

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 190**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2008** **E 08761043 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014** **EP 2164864**

54 Título: **Proteínas repetitivas sintéticas, su producción y su uso**

30 Prioridad:

20.06.2007 EP 07110696

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2015

73 Titular/es:

BASF SE (100.0%)
67056 Ludwigshafen, DE

72 Inventor/es:

LIEBMANN, BURGHARD;
FEHR, MARCUS y
HÜMMERICH, DANIEL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 530 190 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

Proteínas repetitivas sintéticas, su producción y su uso

La presente invención se refiere a nuevas proteínas repetitivas sintéticas así como a su producción y su uso.

Estado de la técnica

- 5 El documento WO 2004/104043 describe bioelastómeros sintéticos que están derivados de la secuencia repetitiva de la resilina así como a su uso. Se describen también moléculas híbridas que están compuestas de secuencias de resilina así como de secuencias de otras proteínas tales como, por ejemplo, seda de araña.

El documento WO2007/014755 describe proteínas repetitivas que contienen unidades de repetición que están derivadas de proteínas de seda de araña.

- 10 Las propiedades de diferentes proteínas repetitivas están descritas en la bibliografía. Por ejemplo, las resilinas son conocidas por sus buenas propiedades elásticas y la elevada proporción de energía almacenada elásticamente (resiliencia) (Gosline y col., Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Science, 357(1418): 121: 32, 2002). Las sedas de araña son conocidas, entre otras cosas, por su elevada resistencia a la tracción y tenacidad (Gosline y col.; J Exp Biol.; 202(Pt 23): 3295-303 (1999)).

Descripción de la invención

Se describe una proteína repetitiva con unidades de repetición que contiene la secuencia consenso (I)

$$X_1 X_2 X_3 X_4 S X_5 X_6 Y G,$$

siendo

- 20 X_1 G, Y, A o N
 X_2 G, L, Q
 X_3 R, K, T o P
 X_4 P, A, T o S
 X_5 D, T o S
 X_6 S, Q o T y

- 25 la secuencia consenso (II)

$$Z_1 Z_2 (Z_3 A)_n Z_4 Z_5 Z_6,$$

siendo

- 30 Z_1 S, Q, N, T o G
 Z_2 ningún aminoácido o A
 Z_3 A o G
 Z_4 ningún aminoácido, A o S
 Z_5 G, S, Q, N o T
 Z_6 G, P, S, Q, N o T
n un número entero natural con $2 \leq n \leq 12$.

- 35 Las proteínas repetitivas están caracterizadas por que al menos el 60 %, preferentemente al menos el 80 % de su secuencia de aminoácidos está compuesta de unidades de repetición.

Una unidad de repetición es una secuencia de aminoácidos con una longitud de 7-100, preferentemente 12 - 60 y, de forma particularmente preferente, 15 - 40 aminoácidos que aparece dentro de una proteína varias veces como secuencia idéntica o como variación con una identidad del 70 %, preferentemente al menos el 80 % y, de forma particularmente preferente, al menos el 90 %. Las proteínas repetitivas pueden contener copias idénticas o variaciones de una única o varias secuencias de aminoácidos diferentes.

- 40 Las unidades de repetición pueden estar unidas mediante engarces que contienen preferentemente de 1 a 30 aminoácidos, de forma particularmente preferente de 1 a 20 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de un engarce puede estar derivada de otras proteínas, preferentemente proteínas estructurales o no poseer ningún modelo natural o estar completamente ausente.

- 45 Pueden estar unidas unas a otras una cantidad discrecional de unidades de repetición, preferentemente 1-100, de forma particularmente preferente 10-65 y mucho más preferentemente 15-35.

La expresión secuencia consenso, tal como se usa en el presente documento, indica una secuencia de aminoácidos que contiene aminoácidos que aparecen frecuentemente en una posición determinada, no determinándose con

mayor detalle otros aminoácidos, sino sustituyéndose por el espaciador X en lugar del código de una letra usado habitualmente para aminoácidos. El experto conoce el código de una letra para los aminoácidos que se usa en el presente documento.

- 5 En un aspecto, la proporción de la cantidad de las secuencias consenso (I) en relación con la cantidad de las secuencias consenso (II) dentro del 60 %, preferentemente al menos el 80 % de las unidades de repetición de la proteína repetitiva es menor de cinco y mayor de dos.

En un aspecto, la proporción de la cantidad de las secuencias consenso (I) en relación con la cantidad de las secuencias consenso (II) dentro del 60 %, preferentemente al menos el 80 % de las unidades de repetición de la proteína repetitiva es igual a o menor de dos y mayor de uno, preferentemente igual a dos.

- 10 En un aspecto, la proporción de la cantidad de las secuencias consenso (I) en relación con la cantidad de las secuencias consenso (II) dentro del 60 %, preferentemente al menos el 80 % de las unidades de repetición de la proteína repetitiva es igual a o menor de uno, preferentemente igual a uno.

En un aspecto, el 60 %, preferentemente al menos el 80 % de las unidades de repetición de la proteína repetitiva contiene la secuencia parcial GGRPSDTYG o GGRPSSSYG.

- 15 En un aspecto, al menos el 60 %, preferentemente al menos el 80 % de las unidades de repetición de las proteínas de acuerdo con la invención contiene los motivos de secuencia An o $(GA)_m$ con A = alanina, G = glicina, n = 2 - 12, m = 2-10, preferentemente n = 5 - 10, m = 4 - 8 y, de forma particularmente preferente, n = 7 - 9, m = 6-7.

Las proteínas repetitivas de acuerdo con la presente invención contienen las unidades de repetición PGS-SAAAAAASGPGQGQGQGGRPSDTYG o SAAAAAAGPGGGNGGRPSDTYGAPGGGNGGRPSSSYG.

- 20 En otro aspecto, la proteína repetitiva de acuerdo con la invención contiene en el extremo amino o en el extremo carboxi una secuencia peptídica de 4-30 y, de forma particularmente preferente, 5-15 aminoácidos de longitud que sirve para la detección de la proteína mediante inmunotransferencia o para la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad. Son ejemplos no limitantes de tales secuencias peptídicas etiqueta de His 6 x (HHHHHH), etiqueta T7 (MASMTGGQMG), etiqueta S (KETAAAKFERQHMDS), etiqueta c-Myc (EQKLISEEDL), etiqueta Strep (WSHPQFEK) o etiqueta HA (YPYDVPDYA) (Terpe; Appl Microbiol Biotechnol; 60(5): 523-33 (2003)). Entre la proteína de acuerdo con la invención y la secuencia peptídica adicional pueden estar incluidas secuencias de aminoácidos que posibilitan la escisión química o enzimática de la secuencia peptídica.
- 25

En otra realización, la secuencia de aminoácidos de la proteína repetitiva se corresponde con la SEC ID N°: 2 o partes de esta secuencia.

- 30 En otra realización, la secuencia de aminoácidos de la proteína repetitiva se corresponde con la SEC ID N°: 4 o partes de esta secuencia.

Las proteínas repetitivas de acuerdo con la invención presentan nuevas propiedades sorprendentes. Estas nuevas propiedades se refieren, por ejemplo, a la estabilidad de soluciones proteicas acuosas y las propiedades de ensamblaje. Además, se ha constatado que las nuevas proteínas repetitivas otorgan propiedades ventajosas a composiciones cosméticas o dermatológicas, en particular pueden mejorar el efecto hidratante o suavizante. Las nuevas proteínas repetitivas se comportan, por lo demás, como buenos formadores de película y poseen, sobre todo, una reducida densidad superficial.

35

Por tanto, la presente invención se refiere también al uso de nuevas proteínas repetitivas monoméricas o ensambladas en la cosmética, en la alimentación humana y animal para la formulación de sustancias, para el acabado de papel, cuero y materiales textiles y para el revestimiento de superficies.

