gly Ile Val Ala Leu Phe Ala Asp
 20 25 30

Asp Ala Thr Val Glu Glu Pro Val Gly Ser Glu Pro Arg Ser Gly Thr

ES 2 439 702 T3

35

40

45

Ala Ala Cys Arg Glu Phe Tyr Ala Asn Ser Leu Lys Leu Pro Leu Ala
50 55 60

Val Glu Leu Thr Gln Glu Cys Arg Ala Val Ala Asn Glu Ala Ala Phe
65 70 75 80

Ala Phe Thr Val Ser Phe Glu Tyr Gln Gly Arg Lys Thr Val Val Ala
85 90 95

Pro Cys Asp His Phe Arg Phe Asn Gly Ala Gly Lys Val Val Ser Ile
100 105 110

Arg Ala Leu Phe Gly Glu Lys Asn Ile His Ala Cys Gln Gly Ser Asp
115 120 125

Pro Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala Gly Ala
130 135 140

Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala Gly Gly Ser
145 150 155 160

Gly Pro Gly Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Gly
165 170 175

Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Pro Lys Lys
180 185

<210> 56

<211> 4

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética. Espaciador

<400> 56

Pro Arg Cys Gly

1

10 <210> 57

<211> 4

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética. Espaciador

<400> 57

Pro Glu Cys Gly
 1
 <210> 58
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética. Secuencia central repetida
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 10 <222> (3).. (3)
 <223> Xaa = Arg, His, o Lys
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 15 <222> (5) .. (5)
 <223> Xaa = Gln, His, o Lys
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (7) .. (7)
 <223> Xaa = Gln, His, o Lys
 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (9) .. (9)
 <223> Xaa = Glu o Gln
 <220>
 25 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (10) .. (10)
 <223> Xaa = Gln o Lys
 <400> 58
 Gln Gln Xaa Phe Xaa Trp Xaa Phe Xaa Xaa Gln
 1 5 10
 30 <210> 59
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 59
 Tyr Pro Ser Phe Ser Pro Thr Tyr Arg Pro Ala Phe
 1 5 10
 <210> 60
 <211> 12
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 60

ES 2 439 702 T3

Asp Arg His Lys Ser Lys Tyr Ser Ser Thr Lys Ser
 1 5 10
 <210> 66
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 66
 Lys Asn Phe Pro Gln Gln Lys Glu Phe Pro Leu Ser
 1 5 10
 10 <210> 67
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 67
 Gln Arg Asn Ser Pro Pro Ala Met Ser Arg Arg Asp
 1 5 10
 20 <210> 68
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 68
 25 Thr Arg Lys Pro Asn Met Pro His Gly Gln Tyr Leu
 1 5 10
 <210> 69
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 69
 Lys Pro Pro His Leu Ala Lys Leu Pro Phe Thr Thr
 1 5 10
 35 <210> 70
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 70

<210> 75
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 75
 Thr Thr Lys Trp Arg His Arg Ala Pro Val Ser Pro
 1 5 10
 <210> 76
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 15 <400> 76
 Trp Leu Gly Lys Asn Arg Ile Lys Pro Arg Ala Ser
 1 5 10
 <210> 77
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 77
 Ser Asn Phe Lys Thr Pro Leu Pro Leu Thr Gln Ser
 1 5 10
 25 <210> 78
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 78
 Lys Glu Leu Gln Thr Arg Asn Val Val Gln Arg Glu
 1 5 10
 <210> 79
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión al pelo
 <400> 79
 Gly Met Pro Ala Met His Trp Ile His Pro Phe Ala
 40 1 5 10

<210> 80
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 80
 Thr Pro Thr Ala Asn Gln Phe Thr Gln Ser Val Pro
 1 5 10
 10 <210> 81
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 15 <400> 81
 Ala Ala Gly Leu Ser Gln Lys His Glu Arg Asn Arg
 1 5 10
 <210> 82
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 82
 Glu Thr Val His Gln Thr Pro Leu Ser Asp Arg Pro
 1 5 10
 25 <210> 83
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 83
 Leu Pro Ala Leu His Ile Gln Arg His Pro Arg Met
 1 5 10
 <210> 84
 <211> 12
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 84
 Gln Pro Ser His Ser Gln Ser His Asn Leu Arg Ser
 40 1 5 10

<210> 85
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 85
 Arg Gly Ser Gln Lys Ser Lys Pro Pro Arg Pro Pro
 1 5 10
 <210> 86
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 15 <400> 86
 Thr His Thr Gln Lys Thr Pro Leu Leu Tyr Tyr His
 1 5 10
 <210> 87
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 87
 Thr Lys Gly Ser Ser Gln Ala Ile Leu Lys Ser Thr
 1 5 10
 <210> 88
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 88
 Asp Leu His Thr Val Tyr His
 1 5
 <210> 89
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 89
 40 His Ile Lys Pro Pro Thr Arg
 1 5

<210> 90
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

<400> 90

His Pro Val Trp Pro Ala Ile
 1 5

10 <210> 91
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

15 <400> 91

Met Pro Leu Tyr Tyr Leu Gln
 1 5

<210> 92
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

<400> 92

His Leu Thr Val Pro Trp Arg Gly Gly Gly Ser Ala Val Pro Phe Tyr
 1 5 10 15

Ser His Ser Gln Ile Thr Leu Pro Asn His
 20 25

25 <210> 93
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

30 <400> 93

Gly Pro His Asp Thr Ser Ser Gly Gly Val Arg Pro Asn Leu His His
 1 5 10 15

Thr Ser Lys Lys Glu Lys Arg Glu Asn Arg Lys Val Pro Phe Tyr Ser
 20 25 30

His Ser Val Thr Ser Arg Gly Asn Val
 35 40

<210> 94
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

<400> 94

Lys His Pro Thr Tyr Arg Gln
 1 5

10 <210> 95
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

15 <400> 95

His Pro Met Ser Ala Pro Arg
 1 5

<210> 96
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

<400> 96

Met Pro Lys Tyr Tyr Leu Gln
 1 5

25 <210> 97
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

30 <400> 97

Met His Ala His Ser Ile Ala
 1 5

<210> 98
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

<400> 98

Thr Ala Ala Thr Thr Ser Pro
 1 5

40

<210> 99
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 99
 Leu Gly Ile Pro Gln Asn Leu
 1 5
 10 <210> 100
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 15 <400> 100
 Ala Lys Pro Ile Ser Gln His Leu Gln Arg Gly Ser
 1 5 10
 <210> 101
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 101
 Ala Pro Pro Thr Pro Ala Ala Ala Ser Ala Thr Thr
 1 5 10
 25 <210> 102
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 102
 Asp Pro Thr Glu Gly Ala Arg Arg Thr Ile Met Thr
 1 5 10
 35 <210> 103
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 103
 40 Glu Gln Ile Ser Gly Ser Leu Val Ala Ala Pro Trp
 1 5 10

ES 2 439 702 T3

<210> 104
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 104
 Leu Asp Thr Ser Phe Pro Pro Val Pro Phe His Ala
 1 5 10
 10 <210> 105
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 15 <400> 105
 Leu Pro Arg Ile Ala Asn Thr Trp Ser Pro Ser
 1 5 10
 <210> 106
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 106
 Arg Thr Asn Ala Ala Asp His Pro Ala Ala Val Thr
 1 5 10
 25 <210> 107
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 107
 Ser Leu Asn Trp Val Thr Ile Pro Gly Pro Lys Ile
 1 5 10
 35 <210> 108
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 108

ES 2 439 702 T3

Thr Asp Met Gln Ala Pro Thr Lys Ser Tyr Ser Asn
 1 5 10

<210> 109
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

<400> 109

Thr Ile Met Thr Lys Ser Pro Ser Leu Ser Cys Gly
 1 5 10

10 <210> 110
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

<400> 110

Thr Pro Ala Leu Asp Gly Leu Arg Gln Pro Leu Arg
 1 5 10

20 <210> 111
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

<400> 111

Thr Tyr Pro Ala Ser Arg Leu Pro Leu Leu Ala Pro
 1 5 10

25 <210> 112
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

<400> 112

Thr Tyr Pro Ala Ser Arg Leu Pro Leu Leu Ala Pro
 1 5 10

35 <210> 113
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

40 <400> 113

ES 2 439 702 T3

Thr Asp Pro Thr Pro Phe Ser Ile Ser Pro Glu Arg
 1 5 10

<210> 114
 <211> 20
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

<400> 114

Cys Ala Ala Gly Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys Gly Ala Cys Cys Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Thr Ala
 10 20

<210> 115
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

<400> 115

Trp His Asp Lys Pro Gln Asn Ser Ser Lys Ser Thr
 1 5 10

20 <210> 116
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

25 <400> 116

Asn Glu Val Pro Ala Arg Asn Ala Pro Trp Leu Val
 1 5 10

30 <210> 117
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

<400> 117

Asn Ser Pro Gly Tyr Gln Ala Asp Ser Val Ala Ile Gly
 1 5 10

35 <210> 118
 <211> 12
 <212> PRT

ES 2 439 702 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 118
 Thr Gln Asp Ser Ala Gln Lys Ser Pro Ser Pro Leu
 5 1 5 10
 <210> 119
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 119
 Thr Pro Pro Glu Leu Leu His Gly Asp Pro Arg Ser
 1 5 10
 15 <210> 120
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 20 <400> 120
 Thr Pro Pro Thr Asn Val Leu Met Leu Ala Thr Lys
 1 5 10
 <210> 121
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 121
 Asn Thr Pro Lys Glu Asn Trp
 1 5
 30 <210> 122
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 122
 Asn Thr Pro Ala Ser Asn Arg
 1 5
 <210> 123
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 5 <400> 123
 Pro Arg Gly Met Leu Ser Thr
 1 5 .
 <210> 124
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 124
 Pro Pro Thr Tyr Leu Ser Thr
 1 5
 15 <210> 125
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 125
 Thr Ile Pro Thr His Arg Gln His Asp Tyr Arg Ser
 1 5 10
 <210> 126
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 126
 Thr Pro Pro Thr His Arg Leu
 30 1 5
 <210> 127
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 127
 Leu Pro Thr Met Ser Thr Pro
 1 5
 <210> 128

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 128
 Leu Gly Thr Asn Ser Thr Pro
 1 5
 <210> 129
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 129
 Thr Pro Leu Thr Gly Ser Thr Asn Leu Leu Ser Ser
 15 1 5 10
 <210> 130
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 130
 Thr Pro Leu Thr Lys Glu Thr
 1 5
 <210> 131
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 30 <400> 131
 Gln Gln Ser His Asn Pro Pro
 1 5
 <210> 132
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 132
 Thr Gln Pro His Asn Pro Pro
 1 5

ES 2 439 702 T3

<210> 133
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 133
 Ser Thr Asn Leu Leu Arg Thr Ser Thr Val His Pro
 1 5 10
 10 <210> 134
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 15 <400> 134
 His Thr Gln Pro Ser Tyr Ser Ser Thr Asn Leu Phe
 1 5 10
 <210> 135
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 135
 Ser Leu Leu Ser Ser His Ala
 1 5
 25 <210> 136
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 136
 Gln Gln Ser Ser Ile Ser Leu Ser Ser His Ala Val
 1 5 10
 <210> 137
 <211> 7
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 137
 Asn Ala Ser Pro Ser Ser Leu
 40 1 5

<210> 138
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 138
 His Ser Pro Ser Ser Leu Arg
 1 5
 <210> 139
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (2)..(2)
 <223> X= H, R o N
 <400> 139
 Lys Xaa Ser His His Thr His
 20 1 5
 <210> 140
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (2)..(2)
 30 <223> X=H o R o N
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (2)..(2)
 <223> X= H, R, o N
 35 <400> 140
 Glu Xaa Ser His His Thr His
 1 5
 <210> 141
 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo
 <400> 141

ES 2 439 702 T3

Leu Glu Ser Thr Ser Leu Leu
 1 5

<210> 142
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

<400> 142

Thr Pro Leu Thr Lys Glu Thr
 1 5

10 <210> 143
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> Dominio del péptido de unión al pelo

<400> 143

Lys Gln Ser His Asn Pro Pro
 1 5

20 <210> 144
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión al pelo

<400> 144

Ser Thr Leu His Lys Tyr Lys Ser Gln Asp Pro Thr Pro His His
 25 1 5 10 15

<210> 145
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido de unión al pelo

<400> 145

His Asp His Lys Asn Gln Lys Glu Thr His Gln Arg His Ala Ala
 1 5 10 15

35 <210> 146
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión al pelo

40 <400> 146

ES 2 439 702 T3

His Asn His Met Gln Glu Arg Tyr Thr Asp Pro Gln His Ser Pro Ser
 1 5 10 15

Val Asn Gly Leu
 20

- <210> 147
- <211> 20
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido de unión al pelo
- <400> 147

Thr Ala Glu Ile Asp Ser Ser Lys Asn Pro Asn Pro His Pro Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Trp Thr Asn
 20

- 10 <210> 148
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> Dominio del péptido de unión a la piel
- <400> 148

Phe Thr Gln Ser Leu Pro Arg
 1 5

- 20 <210> 149
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Dominio del péptido de unión a la piel
- <400> 149

Thr Pro Phe His Ser Pro Glu Asn Ala Pro Gly Ser
 25 1 5 10

- <210> 150
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Dominio del péptido de unión a la piel
- <400> 150

Lys Gln Ala Thr Phe Pro Pro Asn Pro Thr Ala Tyr
 1 5 10

<210> 151
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión a la piel
 <400> 151
 His Gly His Met Val Ser Thr Ser Gln Leu Ser Ile
 1 5 10
 10 <210> 152
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión a la piel
 15 <400> 152
 Leu Ser Pro Ser Arg Met Lys
 1 5
 <210> 153
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión a la piel
 <400> 153
 Leu Pro Ile Pro Arg Met Lys
 1 5
 25 <210> 154
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Dominio del péptido de unión a la piel
 <400> 154
 His Gln Arg Pro Tyr Leu Thr
 1 5
 <210> 155
 <211> 7
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión a la piel
 <400> 155
 Phe Pro Pro Leu Leu Arg Leu
 40 1 5

ES 2 439 702 T3

<210> 156
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Dominio del péptido de unión a las uñas
 <400> 156

Ala Leu Pro Arg Ile Ala Asn Thr Trp Ser Pro Ser
 1 5 10

10 <210> 157
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio del péptido de unión a las uñas

15 <400> 157

Tyr Pro Ser Phe Ser Pro Thr Tyr Arg Pro Ala Phe
 1 5 10

<210> 158
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano

<400> 158

Pro Lys Gly Leu Lys Lys Leu Leu Lys Gly Leu Lys Lys Leu Leu Lys
 1 5 10 15

Leu

25 <210> 159
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano

<400> 159

Lys Gly Leu Lys Lys Leu Leu Lys Gly Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu
 1 5 10 15

<210> 160
 <211> 16
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano

ES 2 439 702 T3

<400> 160

Lys Gly Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu
 1 5 10 15

5 <210> 161
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano

<400> 161

10 Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu
 1 5 10

<210> 162
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano

<400> 162

Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu
 1 5 10

20 <210> 163
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano

25 <400> 163

Val Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala
 1 5 10 15

Leu

30 <210> 164
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano

<400> 164

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Ala Leu Lys Lys Leu Leu
 1 5 10

35 <210> 165
 <211> 16
 <212> PRT

ES 2 439 702 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano
 <400> 165
 Lys Gly Leu Lys Lys Gly Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu
 5 1 5 10 15
 <210> 166
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <2.20>
 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano
 <400> 166
 Lys Gly Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu Gly Lys Lys Leu Leu Lys Leu
 1 5 10 15
 <210> 167
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano
 20 <400> 167
 Lys Gly Leu Lys Lys Leu Gly Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu
 1 5 10 15
 <210> 168
 <211> 16
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano
 <400> 168
 Lys Gly Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Gly Leu Lys Leu
 1 5 10 15
 30 <210> 169
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano
 <400> 169
 Lys Gly Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Gly Lys Leu
 1 5 10 15
 <210> 170
 <211> 19

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano
 5 <400> 170
 Phe Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Leu Lys Lys Ala Leu Lys
 1 5 10 15
 Lys Ala Leu
 <210> 171
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano
 <400> 171
 Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala
 1 5 10 15
 Leu
 15 <210> 172
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano
 <400> 172
 Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Leu
 1 5 10
 <210> 173
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano
 <400> 173
 Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Lys Leu
 30 1 5 10 15
 <210> 174
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano

<400> 174
Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Leu
1 5 10

5 <210> 175
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del péptido antimicrobiano

<400> 175
Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Val Leu
10 1 5 10

<210> 176
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Secuencia del péptido antimicrobiano

<400> 176
Lys Tyr Lys Lys Ala Leu Lys Lys Leu Ala Lys Leu Leu
1 5 10

20 <210> 177
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del péptido antimicrobiano