40

La producción de proteínas repetitivas se puede realizar mediante expresión de secuencias génicas naturales que se han modificado mediante biología molecular para obtener la estructura de acuerdo con la invención. El experto conoce procedimientos para el aislamiento y la modificación de secuencias génicas naturales.

- 45 Preferentemente se realiza la producción de las proteínas repetitivas mediante expresión de secuencias génicas producidas sintéticamente. Esta descrita una posibilidad para la producción de secuencias génicas sintéticas en Huemmerich y col., Biochemistry. 43(42): 13604-12, (2004).

Otro objeto de la invención se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas que se han descrito anteriormente. Son secuencias de ácido nucleico preferentes la SEC ID N°: 1 y la SEC ID N°: 3.

- 50 Otro objeto de la invención se refiere a vectores de expresión que contienen las secuencias de ácido nucleico que se han mencionado anteriormente. La expresión vector de expresión indica, en general, un elemento genético que se puede introducir en un organismo huésped y que posibilita allí la expresión de una secuencia de nucleótidos deseada. Son ejemplos de vectores de expresión plásmidos, fagos o virus. Preferentemente, los vectores de expresión contienen elementos de regulación tales como promotores o potenciadores, la secuencia de nucleótidos codificante correspondiente, iniciadores y terminadores de la transcripción así como elementos que posibilitan la

multiplicación del vector.

Los sistemas de expresión para proteínas son bien conocidos y se han descrito en Sambrook y col.: Molecular cloning: A Laboratory Manual; 3ª Ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press; Cold Spring Harbour (2001). Son ejemplos no limitantes de organismos de expresión procariotas *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium glutamicum* y otros. Son ejemplos no limitantes de organismos de expresión eucariotas levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* entre otros, hongos filamentosos, tales como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma reesei*, *Acremonium chrysogenum* entre otros, células de mamífero tales como células Hela, células COS, células CHO entre otras, células de insecto, tales como células Sf9, células MEL entre otras, plantas o células vegetales tales como *Solanum tuberosum*, *Nicotiana*, entre otras.

Otro objeto de la invención se refiere al ensamblaje de las proteínas repetitivas hasta dar microperlas de proteínas, nanofibrillas, geles y películas.

Las microperlas de proteína se pueden producir preferentemente mediante el procedimiento descrito a continuación:

La proteína repetitiva se disuelve en un primer disolvente. Como disolventes se pueden usar, por ejemplo, soluciones salinas acuosas. En particular son adecuadas soluciones salinas altamente concentradas con una concentración mayor de 2, en particular mayor de 4 y, de forma particularmente preferente, mayor de 5 molar, cuyos iones presentan propiedades caotrópicas más intensamente marcadas que los iones sodio y cloro. Un ejemplo de una solución salina de este tipo es tiocianato de guanidinio 6 M o bromuro de litio 9 M. Además se pueden usar disolventes orgánicos para disolver las proteínas repetitivas. Son adecuados en particular alcoholes fluorados o hidrocarburos cíclicos. Son ejemplos de esto hexafluoroisopropanol y ciclohexano. La producción de las microperlas de proteína se puede realizar en los disolventes descritos. Como alternativa, este disolvente se puede sustituir por otro disolvente, por ejemplo, soluciones salinas de baja concentración ($c < 0,5$ M) mediante diálisis o dilución. La concentración final de la proteína disuelta debería encontrarse entre 0,1 - 100 mg/ml. La temperatura a la que se lleva a cabo el procedimiento asciende habitualmente a 0 - 80, preferentemente 5 - 50 y, de forma particularmente preferente, a 10 - 40 °C.

En caso del uso de soluciones acuosas, las mismas pueden estar mezcladas también con un tampón, preferentemente en el intervalo de pH 4-10, de forma particularmente preferente de 5 a 9, de forma muy particularmente preferente de 6 a 8,5. Mediante adición de un aditivo se induce una separación de fases. A este respecto se produce una fase rica en proteínas emulsionada en la mezcla de disolvente y aditivo. A causa de efectos superficiales, las gotas ricas en proteínas emulsionadas adoptan una forma redonda. Mediante la selección del disolvente, del aditivo y de la concentración de proteínas se puede ajustar el diámetro medio de las microperlas de proteínas a valores entre 0,1 μm y 50 μm .

Como aditivo se pueden usar todas las sustancias que, por un lado, sean miscibles con el primer disolvente y, por otro lado, induzcan la formación de una fase rica en proteínas. Si se lleva a cabo la formación de microperlas en disolventes orgánicos, para esto son adecuadas sustancias orgánicas que presentan una menor polaridad que el disolvente, por ejemplo, tolueno. En soluciones acuosas se pueden usar como aditivos sales, cuyos iones presentan propiedades cosmotrópicas más intensamente marcadas que los iones sodio y cloro (por ejemplo, sulfato de amonio; fosfato de potasio). La concentración final del aditivo debería ascender, dependiendo del tipo del aditivo, a entre el 1 % y el 50 % en peso en relación con la solución de proteína.

Las gotas ricas en proteínas se fijan mediante endurecimiento, conservándose la forma redonda. La fijación se basa, a esto respecto, en la configuración de fuertes interacciones intermoleculares. El tipo de las interacciones puede ser no covalente, por ejemplo, mediante la formación de cristales de hoja plegada β intermoleculares o covalente, por ejemplo, mediante reticulación química. El endurecimiento se puede realizar mediante el aditivo y/o mediante la adición de otra sustancia adecuada. El endurecimiento se realiza a temperaturas entre 0 y 80 °C, preferentemente entre 5 y 60 °C.

Esta otra sustancia puede ser un reticulante químico. A este respecto, por un reticulante químico se entiende una molécula en la que al menos dos grupos químicamente reactivos están unidos entre sí a través de un engarce. Son ejemplo de esto grupos reactivos con sulfhidrilo (por ejemplo, maleimidas, disulfuros de pídridilo, α -haloacetilos, vinilsulfonas, sulfatoalquilsulfonas (preferentemente sulfatoetilsulfonas), grupos reactivos con amina (por ejemplo, éster de succinimidilo, carbodiimidas, hidroximetil-fosfina, éster de imido, éster de PFP, aldehídos, isotiocianatos, etc.), grupos reactivos con carboxi (por ejemplo, aminas, etc.), grupos reactivos con hidroxilo (por ejemplo, isocianatos, etc.), grupos no selectivos (por ejemplo arilazidas etc.) y grupos fotoactivables (por ejemplo, perfluorofenilazida etc.). Estos grupos reactivos pueden formar enlaces covalentes con grupos amino, tiol, carboxilo o hidroxilo presentes en proteínas.

Para el endurecimiento de las microperlas se pueden usar también sustancias que forman un enlace covalente entre restos de aminoácidos. Un ejemplo de esto es una combinación de peroxodisulfato de amonio y diclororutenio (II) de tris(2,2'-bipiridilo) que con la acción de luz visible median en la formación de ditirosinas.

Las microperlas estabilizadas se lavan con otro disolvente adecuado, por ejemplo, agua y se secan a continuación mediante procedimientos habituales para el experto, por ejemplo, mediante liofilización o secado por pulverización. El éxito de la formación de las bolas se comprueba con ayuda de microscopía electrónica de barrido.

El procedimiento para la producción de las microperlas permite la inclusión y, por tanto, una formulación de principios activos hidrófobos en las microperlas. Este procedimiento comprende dos etapas. En la primera etapa se disuelven el principio activo hidrófobo y la proteína repetitiva en una fase común. Para esto, el principio activo y la proteína se pueden poner en solución directamente mediante un disolvente o una mezcla de disolventes. Como alternativa, el principio activo y la proteína se pueden disolver en primer lugar en diferentes disolventes y después se pueden mezclar entre sí las soluciones, de tal manera que a su vez se forma una fase común. En el caso de la fase común se puede tratar de una fase dispersa molecular o una fase dispersa coloidal.