25 <400> 177
Phe Ala Leu Leu Lys Ala Leu Leu Lys Lys Ala Leu
1 5 10

30 <210> 178
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del péptido antimicrobiano

<400> 178
Lys Arg Leu Phe Lys Lys Leu Lys Phe Ser Leu Arg Lys Tyr
1 5 10

35 <210> 179
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 439 702 T3

<223> Secuencia del péptido antimicrobiano
 <400> 179
 Lys Arg Leu Phe Lys Lys Leu Leu Phe Ser Leu Arg Lys Tyr
 1 5 10
 5 <210> 180
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia del péptido antimicrobiano
 10 <400> 180
 Leu Leu Leu Phe Leu Leu Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Tyr
 1 5 10
 <210> 181
 <211> 36
 <212> PRT
 15 <213> Hyalophora cecropia
 <400> 181
 Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Glu Lys Val Gly Gln Asn Ile Arg
 1 5 10 15
 Asp Gly Ile Ile Lys Ala Gly Pro Ala Val Ala Trp Gly Gln Ala Thr
 20 25 30
 Gln Ile Ala Lys
 35
 20 <210> 182
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Xenopus sp.
 <400> 182
 Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe
 1 5 10 15
 Val Gly Glu Ile Met Asn Ser
 20
 25 <210> 183
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Xenopus sp.
 <400> 183

ES 2 439 702 T3

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

Val Lys Ile Leu Lys Lys
 20

<210> 184
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Bos taunus
 <400> 184

Arg Leu Cys Arg Ile Val Val Ile Arg Val Cys Arg
 1 5 10

<210> 185
 <211> 13
 10 <212> PRT
 <213> Bos sp.
 <400> 185

Ile Leu Pro Trp Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg
 1 5 10

<210> 186
 <211> 24
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 186

Asp Ser His Ala Lys Arg His His Gly Tyr Lys Arg Lys Phe His Glu
 1 5 10 15

Lys His His Ser His Arg Gly Tyr
 20

20 <210> 187
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> Secuencia del péptido de unión al pigmento
 <400> 187

Met Pro Pro Pro Leu Met Gln
 1 5

<210> 188
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencias del péptido de unión al pigmento

<400> 188
Phe His Glu Asn Trp Pro Ser
1 5

<210> 189
<211> 12
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del péptido de unión al pigmento

<400> 189
Arg Thr Ala Pro Thr Thr Pro Leu Leu Leu Ser Leu
10 1 5 10

<210> 190
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Secuencia del péptido de unión al pigmento

<400> 190
Trp His Leu Ser Trp Ser Pro Val Pro Leu Pro Thr
1 5 10

20 <210> 191
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del péptido de unión al pigmento

25 <400> 191
Pro His Ala Arg Leu Val Gly
1 5

<210> 192
<211> 7
30 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del péptido de unión al pigmento

<400> 192
Asn Ile Pro Tyr His His Pro
1 5

35 <210> 193
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Secuencias del péptido de unión al pigmento

<400> 193
 Thr Thr Met Pro Ala Ile Pro
 1 5

<210> 194
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del péptido de unión al pigmento

<400> 194
 His Asn Leu Pro Pro Arg Ser
 10 1 5

<210> 195
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencias del péptido de unión al pigmento

<400> 195
 Ala His Lys Thr Gln Met Gly Val Arg Gln Pro Ala
 1 5 10

20 <210> 196
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del péptido de unión al pigmento

25 <400> 196
 Ala Asp Asn Val Gln Met Gly Val Ser His Thr Pro
 1 5 10

30 <210> 197
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencias del péptido de unión al pigmento

<400> 197
 Ala His Asn Ala Gln Met Gly Val Ser His Pro Pro
 1 5 10

35 <210> 198
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del péptido de unión al pigmento
 <400> 198
 Ala Asp Tyr Val Gly Met Gly Val Ser His Arg Pro
 1 5 10

5 <210> 199
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del péptido de unión al pigmento

10 <400> 199
 Ser Val Ser Val Gly Met Lys Pro Ser Pro Arg Pro
 1 5 10

<210> 200
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del péptido de unión al pigmento

<400> 200
 Tyr Pro Asn Thr Ala Leu Val
 1 5

20 <210> 201
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> Secuencias del péptido de unión al pigmento

<400> 201
 Val Ala Thr Arg Ile Val Ser
 1 5

<210> 202
 <211> 12
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencias del péptido de unión al pigmento

<400> 202
 His Ser Leu Lys Asn Ser Met Leu Thr Val Met Ala
 35 1 5 10

<210> 203
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencias del péptido de unión al pigmento
 <400> 203
 Asn Tyr Pro Thr Gln Ala Pro
 1 5
 5 <210> 204
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Secuencias del péptido de unión al pigmento
 <400> 204
 Lys Cys Cys Tyr Ser Val Gly
 1 5
 <210> 205
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias del péptido de unión al pigmento
 <400> 205
 Arg His Asp Leu Asn Thr Trp Leu Pro Pro Val Lys
 20 1 5 10
 <210> 206
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia del péptido de unión al pigmento
 <400> 206
 Glu Ile Ser Leu Pro Ala Lys Leu Pro Ser Ala Ser
 1 5 10
 <210> 207
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia del péptido de unión al pigmento
 35 <400> 207
 Ser Asp Tyr Val Gly Met Arg Pro Ser Pro Arg His
 1 5 10
 <210> 208
 <211> 12
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

ES 2 439 702 T3

<220>
 <223> Secuencias del péptido de unión al pigmento
 <400> 208
 Ser Asp Tyr Val Gly Met Arg Leu Ser Pro Ser Gln
 1 5 10

5 <210> 209
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencias del péptido de unión al pigmento
 <400> 209
 Ser Val Ser Val Gly Ile Gln Pro Ser Pro Arg Pro
 1 5 10

15 <210> 210
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del péptido de unión al pigmento
 <400> 210
 Tyr Val Ser Val Gly Ile Lys Pro Ser Pro Arg Pro
 1 5 10

20 <210> 211
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencias del péptido de unión al pigmento
 <400> 211
 Tyr Val Cys Glu Gly Ile His Pro Cys Pro Arg Pro
 1 5 10

30 <210> 212
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión a celulosa

35 <400> 212
 Val Pro Arg Val Thr Ser Ile
 1 5

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

ES 2 439 702 T3

<220>
 <223> Péptido de unión a celulosa
 <400> 213
 Met Ala Asn His Asn Leu Ser
 1 5
 5 <210> 214
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Péptido de unión a celulosa
 <400> 214
 Phe His Glu Asn Trp Pro Ser
 1 5
 <210> 215
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a celulosa
 <400> 215
 Thr His Lys Thr Ser Thr Gln Arg Leu Leu Ala Ala
 20 1 5 10
 <210> 216
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Péptido de unión a celulosa
 <400> 216
 Lys Cys Cys Tyr Val Asn Val Gly Ser Val Phe Ser
 1 5 10
 30 <210> 217
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a celulosa
 35 <400> 217
 Ala His Met Gln Phe Arg Thr Ser Leu Thr Pro His
 1 5 10
 <210> 218
 <211> 12
 <212> PRT

ES 2 439 702 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a poli(etilen tereftalato)
 <400> 218
 Gly Thr Ser Asp His Met Ile Met Pro Phe Phe Asn
 5 1 5 10
 <210> 219
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Péptido de unión a polimetilmetacrilato
 <400> 219
 Thr Ala Val Met Asn Val Val Asn Asn Gln Leu Ser
 1 5 10
 15 <210> 220
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a polimetilmetacrilato
 20 <400> 220
 Val Pro Trp Trp Ala Pro Ser Lys Leu Ser Met Gln
 1 5 10
 <210> 221
 <211> 12
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a polimetilmetacrilato
 <400> 221
 Met Val Met Ala Pro His Thr Pro Arg Ala Arg Ser
 1 5 10
 30 <210> 222
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Péptido de unión a polimetilmetacrilato
 <400> 222
 Thr Tyr Pro Asn Trp Ala His Leu Leu Ser His Tyr
 1 5 10
 <210> 223

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

 <220>
 5 <223> Péptido de unión a polimetilmetacrilato
 <400> 223

 Thr Pro Trp Trp Arg Ile Thr
 1 5

 <210> 224
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido de unión a polimetilmetacrilato
 <400> 224

 Asp Leu Thr Leu Pro Phe His
 15 1 5

 <210> 225
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Péptido de unión a polimetilmetacrilato
 <400> 225