La solución del principio activo hidrófobo y de la proteína en distintos disolventes y la mezcla posterior de ambas soluciones es ventajosa en particular cuando el principio activo hidrófobo y la proteína no se pueden disolver en un disolvente común o mezcla de disolventes. De este modo se pueden producir mediante esta forma de proceder también soluciones dispersas coloidales de principios activos hidrófobos, al diluirse el principio activo disuelto en un disolvente adecuado en otro disolvente en el que este principio activo es insoluble.

Ya que las proteínas por norma general son bastante solubles en agua, preferentemente se trabaja con soluciones acuosas y mezclas de agua y disolventes orgánicos miscibles con agua. Son ejemplos de disolventes adecuados miscibles con agua alcoholes tales como metanol, etanol e isopropanol, alcoholes fluorados tales como hexafluoroisopropanol y trifluoroetanol, alcanonas tales como acetona o incluso sulfóxidos tales como, por ejemplo, dimetilsulfóxido o formamidas tales como dimetilformamida u otros disolventes orgánicos tales como, por ejemplo, tetrahidrofurano y acetonitrilo o *N*-metil-2-pirrolidona. En general se puede trabajar con todos los disolventes y mezclas de disolventes en los que se pueden disolver las proteínas de acuerdo con la invención. Son ejemplos de disolventes adecuados alcoholes fluorados tales como, por ejemplo, hexafluoroisopropanol o trifluoroetanol, líquidos iónicos tales como, por ejemplo, acetato de EMIM, soluciones acuosas de sales caotrópicas tales como, por ejemplo, urea, clorhidrato de guanidinio o tiocianato de guanidinio o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido fórmico así como mezclas de estos disolventes con otros disolventes orgánicos. Son ejemplos de disolventes que se pueden mezclar con los disolventes para la proteína, entre otros, alcoholes tales como metanol, etanol e isopropanol, alcanonas tales como acetona, sulfóxidos tales como, por ejemplo, dimetilsulfóxido, formamidas tales como dimetilformamida, haloalcanos tales como cloruro de metileno o incluso otros disolventes orgánicos tales como, por ejemplo, tetrahidrofurano.

En una segunda etapa, en la solución de principio activo - proteína común se induce una separación de fases y el endurecimiento posterior de las microperlas. Ese procedimiento se realiza según el mismo principio como ya se ha descrito para la producción de microperlas de proteínas puras. Durante la formación de microperlas tiene lugar una interacción de los principios activos hidrófobos con las proteínas repetitivas de acuerdo con la invención.

Las interacciones entre el principio activo hidrófobo y la proteína se basan, esencialmente, en sus propiedades hidrófobas, pudiendo intervenir, no obstante, también puentes de hidrógeno, interacciones iónicas e interacciones de van-der-Waals. El principio activo hidrófobo puede estar unido a la superficie, estar incluido en las microperlas o estar asociado también de ambas formas con las microperlas. La unión del principio activo hidrófobo a las microperlas se puede determinar mediante el empobrecimiento de la preparación de ensamblaje en principio activo disuelto. La concentración del principio activo se puede medir mediante un análisis cuantitativo de sus propiedades. De este modo se puede analizar la unión de principios activos absorbentes de luz, por ejemplo, mediante procedimientos fotométricos. Para esto se determinan, por ejemplo, la coloración de las microperlas o la decoloración de la fase pobre en proteína y principio activo de la preparación de formulación mediante medición de la absorción del principio activo con color. Con ayuda de estos procedimientos también se puede determinar cómo de elevada es la parte de principios activos en las microperlas.

La liberación de los principios activos de las microperlas se puede realizar mediante desorción en disolventes adecuados, mediante la degradación de las microperlas por proteasas o mediante disolución de las microperlas mediante disolventes adecuados. Son disolventes adecuados para la desorción todos los disolventes o las mezclas de disolventes en los que se puede disolver el principio activo. Se pueden añadir de forma dirigida proteasas adecuadas como proteasas técnicas a una suspensión de microperlas de proteínas o aparecer de forma natural en el lugar de acción deseado de las moléculas efectoras, tales como, por ejemplo proteasas de piel, proteasas del aparato digestivo, por ejemplo, proteasas estomacales o intestinales o proteasas liberadas por microorganismos. Son disolventes que pueden disolver las microperlas, por ejemplo, alcoholes fluorados tales como, por ejemplo, hexafluoroisopropanol o trifluoroetanol, líquidos iónicos tales como, por ejemplo, acetato de EMIM, soluciones acuosas de sales caotrópicas tales como, por ejemplo, urea, clorhidrato de guanidinio y tiocianato de guanidinio o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido fórmico así como mezclas de estos disolventes con otros disolventes orgánicos. La velocidad y la cinética de la liberación de las moléculas efectoras se pueden controlar, por ejemplo, mediante la densidad de carga con principios activos y el tamaño de las microperlas o su relación de volumen a superficie.

En condiciones adecuadas, a partir de las proteínas repetitivas de acuerdo con la invención se pueden producir nanofibrillas. La formación de nanofibrillas se manifiesta en el plano macroscópico en un espesamiento de tipo gel de una solución acuosa de proteína a partir de una concentración de nanofibrillas de 1 mg/ml.

El punto de partida para el ensamblaje de nanofibrillas de proteína es una solución acuosa de la proteína repetitiva con una concentración de proteína de 0,1 - 400 mg/ml, preferentemente 1 - 100 mg/ml y, de forma particularmente preferente, 5 - 20 mg/ml. La solución acuosa puede haberse mezclado con un tampón, preferentemente en el intervalo de pH 4-10, de forma particularmente preferente 5 a 9, de forma muy particularmente preferente de 6 a 8,5. El ensamblaje se realiza por sí mismo en el intervalo de varias semanas. Se puede acelerar mediante la adición de disolventes orgánicos solubles en agua que reducen la polaridad de la solución. Son ejemplo de esto alcoholes tales como etanol y metanol. La concentración final del disolvente debería encontrarse entre el 1 % y el 50 % en peso en relación con la solución de proteína.

Las nanofibrillas de proteína ensambladas se lavan con un disolvente adecuado, por ejemplo, agua y a continuación se secan mediante procedimientos habituales para el experto, por ejemplo, mediante liofilización, secado por contacto o secado por pulverización. El éxito de la formación de las fibras se comprueba con ayuda de microscopía electrónica de transmisión o microscopía de fuerza atómica.

En condiciones adecuadas se pueden producir películas a partir de las proteínas repetitivas de acuerdo con la invención. Para esto, la proteína repetitiva se disuelve en un primer disolvente. Como disolventes se pueden usar, por ejemplo, soluciones salinas acuosas. En particular son adecuadas soluciones salinas altamente concentradas con una concentración mayor de 2, en particular mayor de 4 y, de forma particularmente preferente, mayor de 5 molar, cuyos iones presentan propiedades caotrópicas más intensamente marcadas que los iones sodio y cloro. Un ejemplo de una solución salina de este tipo es tiocianato de guanidinio 6 M o bromuro de litio 9 M. Además se pueden usar disolventes orgánicos para disolver las proteínas repetitivas. En particular son adecuados alcoholes fluorados o hidrocarburos cíclicos. Son ejemplos de esto hexafluoroisopropanol y ciclohexano. La producción de las películas se puede realizar en el primer disolvente descrito, siempre que el mismo no contenga ninguna sustancia no volátil. Los disolventes que contienen constituyentes no volátiles se tienen que sustituir por otro disolvente que no contenga sustancias no volátiles, por ejemplo, mediante diálisis. Son disolventes volátiles preferentes, a partir de los cuales se puede realizar la formación de película, hexafluoroisopropanol, ciclohexano, ácido fórmico y agua. La concentración final de la proteína disuelta debería encontrarse entre 1 -200 mg/ml, preferentemente entre 20 - 150 mg/ml y, de forma particularmente preferente, entre 50 - 100 mg/ml. La temperatura a la que se lleva a cabo el procedimiento habitualmente asciende a de 0 - 80, preferentemente 5 - 50 y, de forma particularmente preferente, 10 - 40 °C. La proteína repetitiva disuelta en el disolvente volátil se siembra sobre una superficie lisa. El disolvente se evapora a temperatura ambiente y deja detrás la película proteica.