 Gly Thr Ser Ile Pro Ala Met
 1 5

 <210> 226
 25 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido de unión a polimetilmetacrilato
 30 <400> 226

 His His Lys His Val Val Ala
 1 5

 <210> 227
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido de unión a polimetilmetacrilato
 <400> 227

 His His His Lys His Phe Met
 1 5

<210> 228
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido de unión a polimetilmetacrilato
 <400> 228
 His His His Arg His Gln Gly
 1 5
 10 <210> 229
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a polimetilmetacrilato
 15 <400> 229
 His His Trp His Ala Pro Arg
 1 5
 <210> 230
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión al nilón
 <400> 230
 Lys Thr Pro Pro Thr Arg Pro
 1 5
 25 <210> 231
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Péptido de unión al nilón
 <400> 231
 Val Ile Asn Pro Asn Leu Asp
 1 5
 <210> 232
 <211> 7
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión al nilón
 <400> 232

Lys Val Trp Ile Val Ser Thr
 1 5

<210> 233
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión al nilón

<400> 233

Ala Glu Pro Val Ala Met Leu
 1 5

10 <210> 234
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> Péptido de unión al nilón

<400> 234

Ala Glu Leu Val Ala Met Leu
 1 5

20 <210> 235
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión al nilón

<400> 235

His Ser Leu Arg Leu Asp Trp
 25 1 5

<210> 236
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido de unión a poli(tetrafluoroetileno)

<400> 236

Glu Ser Ser Tyr Ser Trp Ser Pro Ala Arg Leu Ser
 1 5 10

35 <210> 237
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión a poli(tetrafluoroetileno)

40 <400> 237

ES 2 439 702 T3

Gly Pro Leu Lys Leu Leu His Ala Trp Trp Gln Pro
 1 5 10

<210> 238
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión a poli(tetrafluoroetileno)

<400> 238

Asn Ala Leu Thr Arg Pro Val
 1 5

10 <210> 239
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> Péptido de unión poli(tetrafluoroetileno)

<400> 239

Ser Ala Pro Ser Ser Lys Asn
 1 5

20 <210> 240
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión poli(tetrafluoroetileno)

<400> 240

Ser Val Ser Val Gly Met Lys Pro Ser Pro Arg Pro
 1 5 10

25 <210> 241
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido de unión a poli(tetrafluoroetileno)

<400> 241

Ser Tyr Tyr Ser Leu Pro Pro Ile Phe His Ile Pro
 1 5 10

35 <210> 242
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión a poli(tetrafluoroetileno)

40 <400> 242

ES 2 439 702 T3

Thr Phe Thr Pro Tyr Ser Ile Thr His Ala Leu Leu
 1 5 10

<210> 243
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión a poli(tetrafluoroetileno)

<400> 243

Thr Met Gly Phe Thr Ala Pro Arg Phe Pro His Tyr
 1 5 10

10 <210> 244
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> Péptido de unión a poli(tetrafluoroetileno)

<400> 244

Thr Asn Pro Phe Pro Pro Pro Pro Ser Ser Pro Ala
 1 5 10

20 <210> 245
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión a arcilla

<400> 245

Gly His Gly Ser Pro Ser Asn Ser His His Gly Ser Lys Lys Cys Asp
 1 5 10 15

25 Met Gly Asn Ser Arg Ala Lys Cys Lys Arg Leu
 20 25

<210> 246
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido de unión a arcilla

<400> 246

Ser Asp Arg His Asn Leu Arg Asn Ser Trp Ser Ile Ser Arg His Cys
 1 5 10 15

Arg Arg Lys Gln Gly Arg Cys Leu Pro Ala His
 20 25

ES 2 439 702 T3

<210> 247
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido de unión a arcilla
 <400> 247
 Lys Lys Ser Asn Lys Gly His His Pro Ser Ser Lys Gly Lys Gly Pro
 1 5 10 15
 Pro Trp Ser Glu Trp Asp Lys Lys Asn Gly Pro
 20 25
 10 <210> 248
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a arcilla
 15 <400> 248
 Lys Lys Ser Asn Lys Gly Pro His Pro Ser Ser Lys Gly Lys Gly Pro
 1 5 10 15
 Pro Trp Ser Glu Trp Asp Lys Lys Asn Gly Pro
 20 25
 20 <210> 249
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a arcilla
 <400> 249
 Val Gly Arg His His Ser Lys Ala Lys Gln Lys Arg Pro His Gly Gly
 1 5 10 15
 Lys Gly Gln Asn Lys Asn
 25 20
 <210> 250
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Péptido de unión a arcilla
 <400> 250

ES 2 439 702 T3

Val Gly Arg His His Pro Lys Ala Lys Gln Lys Arg Pro His Gly Gly
 1 5 10 15

Lys Gly Gln Asn Lys Asn
 20

<210> 251
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión a arcilla

<400> 251

Gly Arg Arg Pro Arg Ala Arg Gly Arg Ser Arg Arg Gly Ser Thr Lys
 1 5 10 15

Thr

10 <210> 252
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido de unión a arcilla

<400> 252

Leu Gly Val Ile Arg Asn His Val Val Arg Gly Arg Arg His His Gln
 1 5 10 15

His Val Arg

20 <210> 253
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión a arcilla

<400> 253

Gln Pro Gly Arg Pro Thr Glu Val His Pro Glu Leu Val Arg Lys Ser
 1 5 10 15

25 Ala Tyr Leu Val Asn Pro Ser Glu Asp Ile Arg
 20 25

<210> 254
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

ES 2 439 702 T3

<220>

<223> Péptido de unión a arcilla

<400> 254

His Arg Ser Glu Lys Pro Lys Asn Val Lys Tyr Lys Arg Gly Tyr Trp
 1 5 10 15

Glu Arg Gly Asn Gln Lys Lys His Gly Pro Gly
 20 25

5 <210> 255

<211> 27

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido de unión a arcilla

<400> 255

Gly Ser His Lys Arg Arg Gly Ser Tyr Ala Leu Leu Arg Thr Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gly Arg Gln Ala Glu Leu Glu His Leu Leu
 20 25

<210> 256

<211> 27

15 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de unión a arcilla

<400> 256

Val Gly Glu Lys Pro Arg Arg Lys Ser Lys Gly Ala Lys Ala Lys Lys
 1 5 10 15

Ala Arg Thr Lys Glu Glu Lys Leu Pro Lys Asn
 20 25

20

<210> 257

<211> 27

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> Péptido de unión a arcilla

<400> 257

Asn Lys Gly His Lys Gln Ser Gly Ser Pro Arg His Ser Asn Lys Lys
 1 5 10 15

Glu Lys Lys Thr Gln Gln Lys Arg Gly Gln Pro
 20 25

ES 2 439 702 T3

<210> 258
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido de unión a arcilla
 <400> 258
 His Trp Gly Ser Gln His Lys Thr Gly Leu Arg Asn His Lys Arg Ser
 1 5 10 15
 Arg Arg Asp Ser Leu Gly Lys Arg Gly Thr Asp
 20 25
 10 <210> 259
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a arcilla
 15 <400> 259
 Lys Gly Trp Gly Ser Ser Ser Gly Pro Pro Gly Leu Thr Gly Lys Ala
 1 5 10 15
 Leu Gly Lys Gly Arg Leu Lys Pro Lys Lys Lys
 20 25
 20 <210> 260
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a arcilla
 <400> 260
 Ser Ser Lys Ser Gly Ala Pro Phe Arg Val Pro Ile Cys Phe Thr Ala
 1 5 10 15
 Pro Arg Pro Gln Lys Thr Leu Gly
 20
 25 <210> 261
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 30 <223> secuencia de escisión de Caspasa-3.
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (5)..(5)

- <223> Xaa = cualquier aminoácido natural excepto Pro, Glu, Asp, Gln, Lys, y Arg.
- <400> 261
 Asp Met Gln Asp Xaa
 1 5
- 5 <210> 262
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
- <220>
 <223> Construcción sintética. Etiqueta del cuerpo de inclusión
- 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Arg, His, o Lys
- 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = Gln, His, o Lys
- 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa = Gln, His, o Lys
- 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa = Glu o Gln
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa = Gln o Lys
- 30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (11)..(11)
 <223> Localización del espaciador peptídico que conecta la glutamina en la posición 11 del residuo con la glutamina en la posición 12 del residuo.
- 35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa = Arg, His, o Lys
- 40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa = Gln, His, o Lys
- 45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa = Gln, His, o Lys
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA

<222> (20)..(20)
 <223> Xaa = Glu o Gln

 <220>
 5 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa = Gln o Lys

 <220>
 10 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (22)..(22)
 <223> Localización de los espaciadores peptídicos adicionales que separan las secuencias centrales adicionales

 <400> 262
 Gln Gln Xaa Phe Xaa Trp Xaa Phe Xaa Xaa Gln Gln Gln Xaa Phe Xaa
 1 5 10 15

 Trp Xaa Phe Xaa Xaa Gln
 20

 <210> 263
 <211> 6037
 15 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> plásmido

 <400> 263

ES 2 439 702 T3

aagaaaccaa ttgtccatat tgcacagac attgccgtca ctgcgtcttt tactggctct	60
tctcgetaac caaacgggta accccgctta ttaaaagcat tctgtaacaa agcgggacca	120
aagccatgac aaaaacgcgt acaaaaagtg tctataatca cggcagaaaa gtccacattg	180
attatattgca cggcgtcaca ctttgcgatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg	240
atcttacctg acgcttttta tcgcaactct ctactgtttc tccataaccg ttttttgggc	300
taacaggagg aattacatat ggctagctgc ggtcaacaac gttttcaatg gcaattcgaa	360
caacagccgc gttgcggcca gcaacgcttc caatggcagt ttgaacagca accgcgttgc	420
ggtcagcaac gtttccagtg gcaatttgaa caacagccag agtgccggcca gcagcgtttt	480
cagtggcagt tcgagcagca gccgtgcgga tccgaccctg gcattccgtg gtggaacatt	540
cgtgctcctc tgaatgcagg tgcgggcac ccttgggtgga atattcgtgc tccgctgaac	600
gccggtggtt ccggtccggg tagcggtggt aatacttctc agctgtccac gggtagcggg	660
aacactagcc agctgagcac gggcggccct aaaaagccgg gcgaccggg tattccgtgg	720
tggaatatcc gtgccccgct gaacgcaggt gccggcatcc cgtgggtgaa cattcgtgca	780
cctctgaatg ctggtggttc cggccaggc tctggcggca acacttcca gctgtccacc	840
ggcggtagca acaccagcca gctgtctact ggtggtccga agaaaccggg tgactaataa	900
ggcgcgccga cccagctttc ttgtacaaag tggttgattc gaggctgcta acaaagccc	960
aaaggaagct gagttggctg ctgccaccgc tgagcaataa ctagcataac cccttggggc	1020
ctctaaacgg gtcttgaggg gttttttgct gaaaggagga actatatccg gatatccaca	1080
ggacgggtgt ggtcgccatg atcgcgtagt cgatagtggc tccaagtagc gaagcgagca	1140
ggactgggag cggcctaaag cggtcggaca gtgctccgag aacgggtgag catagaaatt	1200
gcatcaacgc atatagcgtc agcagcacgc catagtgact ggcgatgctg tcggaatgga	1260
cgatatcccg caagaggccc ggcagtaccg gcataaccaa gcctatgcct acagcatcca	1320
gggtgacggg gccgaggatg acgatgagcg cattgttaga tttcatacac ggtgcctgac	1380
tgcgttagca atttaactgt gataaactac cgcattaaag cttgcagtgg cggttttcat	1440
ggcttggtat gactgttttt ttggggtaca gtctatgcct cgggcatcca agcagcaagc	1500
gcgttacgcc gtgggtcgat gtttgatggt atggagcagc aacgatgta cgcagcaggg	1560
cagtcgccct aaaacaaagt taaacatcat gagggaagcg gtgatcgccg aagtatcgac	1620

ES 2 439 702 T3

tcaactatca gaggtagttg gcgtcatcga gcgccatctc gaaccgacgt tgctggccgt 1680
acatttgtag ggctccgcag tggatggcgg cctgaagcca cacagtgata ttgatttgct 1740
ggttacggtg accgtaaggc ttgatgaaac aacgcggcga gctttgatca acgacctttt 1800
ggaaacttcg gcttcccctg gagagagcga gattctccgc gctgtagaag tcaccattgt 1860
tgtgcacgac gacatcattc cgtggcggtta tccagctaag cgcgaactgc aatttgagaga 1920
atggcagcgc aatgacattc ttgcaggtat cttcgagcca gccacgatcg acattgatct 1980
ggctatcttg ctgacaaaag caagagaaca tagcgttgcc ttggtaggtc cagcggcggga 2040
ggaactcttt gatccggttc ctgaacagga tctatttgag gcgctaaatg aaaccttaac 2100
gctatggaac tcgccgcccg actgggctgg cgatgagcga aatgtagtgc ttacgttgtc 2160
ccgcatttgg tacagcgcag taaccggcaa aatcgcgccg aaggatgtcg ctgccgactg 2220
ggcaatggag cgctgcccg cccagtatca gcccgtcata cttgaagcta gacaggctta 2280
tcttgacaaa gaagaagatc gcttggcctc gcgcgcagat cagttggaag aatttgctca 2340
ctacgtgaaa ggcgagatca ccaaggtagt cggcaaataa tgtctaaca ttcggtcaag 2400
cttggtggtt ttggcggatg agagaagatt ttcagcctga tacagattaa atcagaacgc 2460
agaagcggtc tgataaaaca gaatttgctt ggccggcagta gcgcgggtgt cccacctgac 2520
cccatgccga actcagaagt gaaacgccgt agcgcgcgat gtagtgtggg gtctccccat 2580
gcgagagtag ggaactgcca ggcatcaaat aaaacgaaag gctcagtcga aagactgggc 2640
ctttcgtttt atctgttgtt tgtcggtgaa cgctctcctg agtaggacaa atccgccggg 2700
agcggatttg aacgttgcca agcaacggcc cggagggtgg cgggcaggac gcccgccata 2760
aactgccagg catcaaatta agcagaaggc catcctgacg gatggccttt ttgcgtttct 2820
acaaactctt ttgtttattt ttctaataac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat 2880
aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc 2940
gtgtcgcctt tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa 3000
cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac 3060
tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga 3120
tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg cggattatc ccgtgttgac gccgggcaag 3180
agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca 3240
cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca 3300
tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa 3360
ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgctt tgatcgttgg gaaccggagc 3420

ES 2 439 702 T3

tgaatgaagc catacctaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa 3480
cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag 3540
actggatgga ggcgataaaa gttgcaggac cacttctgcg ctcgccctt cgggctggct 3600
ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac 3660
tggggccaga tggttaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa 3720
ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctcaactgatt aagcattggt 3780
aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat 3840
ttaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gacccaaatc ccttaacgtg 3900
agttttcggt ccaactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc 3960
ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg 4020
tttgtttgc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag 4080
cgagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact 4140
ctgtagcacc gcctacatac ctctctctgc taatcctggt accagtggct gctgccagtg 4200
gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc 4260
ggtcgggctg aacggggggg tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg 4320
aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgcac gcttcccga gggagaaaagg 4380
cggacaggta tccgtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag 4440
gggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc 4500
gatttttgtg atgctcgtca gggggggcga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct 4560
ttttacgggt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc 4620
ctgattctgt ggataaccgt attaccgct ttgagtgagc tgataaccgt cggcgcagcc 4680
gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcga agagcgcctg atgcggtatt 4740
ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcatata tgggtgactc tcagtacaat 4800
ctgctctgat gccgcatagt taagccagta tacactccgc tatcgtacg tgactgggtc 4860
atggctgcgc cccgacacc gccaacacc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc 4920
ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt 4980
tcaccgtcat caccgaaacg cgcgaggcag cagatcaatt cgcgcgcgaa ggcgaagcgg 5040
catgcataat gtgctgtca aatggacgaa gcagggattc tgcaaaccct atgctactcc 5100
gtcaagcgt caattgtctg attcgttacc aattatgaca acttgacggc tacatcattc 5160
actttttctt cacaaccggc acggaactcg ctccggctgg ccccgggtgca ttttttaaat 5220
accgcgaga aatagagttg atcgtcaaaa ccaacattgc gaccgacggt ggcgataggc 5280