Las películas de proteína recién preparadas por norma general son solubles en agua. Para la estabilización de las películas, las mismas se pueden incubar con sustancias que inducen la configuración de estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias estables dentro de la película. Son ejemplos de tales sustancias alcoholes, tales como, por ejemplo, metanol y etanol o soluciones de sales cuyos iones presentan propiedades cosmotrópicas más intensamente marcadas que los iones sodio y cloro (por ejemplo, sulfato de amonio; fosfato de potasio). Después de la estabilización de las películas, las mismas se pueden lavar con disolventes adecuados tales como, por ejemplo, alcoholes o agua y a continuación secarse.

También están descritas moléculas que están compuestas de acoplamiento de una proteína repetitiva de acuerdo con la invención y una molécula efectora. Por moléculas efectoras se entiende moléculas que presentan un efecto previsible determinado. Estas pueden ser moléculas de tipo proteína tales como enzimas, o también moléculas no proteinogénicas tales como colorantes, fotoprotectores, vitaminas, provitaminas, antioxidantes y ácidos grasos, acondicionadores o compuestos que contienen iones de metal.

Las moléculas efectoras están unidas a la proteína repetitiva. La unión entre la molécula efectora y la proteína puede ser un enlace covalente y puede basarse en interacciones iónicas o de van-der Waals o interacciones hidrófobas o enlaces de puentes de hidrógeno o adsorción.

El enlace covalente de la molécula efectora se puede realizar a través de las cadenas laterales de la secuencia polipeptídica de la proteína repetitiva, en particular a través de funciones amino o funciones hidroxilo o funciones carboxilato o funciones tiol. Se prefiere un enlace a través de las funciones amino de uno o varios restos lisina, a través de las funciones carboxilato de uno o varios restos glutamato o aspartato, a través de la función tiol de uno o varios restos cisteína o a través de la función N-terminal o C-terminal de la proteína repetitiva. Aparte de las funciones de aminoácido que aparecen en la secuencia de aminoácidos se pueden unir también aminoácidos con funciones adecuadas (por ejemplo, cisteínas, lisinas, aspartatos, glutamatos) a la secuencia o incluirse en la secuencia o aminoácidos de la proteína repetitiva se pueden sustituir por tales funciones de aminoácido.

El enlazado de las moléculas efectoras con la proteína repetitiva se puede realizar directamente, es decir, como enlace covalente de dos funciones químicas ya existentes. A este respecto, las funciones químicas que se han descrito anteriormente de las proteínas repetitivas se enlazan con grupos reactivos que están contenidos en las moléculas efectoras. Son ejemplos de tales grupos reactivos grupos reactivos con sulfhidrilo, por ejemplo,

maleimidas, disulfuros de pidridilo, α -haloacetilos, vinilsulfonas, sulfatoalquilsulfonas (preferentemente sulfatoetilsulfonas), grupos reactivos con amina (por ejemplo, éster de succinimidilo, carbodiimidas, hidroximetil-fosfina, éster de imido, éster de PFP, aldehídos, isotiocianato, etc.), grupos reactivos con carboxi (por ejemplo, aminas, etc.), grupos reactivos con hidroxilo (por ejemplo, isocianatos, etc.), grupos no selectivos (por ejemplo arilazidas etc.) y grupos fotoactivables (por ejemplo, perfluorofenilazida etc.).

Si las funciones que han de acoplarse de las proteínas repetitivas de acuerdo con la invención y los efectores poseen una reactividad demasiado reducida para un acoplamiento directo, entonces estas funciones se pueden activar con procedimientos habituales para el experto (por ejemplo, activación de funciones carboxilo con carbodiimidas).

Pero el enlazado se puede realizar también a través de un denominado engarce, es decir, una molécula al menos bifuncional que con una o varias funciones establece una unión con la molécula efectora y que se enlaza con una o varias funciones adicionales con la proteína repetitiva. El uso de tales engarces a medida permite la adaptación exacta del enlace a la molécula efectora deseada. Además, por ello es posible enlazar varias moléculas efectoras con una proteína repetitiva de forma definida.

El engarce usado se rige por la funcionalidad que debe acoplarse. Son adecuadas, por ejemplo, moléculas que se acoplan a una proteína repetitiva mediante grupos reactivos con sulfhidrilo, por ejemplo, maleimidas, disulfuros de pidridilo, α -haloacetilos, vinilsulfonas, sulfatoalquilsulfonas (preferentemente sulfatoetilsulfonas), grupos reactivos con amina (por ejemplo, éster de succinimidilo, carbodiimidas, hidroximetil-fosfina, éster de imido, éster de PFP, aldehídos, isotiocianato, etc.), grupos reactivos con carboxi (por ejemplo, aminas, etc.), grupos reactivos con hidroxilo (por ejemplo, isocianatos, etc.), grupos no selectivos (por ejemplo arilazidas etc.) y grupos fotoactivables (por ejemplo, perfluorofenilazida etc.) y que se acoplan con moléculas efectoras mediante

- grupos reactivos con sulfhidrilo (por ejemplo, maleimidas, disulfuros de pidridilo, α -haloacetilos, vinilsulfonas, sulfatoalquilsulfonas (preferentemente sulfatoetilsulfonas)
- grupos reactivos con amina (por ejemplo, éster de succinimidilo, carbodiimidas, hidroximetil-fosfina, éster de imido, éster de PFP, aldehído, isotiocianato, etc.)
- azúcares o grupos reactivos con azúcar oxidados (por ejemplo hidrazidas, etc.)
- grupos reactivos con carboxi (por ejemplo, aminas, etc.)
- grupos reactivos con hidroxilo (por ejemplo, isocianatos, etc.)
- grupos reactivos con timina (por ejemplo, psoraleno, etc.)
- grupos no selectivos (por ejemplo, arilazidas, etc.)
- grupos fotoactivables (por ejemplo, perfluorofenilazida, etc.)
- grupos complejantes de metal (por ejemplo, EDTA, hexahis, ferritina)
- anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos de F(ab) de anticuerpos, anticuerpos catalíticos).

Las funciones químicas de un engarce pueden estar unidas mediante elementos espaciadores. Los elementos espaciadores pueden estar compuestos, por ejemplo, de cadenas de alquilo, etilenglicol y polietilenglicoles.

Se prefieren en particular elementos de engarce y/o espaciadores que poseen un punto de escisión potencial para una proteasa, lipasa, esterasa, fosfatasa, hidrolasa, es decir, que se pueden escindir enzimáticamente.

Los ejemplos de engarces que se pueden escindir enzimáticamente que se pueden emplear en las moléculas de acuerdo con la invención están mencionados, por ejemplo, en el documento WO 98/01406, a cuyo contenido se hace referencia por la presente en forma expresa en su totalidad.

Se prefieren en particular engarces y espaciadores que se pueden termoescindir o fotoescindir. El experto conoce estructuras químicas correspondientes y se integran entre las partes de molécula molécula efectora y proteína repetitiva.

En caso de que la molécula efectora esté compuesta de una secuencia polipeptídica, se puede realizar el enlazado de efector y proteína repetitiva como una denominada proteína de fusión, es decir, se usa una secuencia polipeptídica continua que está compuesta de secuencias parciales de proteína repetitiva y efector.