ES 2 439 702 T3

atccgggtgg tgctcaaaag cagcttcgcc tggctgatac gttggtcctc gcgccagctt 5340
aagacgctaa tccctaactg ctggcggaaa agatgtgaca gacgcgacgg cgacaagcaa 5400
acatgctgtg cgacgctggc gatatcaaaa ttgctgtctg ccaggtgatac gctgatgtac 5460
tgacaagcct cgcgtacccg attatccatc ggtggatgga gcgactcgtt aatcgcttcc 5520
atgcgccgca gtaacaattg ctcaagcaga tttatcgcea gcagctccga atagcgcctt 5580
tccccttgcc cggcgtaaat gatttgccca aacaggctgc tgaatatgagg ctggtgcgct 5640
tcatccgggc gaaagaacc cgtattggca aatattgacg gccagttaag ccattcatgc 5700
cagtaggcgc gcggacgaaa gtaaacccac tggtgatacc attcgcgagc ctccggatga 5760
cgaccgtagt gatgaatctc tcctggcggg aacagcaaaa tatcaccggg tcggcaaacà 5820
aattctcgtc cctgattttt caccaccccc tgaccgcgaa tggtgagatt gagaatataa 5880
cctttcattc ccagcggctg gtcgataaaa aaatcgagat aaccgttggc ctcaatcggc 5940
gttaaaccgg ccaccagatg ggcattaaac gagtatcccg gcagcagggg atcattttgc 6000
gcttcagcca tacttttcat actcccgcca ttcagag 6037

<210> 264
<211> 189
<212> ADN
5 <213> secuencia artificial

<220>
<223> Etiqueta del cuerpo de inclusión IBT139(5C)
<400> 264

atggctagct gcggtaaca acgttttcaa tggcaattcg aacaacagcc gcggtgcggc 60
cagcaacgct tccaatggca gtttgaacag caaccgcggt gcggtcagca acgtttccag 120
tggcaatttg aacaacagcc agagtgcggc cagcagcgc ttcagtggca gttcagagcag 180
cagccgtgc 189

10 <210> 265
<211> 63
<212> PRT
<213> secuencia artificial

15 <220>
<223> Etiqueta del cuerpo de inclusión IBT139(5C)
<400> 265

Met Ala Ser Cys Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln
1 5 10 15

Pro Arg Cys Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro

ES 2 439 702 T3

20

25

30

Arg Cys Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Glu
 35 40 45

Cys Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Cys
 50 55 60

<210> 266

<211> 576

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción de fusión sintética IBT139(5C).HC776124

<400> 266

atggctagct gcggtcaaca acgttttcaa tggcaattcg aacaacagcc gcggtgcggc 60
 cagcaacgct tccaatggca gtttgaacag caaccgcggt gcggtcagca acgtttccag 120
 tggcaatttg aacaacagcc agagtgcggc cagcagcgct ttcagtggca gttcgagcag 180
 cagccgtgcg accctggcat tccgtggtgg aacattcgtg ctctctgaa tgcaggtgcg 240
 ggcateccctt ggtggaatat tcgtgctccg ctgaacgccg gtggttccgg tccgggtagc 300
 ggtggaataa cttctcagct gtccacgggt ggcggtaaca ctagccagct gagcacgggc 360
 ggccctaaaa agccggggcga cccgggtatt ccgtggtgga atatccgtgc cccgctgaac 420
 gcaggtgccg gcatcccgtg gtggaacatt cgtgcacctc tgaatgctgg tggttccggt 480
 ccaggtctg gcggcaaacac ttcccagctg tccaccggcg gtggcaaacac cagccagctg 540
 tctactggtg gtccgaagaa accgggtgac taataa 576

10 <210> 267

<211> 190

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción de fusión sintética IBT139(5C).HC776124

<400> 267

ES 2 439 702 T3

Met Ala Ser Cys Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln
1 5 10 15

Pro Arg Cys Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro
20 25 30

Arg Cys Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Glu
35 40 45

Cys Gly Gln Gln Arg Phe Gln Trp Gln Phe Glu Gln Gln Pro Cys Asp
50 55 60

Pro Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala Gly Ala
65 70 75 80

Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala Gly Gly Ser
85 90 95

Gly Pro Gly Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Gly
100 105 110

Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Pro Lys Lys Pro Gly Asp Pro
115 120 125

Gly Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala Gly Ala Gly
130 135 140

Ile Pro Trp Trp Asn Ile Arg Ala Pro Leu Asn Ala Gly Gly Ser Gly
145 150 155 160

Pro Gly Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Gly Asn
165 170 175

Thr Ser Gln Leu Ser Thr Gly Gly Pro Lys Lys Pro Gly Asp
180 185 190

<210> 268

<211> 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de unión a dientes

<400> 268

5

ES 2 439 702 T3

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

Asp Pro His Ala
 20

<210> 269
 <211> 20
 <212> PRT
 5 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 269

Ala Ser Val Ser Asn Tyr Pro Pro Ile His His Leu Ala Thr Ser Asn
 1 5 10 15

Thr Thr Val Asn
 20

10 <210> 270
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 270

Asp Glu Cys Met Glu Pro Leu Asn Ala Ala His Cys Trp Arg
 1 5 10

<210> 271
 <211> 14
 20 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 271

Asp Glu Cys Met His Gly Ser Asp Val Glu Phe Cys Thr Ser
 25 1 5 10

<210> 272
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 272

Asp Leu Cys Ser Met Gln Met Met Asn Thr Gly Cys His Tyr
 1 5 10

ES 2 439 702 T3

<210> 273
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 273
 Asp Leu Cys Ser Ser Pro Ser Thr Trp Gly Ser Cys Ile Arg
 1 5 10
 10 <210> 274
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a dientes
 15 <400> 274
 Asp Pro Asn Glu Ser Asn Tyr Glu Asn Ala Thr Thr Val Ser Gln Pro
 1 5 10 15
 Thr Arg His Leu
 20
 20 <210> 275
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 275
 Glu Pro Thr His Pro Thr Met Arg Ala Gln Met His Gln Ser Leu Arg
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Pro
 20
 25 <210> 276
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 276

ES 2 439 702 T3

Gly Asn Thr Asp Thr Thr Pro Pro Asn Ala Val Met Glu Pro Thr Val
 1 . 5 10 15

Gln His Lys Trp
 20

<210> 277
 <211> 15
 <212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 277

Asn Gly Pro Asp Met Val Gln Ser Val Gly Lys His Lys Asn Ser
 1 5 10 15

10 <210> 278
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 278

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

20 <210> 279
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 279

Asn Asn Thr Ser Ala Asp Asn Pro Pro Glu Thr Asp Ser Lys His His
 1 5 10 15

25 Leu Ser Met Ser
 20

<210> 280
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 280

Asn Asn Thr Trp Pro Glu Gly Ala Gly His Thr Met Pro Ser Thr Asn
 1 . 5 10 15

ES 2 439 702 T3

Ile Arg Gln Ala
20

- <210> 281
- <211> 20
- <212> PRT
- 5 <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido de unión a dientes
- <400> 281

Asn Pro Thr Ala Thr Pro His Met Lys Asp Pro Met His Ser Asn Ala
1 5 10 15

His Ser Ser Ala
20

- 10 <210> 282
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> Péptido de unión a dientes
- <400> 282

Asn Pro Thr Asp His Ile Pro Ala Asn Ser Thr Asn Ser Arg Val Ser
1 5 10 15

Lys Gly Asn Thr
20

- 20 <210> 283
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido de unión a dientes
- <400> 283

Asn Pro Thr Asp Ser Thr His Met Met His Ala Arg Asn His Glu
25 1 5 10 15

- <210> 284
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Péptido de unión a dientes
- <400> 284

Gln His Cys Ile Thr Glu Arg Leu His Pro Pro Cys Thr Lys
1 5 10

ES 2 439 702 T3

<210> 285
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 285
 Thr Pro Cys Ala Pro Ala Ser Phe Asn Pro His Cys Ser Arg
 1 5 10
 <210> 286
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a dientes
 15 <400> 286
 Thr Pro Cys Ala Thr Tyr Pro His Phe Ser Gly Cys Arg Ala
 1 5 10
 <210> 287
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 287
 Trp Cys Thr Asp Phe Cys Thr Arg Ser Thr Pro Thr Ser Thr Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Thr Ser
 20
 25 <210> 288
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 288
 Ala Pro Pro Leu Lys Thr Tyr Met Gln Glu Arg Glu Leu Thr Met Ser
 1 5 10 15
 Gln Asn Lys Asp
 20
 <210> 289
 <211> 20
 <212> PRT
 35