Entre el efector y la proteína repetitiva se pueden incluir también todavía los denominados elementos espaciadores, por ejemplo, secuencias polipeptídicas que poseen un punto de escisión potencial para una proteasa, lipasa, esterasa, fosfatasa, hidrolasa o secuencias oligo- y polipeptídicas que permiten una ligera purificación de la proteína de fusión, por ejemplo, las denominadas etiquetas His, es decir, restos de oligohistidina.

Las moléculas efectoras acopladas a proteínas repetitivas de forma covalente o no covalente pueden ser activas en su forma unida. Pero como alternativa, las moléculas efectoras acopladas a proteínas repetitivas también se pueden liberar de las proteínas repetitivas.

La liberación de moléculas efectoras acopladas de forma covalente de las proteínas repetitivas se puede realizar mediante escisión de espaciadores escindibles introducidos específicamente o engarces de acoplamiento que, por

ejemplo, se pueden termoescindir, fotoescindir o escindir enzimáticamente, pero también mediante la degradación proteolítica (por ejemplo por proteasas).

Parte experimental

Ejemplo 1

5 Producción de la proteína repetitiva R₁₆ (SEC ID N°: 2)

Se multimerizó un gen sintético que codifica la proteína repetitiva R₁₆ mediante multimerización de un oligonucleótido sintético R:

**ggccccgggttctagcgcggctgcagccgcggcagctgcgtccggccccgggtcagggccaggggtcaggggtc
aaggccaggggtggccgtccttctgacacctac**

10 de forma correspondiente al procedimiento descrito en Huemmerich y col.; Biochemistry 43(42): 13604-12, (2004) hasta dar un multímero de 16 unidades y se clonó en el vector de expresión pET21a (Novagen). La expresión se realizó en la cepa de *E. coli* BLR [DE3] (Novagen). El cultivo y la síntesis de la proteína se realizaron con pO₂>20 % y pH=6,8 en el procedimiento de lote alimentado.

Medio

8 litros	Agua
230 g	Extracto de levadura
150 g	Bacto-Triptona
30 g	Glicerol (99 %)
20 g	Dihidrogenofosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)
50 g	Sulfato de amonio ((NH ₄) ₂ SO ₄)
10,5 g	Sulfato de magnesio heptahidrato (MgSO ₄ * 7 H ₂ O)
1,0 g	Cloruro de calcio dihidrato (CaCl ₂ * 2 H ₂ O)
100 ml	Solución salina traza
	rellenar con agua hasta 9,7 litros, ajustar valor de pH a 6,8 con NaOH al 25 %
3 ml	Tego KS 911 (Antiespuma; productos Goldschmidt)
1 g	Ampicilina

Solución salina traza:

5 litros	Agua
200,00 g	Ácido cítrico monohidrato
55,00 g	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O
42,50 g	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ * 6 H ₂ O
15,00 g	MnSO ₄ *H ₂ O
4,00 g	CuSO ₄ *5H ₂ O
1,25 g	CoSO ₄ *7H ₂ O

15 Solución de alimentación

800 g	agua
30 g	Ácido cítrico monohidrato
60 g	Sulfato sódico (Na ₂ SO ₄)
4,5 g	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ * 6H ₂ O
3400 g	Glicerol 99,5 %

Después de haber consumido el glicerol contenido en el medio básico se inició una alimentación constante con una velocidad de 100 ml/h.

20 Se indujo la síntesis de la proteína mediante adición de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido 1 mM después de que el cultivo bacteriano hubiera alcanzado una densidad óptica DO₆₀₀=40. En este momento se redujo la temperatura del cultivo de 37 °C a 32 °C. 7 h después de la inducción se recogieron las células.

La purificación de la proteína se llevó a cabo según el siguiente protocolo:

- resuspensión del sedimento celular en 5 ml por gramo de masa húmeda de MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) 20 mM pH 7,0
- lisis de las células en el homogeneizador de alta presión a 140 MPa (1400 bar)
- 5 - centrifugación 30 min, 5000 xg
- lavado del sedimento con 5 ml por gramo de masa húmeda con Tris/HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 100 mM, tetraacetato de etilendiamina 0,5 mM (EDTA), Triton X-100 al 0,1%
- lavado del sedimento con 5 ml por gramo de masa húmeda de Tris/HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 100 mM, tetraacetato de etilendiamina (EDTA) 0,5 mM
- 10 - disolución del sedimento mediante adición de 1,6 g de tiocianato de guanidinio (GdmSCN) por gramo de sedimento (concentración final GdmSCN 6 M)
- centrifugación 60 min, 5000 xg
- diálisis del sobrenadante frente a fosfato de potasio 5 mM pH 7,0
- centrifugación 30 min, 5000 xg
- 15 - precipitación de la proteína del sobrenadante mediante adición de $\frac{1}{4}$ en volumen de sulfato de amonio 4 M durante 1 h a temperatura ambiente
- lavado del sedimento con urea 8 M
- lavado 2 x del sedimento con agua
- liofilización
- 20 - la proteína liofilizada se puede almacenar a -20 °C.
- para el uso de la proteína se recoge la proteína liofilizada en GdmSCN 6 M y se dializa frente a fosfato de potasio 5 mM pH 7,0.
- el contenido de proteína en solución se determinó fotométricamente ($E_{(280;1 \text{ mg/ml})}=0,42$)
- la pureza de la proteína se comprobó mediante SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western (Figura 1) así como espectroscopía de fluorescencia (Figura 2)
- 25

A partir de una fermentación de 10 l se obtuvieron 20 g de proteína R₁₆ limpia con una pureza de >95 %.

Ejemplo 2

Producción de la proteína repetitiva S₁₆ (SEC ID N°: 4)

- 30 Se multimerizó un gen sintético que codifica la proteína repetitiva S₁₆ mediante multimerización de un oligonucleótido sintético S:

gggtctgaggctgcagccgcggcagctgcgggtccgggcgggtggcaacgggtggccgtccgtctgacacctac

gggtgcgccgggtggcggtaacgggtggccgtccttctctcttac

- 35 de forma correspondiente al procedimiento descrito en Huemmerich y col.; Biochemistry 43(42): 13604-12, (2004) hasta dar un multímero de 16 unidades y se clonó en el vector de expresión pET21a (Novagen). La expresión se realizó en la cepa de *E. coli* BLR [DE3] (Novagen). El cultivo y la síntesis de la proteína se realizaron a pO₂>20 % y pH=6,8 en el procedimiento de lote alimentado.

Medio

- 8 litros Agua
- 230 g Extracto de levadura
- 150 g Bacto-Triptona
- 30 g Glicerol (99 %)
- 20 g Dihidrogenofosfato de potasio (KH₂PO₄)
- 50 g Sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄)
- 10,5 g Sulfato de magnesio heptahidrato (MgSO₄ * 7 H₂O)
- 1,0 g Cloruro de calcio dihidrato (CaCl₂ * 2 H₂O)
- 100 ml Solución salina traza
- rellenar con agua hasta 9,7 litros, ajustar valor de pH a 6,8 con NaOH al 25 %
- 3 ml Tego KS 911 (Antiespuma; productos Goldschmidt)
- 1 g Ampicilina

Solución salina traza:

5 litros	Agua
200,00 g	Ácido cítrico monohidrato
55,00 g	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O
42,50 g	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ * 6 H ₂ O
15,00 g	MnSO ₄ *H ₂ O
4,00 g	CuSO ₄ *5H ₂ O
1,25 g	CoSO ₄ *7H ₂ O

Solución de alimentación

800 g	agua
30 g	Ácido cítrico monohidrato
60 g	Sulfato sódico (Na ₂ SO ₄)
4,5 g	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ *6H ₂ O
3400 g	Glicerol 99,5 %

- 5 Después de haber consumido el glicerol contenido en el medio básico se inició una alimentación constante con una velocidad de 100 ml/h.

Se indujo la síntesis de la proteína mediante adición de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido 1 mM después de que el cultivo bacteriano hubiera alcanzado una densidad óptica DO₆₀₀=40. En este momento se redujo la temperatura del cultivo de 37 °C a 25 °C. 4 h después de la inducción se recogieron las células.

La purificación de la proteína se llevó a cabo según el siguiente protocolo:

- 10 - resuspensión del sedimento celular en 5 ml por gramo de masa húmeda de MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) 20 mM pH 7,0
- lisis de las células en el homogeneizador de alta presión a 140 MPa (1400 bar)
- centrifugación 30 min, 5000 xg
- incubación del sobrenadante durante 20 min a 80 °C
- 15 - centrifugación 30 min, 5000 xg
- precipitación de la proteína del sobrenadante mediante adición de 1 volumen de sulfato de amonio 4 M durante 1 h a temperatura ambiente
- lavado del sedimento con urea 8 M
- lavado 2 x del sedimento con agua
- 20 - liofilización
- la proteína liofilizada se puede almacenar a -20 °C.
- para el uso de la proteína se recoge el precipitado de sulfato de amonio en GdmSCN 6 M y se dializa frente a fosfato de potasio 5 mM pH 7,0.
- el contenido de proteína en solución se determinó fotométricamente ($E_{(280;1 \text{ mg/ml})}=0,76$)
- 25 - la pureza de la proteína se comprobó mediante SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western (Figura 1) así como espectroscopía de fluorescencia (Figura 2)

De una fermentación de 10 l se obtuvieron 1,4 g de proteína S₁₆ pura.

Ejemplo 3

Formación de microperlas de proteína a partir de proteínas repetitivas R₁₆ y S₁₆

30 Protocolo

- disolución de la R₁₆ o S₁₆ liofilizada en tiocianato de guanidinio 6 M con una concentración final de 10 mg/ml
- diálisis frente a fosfato de potasio 1 M pH 7,0 a temperatura ambiente
- lavado con agua
- liofilización

- 35 Mediante la sustitución del tiocianato de guanidinio caotrópico por el fosfato de potasio cosmotrópico se induce la formación de microperlas de R₁₆ o S₁₆. Como alternativa, el tiocianato de guanidinio se puede eliminar mediante diálisis frente a fosfato de potasio 5 mM. La formación de microperlas se induce mediante adición de ¼ en volumen de sulfato de amonio 4 M o ½ en volumen de fosfato de potasio 1 M.

Protocolo

- disolución de la R₁₆ o S₁₆ liofilizada en tiocianato de guanidinio 6 M con una concentración final de 15 mg/ml
 - diálisis frente a fosfato de potasio 5 mM pH 7,0 a 4 °C
 - retirada del precipitado mediante centrifugación durante 30 min a 10000 xg
 - 5 - ajuste de la concentración de proteína a 10 mg/ml
 - adición de ¼ en volumen de sulfato de amonio 4 M o ½ en volumen de fosfato de potasio 1 M
 - incubación a temperatura ambiente durante 1 h
 - lavado con agua
 - liofilización
- 10 El éxito de la formación de las microperlas se comprobó con ayuda de la microscopía electrónica de barrido (Figuras 3 + 4).

Ejemplo 4

Estabilización de microperlas de S₁₆

- 15 El procedimiento de formación de las microperlas de S₁₆ incluye una separación de fases inducida por fosfato de potasio o sulfato de amonio y la posterior estabilización de la fase rica en proteínas mediante configuración de estructuras secundarias estables. Las gotas ricas en proteínas no endurecidas se pueden diferenciar de las microperlas estabilizadas experimentalmente gracias a su diferente estabilidad en urea 4 M. Se examinó la cinética de la estabilización.

Protocolo

- 20 - preparación de una solución acuosa 10 mg/ml de S₁₆ en fosfato de potasio 5 mM pH 7,0
 - precipitación de la proteína S₁₆ en el momento 0 con ¼ en volumen de sulfato de amonio 4 M
 - extracción de una alícuota de la suspensión proteica precipitada en el momento t y mezcla con el mismo volumen de urea 8 M
 - medición de la extinción de la muestra a 600 nm como medida cualitativa de la dispersión
- 25 En el intervalo de 30 min, la opacidad de la muestra causada por la precipitación se puede anular mediante ajuste de una concentración de urea 4 M. Después de 40 min se conserva la opacidad con este tratamiento. Por tanto, se puede deducir que en este periodo de tiempo en la fase rica en proteína se ha configurado una estructura que es estable en urea 4 M (Figura 5).

Ejemplo 5

- 30 Envasado de β-caroteno en microperlas de R₁₆ y S₁₆

- Para mostrar que las microperlas de R₁₆ y S₁₆ son adecuadas como soporte y coadyuvante de formulación para principios activos, se envasó β-caroteno como ejemplo de principios activos difícilmente solubles en agua en microperlas de R₁₆ y S₁₆. Para esto se mezclaron 500 µl de una solución de R₁₆ o S₁₆ 10 mg/ml en fosfato de potasio 5 mM (pH 8,0) con 50 µl de una solución de β-caroteno 0,9 mg/ml en 10 % de tetrahidrofurano (THF) y 90 % de N-metil-2-pirrolidona (NMP). Después se indujo la formación de microperlas mediante adición de 275 µl de solución de sulfato de amonio 4 M. Durante la formación de las microperlas de R₁₆ y S₁₆ se retiró de la solución el β-caroteno. Las microperlas retiradas mediante centrifugación aparecieron coloreadas en amarillo-naranja. Las microperlas se lavaron con agua, permaneciendo asociado el β-caroteno con las microperlas y liofilizándose a continuación. Después de la liofilización, las microperlas de R₁₆ o S₁₆ cargadas se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (Figuras 6 + 7). En la imagen de microscopía electrónica, las microperlas cargadas (Figuras 6 + 7) mostraron una morfología muy similar a las microperlas no cargadas (Figuras 3 + 4), por lo que es evidente que las microperlas y el β-caroteno forman una fase sólida común.

Ejemplo 6

Absorción de agua por microperlas de R₁₆

- 45 Las microperlas de proteínas repetitivas pueden absorber o ceder agua del o al aire y servir, por tanto, como sustancia reguladora de la humedad, por ejemplo, en aplicaciones cosméticas. Para demostrar esto se secaron al vacío 0,4 g de microperlas de R₁₆ que se habían almacenado previamente a -20 °C, durante 16 h y se determinó el peso seco. El almacenamiento posterior a temperatura ambiente y una humedad del aire del 100 % condujo a un lento aumento de peso del 44 % en el intervalo de 66 días (Figura 8). Mediante un nuevo secado al vacío se alcanzó
- 50 de nuevo el peso seco original.

Ejemplo 7

Formación de gel de R₁₆ y S₁₆

Protocolo:

- disolución de la R₁₆ o S₁₆ liofilizada en tiocianato de guanidinio 6 M con una concentración final de 20 mg/ml
 - 5 - diálisis frente a fosfato de potasio 5 mM pH 7,0 a 4 °C
 - eliminación del precipitado mediante centrifugación durante 30 min a 10000 xg
 - preparación de una solución con fosfato de potasio 2,5 mM pH 7,0, proteína R₁₆ o S₁₆ 10 mg/ml y el 40 % v/v de etanol
 - incubación a temperatura ambiente
- 10 En el intervalo de 4 - 5 días, la solución adopta un estado opaco de tipo gel.

Ejemplo 8

Formación de película de R₁₆ y S₁₆

Protocolo:

- disolución de la R₁₆ o S₁₆ liofilizada en hexafluoroisopropanol con una concentración final de 100 mg/ml
 - 15 - sembrado de 300 µl en una superficie de poliestireno lisa
 - eliminación por evaporación del hexafluoroisopropanol a temperatura ambiente
 - revestimiento de la película de proteína durante 5 min con fosfato de potasio 1 M pH 7,0
 - lavado 2 x con agua
 - secado al aire
- 20 Mediante este tratamiento se producen películas de proteína transparentes insolubles en agua. Las películas secas de R₁₆ son frágiles, mientras que las películas de S₁₆ presentan propiedades flexibles.