ES 2 439 702 T3

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de unión a dientes

<400> 289

Glu Pro Pro Thr Arg Thr Arg Val Asn Asn His Thr Val Thr Val Gln
 1 . 5 10 15

Ala Gln Gln His
 5 20

<210> 290

<211> 14

<212> PRT

<213> secuencia artificial

10 <220>

<223> Péptido de unión a dientes

<400> 290

Gly Tyr Cys Leu Arg Gly Asp Glu Pro Ala Val Cys Ser Gly
 1 5 10

15 <210> 291

<211> 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de unión a dientes

20 <400> 291

Leu Ser Ser Lys Asp Phe Gly Val Thr Asn Thr Asp Gln Arg Thr Tyr
 1 5 10 15

Asp Tyr Thr Thr
 20

<210> 292

<211> 14

<212> PRT

25 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de unión a dientes

<400> 292

Asn Phe Cys Glu Thr Gln Leu Asp Leu Ser Val Cys Thr Val
 1 5 10

30 <210> 293

<211> 14

<212> PRT

<213> secuencia artificial

ES 2 439 702 T3

<220>
 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 293
 Asn Thr Cys Gln Pro Thr Lys Asn Ala Thr Pro Cys Ser Ala
 1 5 10
 5 <210> 294
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 294
 Pro Ser Glu Pro Glu Arg Arg Asp Arg Asn Ile Ala Ala Asn Ala Gly
 1 5 10 15
 Arg Phe Asn Thr
 20
 <210> 295
 <211> 18
 15 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 295
 Thr His Asn Met Ser His Phe Pro Pro Ser Gly His Pro Lys Arg Thr
 1 5 10 15
 20 Ala Thr
 <210> 296
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Péptido de unión a dientes
 <400> 296
 Thr Thr Cys Pro Thr Met Gly Thr Tyr His Val Cys Trp Leu
 1 5 10
 30 <210> 297
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a dientes
 35 <400> 297

ES 2 439 702 T3

Tyr Cys Ala Asp His Thr Pro Asp Pro Ala Asn Pro Asn Lys Ile Cys
 1 5 10 15

Gly Tyr Ser His
 20

- <210> 298
- <211> 20
- <212> PRT
- 5 <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido de unión a dientes
- <400> 298

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

Met Pro Pro Lys
 20

- 10 <210> 299
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> Péptido de unión a dientes
- <400> 299

Asp Leu His Pro Met Asp Pro Ser Asn Lys Arg Pro Asp Asn Pro Ser
 1 5 10 15

Asp Leu His Thr
 20

- 20 <210> 300
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido de unión a dientes
- <400> 300

Glu Ser Cys Val Ser Asn Ala Leu Met Asn Gln Cys Ile Tyr
 1 5 10

- 25 <210> 301
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Péptido de unión a dientes
- <400> 301

ES 2 439 702 T3

Thr Ile Glu Ser Ser Gln His Ser Arg Thr His Gln Gln Asn Tyr Gly
1 5 10 15

Ser Thr Lys Thr
20

<210> 306

<211> 20

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de unión a dientes

<400> 306

Val Gly Thr Met Lys Gln His Pro Thr Thr Thr Gln Pro Pro Arg Val
1 5 10 15

Ser Ala Thr Asn
20

10 <210> 307

<211> 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido de unión a dientes

<400> 307

Tyr Ser Glu Thr Pro Asn Asp Gln Lys Pro Asn Pro His Tyr Lys Val
1 5 10 15

Ser Gly Thr Lys
20

REVINDICACIONES

1. Una etiqueta de cuerpo de inclusión que comprende la estructura general:
 Gln-Gln-Xaa1-Phe-Xaa2-Trp-Xaa3-Phe-Xaa4-Xaa5-Gln-Espaciador-[[Gln-Gln-Xaa1-Phe-Xaa2-Trp-Xaa3-Phe-Xaa4-Xaa5-Gln]-[Espaciador]_m]_n
- 5 en la que
 Xaa1= Arg, His o Lys;
 Xaa2= Gln, His o Lys;
 Xaa3= Gln, His o Lys;
 Xaa4= Glu o Gln;
 10 Xaa5= Gln o Lys;
 n=1 a 10;
 m= n-1; y
- Espaciador= es un péptido que comprende los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en prolina, arginina, glicina, ácido glutámico y cisteína.
- 15 2. La etiqueta de cuerpo de inclusión de la reivindicación 1 que comprende además al menos un resto de cisteína entrecruzable que comprende SEQ ID NO: 33.
3. La etiqueta de cuerpo de inclusión de la reivindicación 1 que comprende además al menos un resto de cisteína entrecruzable localizado en el extremo amino o el extremo carboxi de dicha etiqueta de cuerpo de inclusión.
- 20 4. La etiqueta de cuerpo de inclusión de la reivindicación 1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 265.
5. Un péptido de fusión que comprende la etiqueta de cuerpo de inclusión de la reivindicación 1 o reivindicación 2 unida de manera operativa al menos a un péptido de interés.
- 25 6. El péptido de fusión de la reivindicación 5 que comprende además al menos un sitio de escisión que separa la etiqueta de cuerpo de inclusión del al menos un péptido de interés.
7. El péptido de fusión de la reivindicación 6 en el que el péptido de interés se selecciona del grupo que consiste en un péptido de unión a polímeros, un péptido de unión a pelo, un péptido de unión a uñas, un péptido de unión a piel, un péptido de unión a diente, un péptido antimicrobiano, un péptido de unión a arcilla, un péptido de unión a pigmento y un péptido de unión a celulosa.
- 30 8. Una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido de fusión que comprende la etiqueta de cuerpo de inclusión de la reivindicación 1 o reivindicación 2 unida de manera operativa al menos a un péptido de interés.
9. Un casete de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8.
10. Un vector que comprende el casete de expresión de la reivindicación 9.
11. Una célula huésped microbiana que comprende el vector de la reivindicación 10.
- 35 12. La célula huésped microbiana de la reivindicación 11, en la que la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Candida*, *Hansenula*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Zymomonas*, *Agrobacterium*, *Erythrobacter*, *Chlorobium*, *Chromatium*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Rhodobacter*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Corynebacteria*, *Mycobacterium*, *Deinococcus*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylosinus*,
 40 *Methylomicrobium*, *Methylocystis*, *Alcaligenes*, *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Anabaena*, *Thiobacillus*, *Methanobacterium*, *Klebsiella* y *Myxococcus*.
13. Un método para expresar un péptido en forma insoluble que comprende:

- a) sintetizar una construcción genética expresable que codifica un péptido de fusión que comprende una primera parte que codifica la etiqueta de cuerpo de inclusión de la reivindicación 1 o reivindicación 2 unida de manera operativa a una segunda parte que codifica un péptido de interés;
- b) transformar una célula huésped de expresión con la construcción genética de (a);
- 5 c) crecer la célula huésped transformada de (b) en condiciones en las que se exprese la construcción genética expresable y el péptido de fusión codificado se produzca en una forma insoluble; y
- d) recuperar dicho péptido de fusión en dicha forma insoluble.
14. Un método para la producción de un péptido de interés que comprende:
- 10 a) sintetizar una construcción genética que codifica un péptido de fusión que comprende una primera parte que codifica la etiqueta de cuerpo de inclusión de la reivindicación 1 o reivindicación 2 unida de manera operativa a una segunda parte que codifica al menos un péptido de interés; en el que dicha primera parte y dicha segunda parte están separadas por al menos un conector peptídico escindible;
- b) transformar una célula huésped de expresión con la construcción genética de (a);
- 15 c) crecer la célula huésped transformada de (b) en condiciones en las que se exprese la construcción genética y el péptido de fusión codificado se produzca en una forma insoluble;
- d) recuperar el péptido de fusión en dicha forma insoluble;
- e) escindir dicho péptido de fusión dicho al menos un conector peptídico escindible mediante lo cual dicha primera parte del péptido de fusión no está ya fusionada con dicha segunda parte; y
- f) recuperar dicho péptido de interés.
- 20 15. El método bien de 13 ó 14 en el que el péptido de interés se selecciona del grupo que consiste en un péptido de unión a polímeros, un péptido de unión a pelo, un péptido de unión a uñas, un péptido de unión a piel, un péptido de unión a diente, un péptido de unión a arcilla, un péptido de unión a pigmento, un péptido de unión a celulosa y un péptido antimicrobiano.