Índice de las figuras

- Figura 1 análisis de las proteínas R₁₆ y S₁₆ purificadas. Se preparó una solución acuosa de las proteínas y se separó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida. La detección de las proteínas se realizó a través de una tinción con el colorante azul brillante de Coomassie (C) o a través de inmunotransferencia con un anticuerpo que se une específicamente al marcador peptídico T7 que está unido en el extremo amino a ambas proteínas (WB).
- 25

- Figura 2 análisis de pureza de la R₁₆ y S₁₆ purificada mediante espectroscopía de fluorescencia. R₁₆ y S₁₆ no contienen el aminoácido triptófano, mientras que están presentes tirosinas. Por el contrario, el triptófano está presente con una frecuencia promedio del 1,5 % en proteínas de *E. coli*. Mediante espectroscopía de fluorescencia se puede comprobar selectivamente la presencia de triptófanos en una muestra proteica y, por tanto, de impurezas en preparaciones de R₁₆ o S₁₆. Mientras que mediante luz con la longitud de onda 280 nm (azul) se excitan tanto las tirosinas como los triptófanos, la luz con 295 nm (magenta) conduce exclusivamente a la excitación de triptófano. Las muestras de R₁₆ y S₁₆ muestran una fluorescencia típica de la tirosina, mientras que no son detectables indicios de la presencia de triptófano, lo que señala la elevada pureza de las muestras de proteína.
- 30

- Figura 3 microperlas de R₁₆. Las microperlas se obtuvieron mediante diálisis de una solución de R₁₆ 10 mg/ml en GdmSCN 6 M frente a una solución de fosfato de potasio 1 M pH 7,0 y se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido.
- 35

- Figura 4 microperlas de S₁₆. Las microperlas se obtuvieron mediante diálisis de una solución de S₁₆ 10 mg/ml en GdmSCN 6 M frente a una solución de fosfato de potasio 1 M pH 7,0 y se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido.
- 40

- Figura 5 estabilización de microperlas de S₁₆. Una solución acuosa de S₁₆ 10 mg/ml se precipitó mediante adición de ¼ en volumen de sulfato de amonio en el momento t = 0. Después de momentos definidos se extrajeron alícuotas, se ajustó una concentración de urea 4 M y se midió la extinción a 600 nm como una medida cualitativa de la dispersión y, por tanto, de la presencia de partículas de proteína estables.
- 45

- Figura 6 microperlas de R₁₆ con el 0,8 % de β-caroteno. Las microperlas se obtuvieron mediante adición de una solución de sulfato de amonio 4 M a R₁₆ 10 mg/ml y β-caroteno 0,08 mg/ml en GdmSCN 6 M y se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido.
- 50

- Figura 7 microperlas de S₁₆ con el 0,8 % de β-caroteno. Las microperlas se obtuvieron mediante adición de una solución de sulfato de amonio 4 M a S₁₆ 10 mg/ml y β-caroteno 0,08 mg/ml en GdmSCN 6 M y se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido.

Figura 8 absorción de humedad por microperlas de R₁₆. Se estableció la absorción de agua mediante el aumento de peso de microperlas de R₁₆ con una humedad del aire del 100 %.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> BASF SE	
	<120> Proteínas repetitivas sintéticas, su producción y su uso	
	<130> PF59335	
10	<160> 4	
	<170> PatentIn versión 3.1	
15	<210> 1	
	<211> 1680	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Gen para proteína R16 repetitiva	
	<220>	
25	<221> CDS	
	<222> (1)..(1680)	
	<223>	
	<400> 1	
	atg gct agc atg act ggt gga cag caa atg ggt cgc gga tcc atg ggc 48	
	Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Met Gly	
	1 5 10 15	
	ccg ggt tct agc gcg gct gca gcc gcg gca gct gcg tcc ggc ccg ggt 96	
	Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly	
	20 25 30	
	cag ggc cag ggt cag ggt caa ggc cag ggt ggc cgt cct tct gac acc 144	
	Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr	
	35 40 45	
	tac ggc ccg ggt tct agc gcg gct gca gcc gcg gca gct gcg tcc ggc 192	
	Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly	
	50 55 60	
	ccg ggt cag ggc cag ggt cag ggt caa ggc cag ggt ggc cgt cct tct 240	
	Pro Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gly Arg Pro Ser	
	65 70 75 80	
	gac acc tac ggc ccg ggt tct agc gcg gct gca gcc gcg gca gct gcg 288	
	Asp Thr Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala	
	85 90 95	
	tcc ggc ccg ggt cag ggc cag ggt cag ggt caa ggc cag ggt ggc cgt 336	
	Ser Gly Pro Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gly Arg	
	100 105 110	
	cct tct gac acc tac ggc ccg ggt tct agc gcg gct gca gcc gcg gca 384	
	Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala	
	115 120 125	
30	gct gcg tcc ggc ccg ggt cag ggc cag ggt cag ggt caa ggc cag ggt 432	
	Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly	

ES 2 530 190 T3

130	135	140	
ggc cgt cct tct gac acc tac ggc ccg ggt tct agc gcg gct gca gcc Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala 145 150 155 160			480
gcg gca gct gcg tcc ggc ccg ggt cag ggc cag ggt cag ggt caa ggc Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly 165 170 175			528
cag ggt ggc cgt cct tct gac acc tac ggc ccg ggt tct agc gcg gct Gln Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala 180 185 190			576
gca gcc gcg gca gct gcg tcc ggc ccg ggt cag ggc cag ggt cag ggt Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly 195 200 205			624
caa ggc cag ggt ggc cgt cct tct gac acc tac ggc ccg ggt tct agc Gln Gly Gln Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Pro Gly Ser Ser 210 215 220			672
gcg gct gca gcc gcg gca gct gcg tcc ggc ccg ggt cag ggc cag ggt Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly 225 230 235 240			720
cag ggt caa ggc cag ggt ggc cgt cct tct gac acc tac ggc ccg ggt Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Pro Gly 245 250 255			768
tct agc gcg gct gca gcc gcg gca gct gcg tcc ggc ccg ggt cag ggc Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gly 260 265 270			816
cag ggt cag ggt caa ggc cag ggt ggc cgt cct tct gac acc tac ggc Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly 275 280 285			864
ccg ggt tct agc gcg gct gca gcc gcg gca gct gcg tcc ggc ccg ggt Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly 290 295 300			912
cag ggc cag ggt cag ggt caa ggc cag ggt ggc cgt cct tct gac acc Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Arg Pro Ser Asp Thr 305 310 315 320			960
tac ggc ccg ggt tct agc gcg gct gca gcc gcg gca gct gcg tcc ggc Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly 325 330 335			1008
ccg ggt cag ggc cag ggt cag ggt caa ggc cag ggt ggc cgt cct tct Pro Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Arg Pro Ser 340 345 350			1056
gac acc tac ggc ccg ggt tct agc gcg gct gca gcc gcg gca gct gcg Asp Thr Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala 355 360 365			1104
tcc ggc ccg ggt cag ggc cag ggt cag ggt caa ggc cag ggt ggc cgt Ser Gly Pro Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Arg 370 375 380			1152