Alineamiento múltiple de secuencias CLUSTAL W (1.83)

```

IBT136      -----QORFOWQFEQQ----- (SEQ ID NO: 17)
IBT138      -----QORFOWQFEQQPE-GOORFOWQFEQQ----- (SEQ ID NO: 19)
IBT139      QORFOWQFEQQPRGQORFOWQFEQQPR-GOORFOWQFEQQPE-GOORFOWQFEQQ----- (SEQ ID NO: 21)
IBT103      -----QORFOWQFEQQPR-GOORFOWQFEQQPE-GOORFOWQFEQQ----- (SEQ ID NO: 15)
IBT139_CCPGCC QORFOWQFEQQPRGQORFOWQFEQQPR-GOORFOWQFEQQPE-GOORFOWQFEQQGSCCPGCC (SEQ ID NO: 31)
IBT182      -----QQHFHWHFQQQPR-GQQHFHWHFQQQPE-GQQHFHWHFQQQ----- (SEQ ID NO: 39)
IBT183      -----QQHFHWHFQQQPR-GQOKFKWKFFQQQPE-GQQHFHWHFQQQ----- (SEQ ID NO: 41)
IBT184      -----QQKFHWHFQQQPR-GQOKFHWHFQQQPE-GQOKFHWHFQQQ----- (SEQ ID NO: 43)
IBT185      -----MASPCGQORFOWQFEQQPC-GOORFOWQFEQQPC-GOORFOWQFEQQPCG----- (SEQ ID NO: 45)
IBT186      -----MASCGOORFOWQFEQQPRCGGOORFOWQFEQQPECGGOORFOWQFEQQPC----- (SEQ ID NO: 27)
IBT187a      -----QQKFKWKFFQQQPR-GQOKFKWKFFQQQPE-GQOKFKWKFFQQQ----- (SEQ ID NO: 47)
IBT187b      QOKFKWKFFQQQPRGQOKFKWKFFQQQPR-GQOKFKWKFFQQQPE-GQOKFKWKFKQ----- (SEQ ID NO: 49)

```

FIG. 1

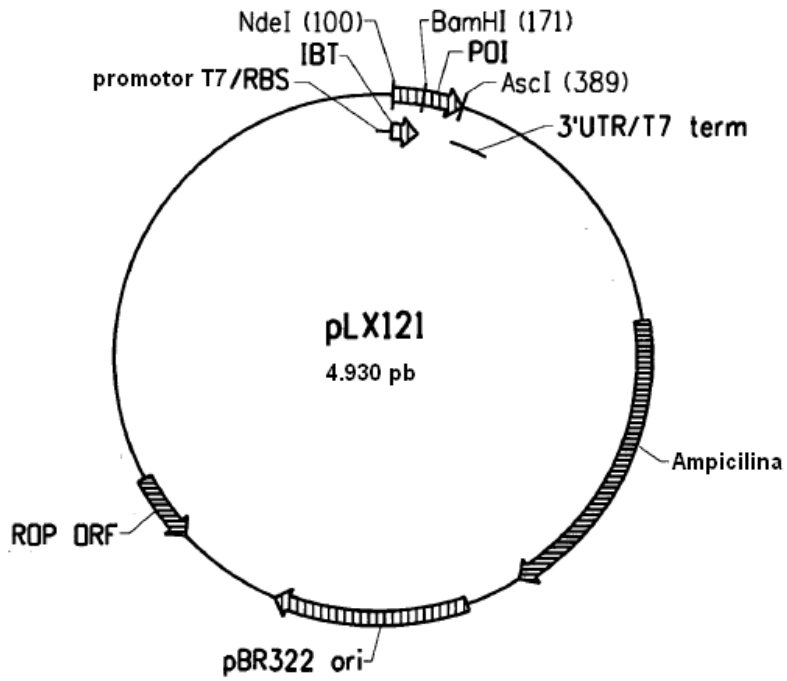


FIG. 2

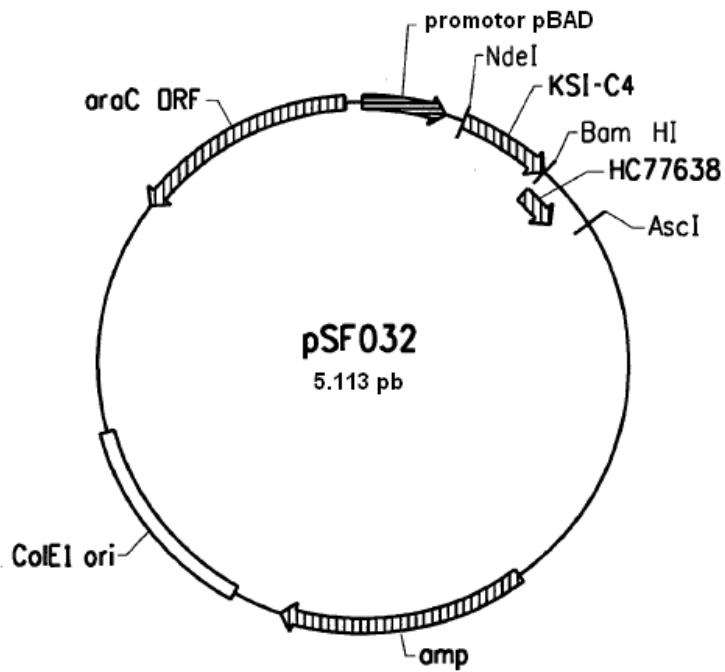


FIG. 3

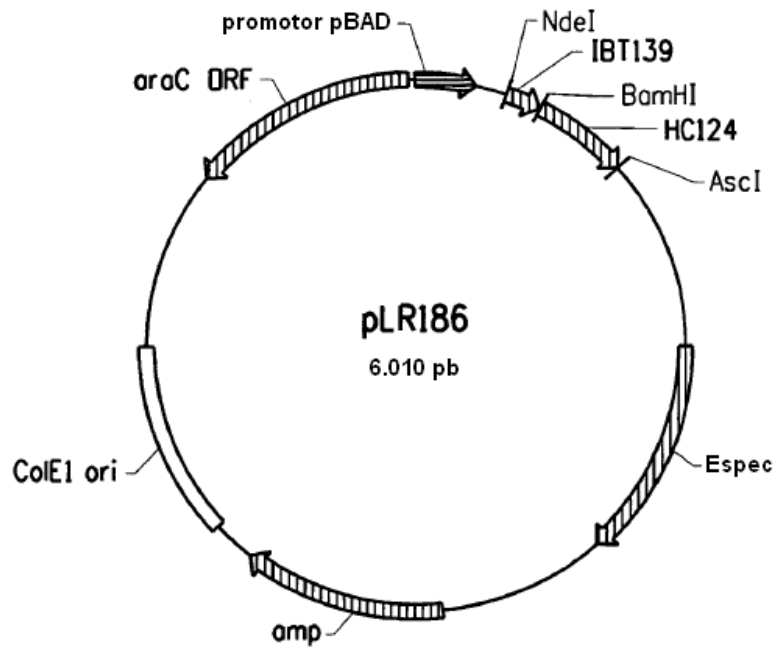


FIG. 4

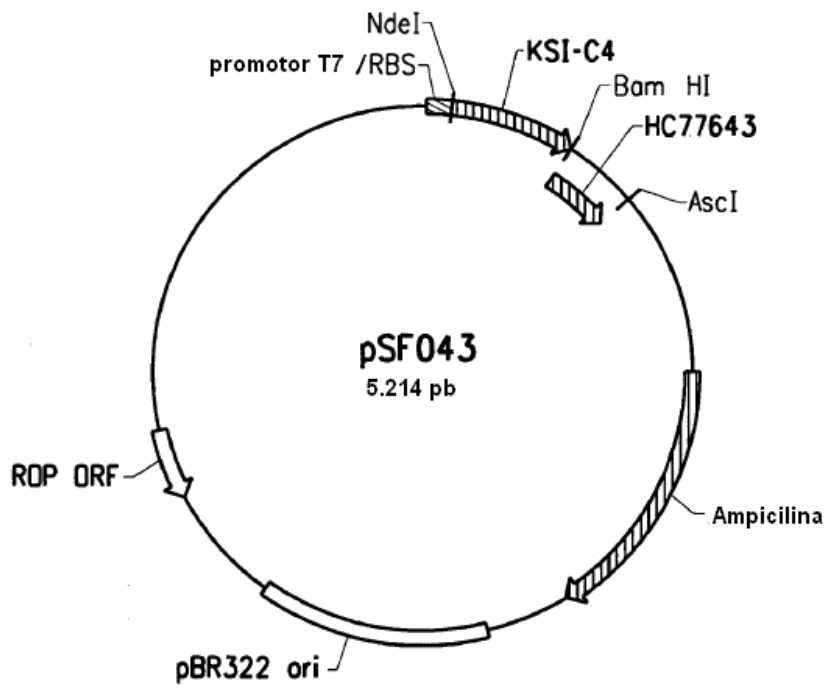


FIG. 5