ES 2 530 190 T3

cct tct gac acc tac ggc ccg ggt tct agc gcg gct gca gcc gcg gca	1200
Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala	
385 390 395 400	
gct gcg tcc ggc ccg ggt cag ggc cag ggt cag ggt caa ggc cag ggt	1248
Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly	
405 410 415	
ggc cgt cct tct gac acc tac ggc ccg ggt tct agc gcg gct gca gcc	1296
Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala	
420 425 430	
gcg gca gct gcg tcc ggc ccg ggt cag ggc cag ggt cag ggt caa ggc	1344
Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly	
435 440 445	
cag ggt ggc cgt cct tct gac acc tac ggc ccg ggt tct agc gcg gct	1392
Gln Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala	
450 455 460	
gca gcc gcg gca gct gcg tcc ggc ccg ggt cag ggc cag ggt cag ggt	1440
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly	
465 470 475 480	
caa ggc cag ggt ggc cgt cct tct gac acc tac ggc ccg ggt tct agc	1488
Gln Gly Gln Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Pro Gly Ser Ser	
485 490 495	
gcg gct gca gcc gcg gca gct gcg tcc ggc ccg ggt cag ggc cag ggt	1536
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gly Gln Gly	
500 505 510	
cag ggt caa ggc cag ggt ggc cgt cct tct gac acc tac ggc ccg ggt	1584
Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Pro Gly	
515 520 525	
tct agc gcg gct gca gcc gcg gca gct gcg tcc ggc ccg ggt cag ggc	1632
Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gly	
530 535 540	
cag ggt cag ggt caa ggc cag ggt ggc cgt cct tct gac acc tac ggc	1680
Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly	
545 550 555 560	

<210> 2

<211> 560

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Gen para proteína R16 repetitiva

<400> 2

Met	Ala	Ser	Met	Thr	Gly	Gly	Gln	Gln	Met	Gly	Arg	Gly	Ser	Met	Gly
1				5					10					15	

Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly

ES 2 530 190 T3

20										25					30				
Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Asp	Thr				
		35						40				45							
Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Gly				
	50					55						60							
Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser				
65					70					75					80				
Asp	Thr	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala				
				85					90					95					
Ser	Gly	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gly	Arg				
			100					105						110					
Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala				
		115					120						125						
Ala	Ala	Ser	Gly	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly				
	130					135					140								
Gly	Arg	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala				
145					150					155					160				
Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Gly	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly				
				165					170					175					
Gln	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala				
			180					185					190						
Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Gly	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly				
		195					200					205							
Gln	Gly	Gln	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser				
	210					215					220								
Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Gly	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly				
225					230					235					240				
Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Gly	Pro	Gly				
				245					250					255					
Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Gly	Pro	Gly	Gln	Gly				
		260						265					270						

ES 2 530 190 T3

Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly
 275 280 285
 Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly
 290 295 300
 Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr
 305 310 315 320
 Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly
 325 330 335
 Pro Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gly Arg Pro Ser
 340 345 350
 Asp Thr Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 355 360 365
 Ser Gly Pro Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gly Arg
 370 375 380
 Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 385 390 395 400
 Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly
 405 410 415
 Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala
 420 425 430
 Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly
 435 440 445
 Gln Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala
 450 455 460
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly
 465 470 475 480
 Gln Gly Gln Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Pro Gly Ser Ser
 485 490 495
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gly Gln Gly
 500 505 510

Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Pro Gly
515 520 525

Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gly
530 535 540

Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly
545 550 555 560

<210> 3
<211> 1920
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Gen para proteína S16 repetitiva

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1920)
<223>

<400> 3

atg gct agc atg act ggt gga cag caa atg ggt cgc gga tcc atg ggt	48
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Met Gly	
1 5 10 15	
tct gcg gct gca gcc gcg gca gct gcg ggt ccg ggc ggt ggc aac ggt	96
Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gly Gly Asn Gly	
20 25 30	
ggc cgt ccg tct gac acc tac ggt gcg ccg ggt ggc ggt aac ggt ggc	144
Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly	
35 40 45	
cgt cct tct tcc tct tac ggt tct gcg gct gca gcc gcg gca gct gcg	192
Arg Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala	
50 55 60	
ggt ccg ggc ggt ggc aac ggt ggc cgt ccg tct gac acc tac ggt gcg	240
Gly Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Ala	
65 70 75 80	
ccg ggt ggc ggt aac ggt ggc cgt cct tct tcc tct tac ggt tct gcg	288
Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Ser Ala	
85 90 95	
gct gca gcc gcg gca gct gcg ggt ccg ggc ggt ggc aac ggt ggc cgt	336
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg	
100 105 110	
ccg tct gac acc tac ggt gcg ccg ggt ggc ggt aac ggt ggc cgt cct	384
Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro	
115 120 125	
tct tcc tct tac ggt tct gcg gct gca gcc gcg gca gct gcg ggt ccg	432

ES 2 530 190 T3

Ser	Ser	Ser	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	
130						135						140				
ggc	ggt	ggc	aac	ggt	ggc	cgt	ccg	tct	gac	acc	tac	ggt	gcg	ccg	ggt	480
Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ala	Pro	Gly	
145					150					155					160	
ggc	ggt	aac	ggt	ggc	cgt	cct	tct	tcc	tct	tac	ggt	tct	gcg	gct	gca	528
Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Ser	Ser	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	
				165					170					175		
gcc	gcg	gca	gct	gcg	ggt	ccg	ggc	ggt	ggc	aac	ggt	ggc	cgt	ccg	tct	576
Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	
				180				185						190		
gac	acc	tac	ggt	gcg	ccg	ggt	ggc	ggt	aac	ggt	ggc	cgt	cct	tct	tcc	624
Asp	Thr	Tyr	Gly	Ala	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Ser	
		195				200						205				
tct	tac	ggt	tct	gcg	gct	gca	gcc	gcg	gca	gct	gcg	ggt	ccg	ggc	ggt	672
Ser	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	
		210				215						220				
ggc	aac	ggt	ggc	cgt	ccg	tct	gac	acc	tac	ggt	gcg	ccg	ggt	ggc	ggt	720
Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ala	Pro	Gly	Gly	Gly	
225					230					235					240	
aac	ggt	ggc	cgt	cct	tct	tcc	tct	tac	ggt	tct	gcg	gct	gca	gcc	gcg	768
Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Ser	Ser	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	
				245					250					255		
gca	gct	gcg	ggt	ccg	ggc	ggt	ggc	aac	ggt	ggc	cgt	ccg	tct	gac	acc	816
Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Asp	Thr	
			260					265					270			
tac	ggt	gcg	ccg	ggt	ggc	ggt	aac	ggt	ggc	cgt	cct	tct	tcc	tct	tac	864
Tyr	Gly	Ala	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Ser	Ser	Tyr	
		275					280					285				
ggt	tct	gcg	gct	gca	gcc	gcg	gca	gct	gcg	ggt	ccg	ggc	ggt	ggc	aac	912
Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Asn	
		290				295					300					
ggt	ggc	cgt	ccg	tct	gac	acc	tac	ggt	gcg	ccg	ggt	ggc	ggt	aac	ggt	960
Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ala	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	
305					310					315					320	
ggc	cgt	cct	tct	tcc	tct	tac	ggt	tct	gcg	gct	gca	gcc	gcg	gca	gct	1008
Gly	Arg	Pro	Ser	Ser	Ser	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	
				325					330					335		
gcg	ggt	ccg	ggc	ggt	ggc	aac	ggt	ggc	cgt	ccg	tct	gac	acc	tac	ggt	1056
Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Gly	
			340					345					350			
gcg	ccg	ggt	ggc	ggt	aac	ggt	ggc	cgt	cct	tct	tcc	tct	tac	ggt	tct	1104
Ala	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Ser	Ser	Tyr	Gly	Ser	
		355					360					365				
gcg	gct	gca	gcc	gcg	gca	gct	gcg	ggt	ccg	ggc	ggt	ggc	aac	ggt	ggc	1152
Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	

ES 2 530 190 T3

370	375	380	
cgt ccg tct gac acc tac ggt gcg ccg ggt ggc ggt aac ggt ggc cgt Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Asn Gly Gly Arg 385 390 395 400	1200		
cct tct tcc tct tac ggt tct gcg gct gca gcc gcg gca gct gcg ggt Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly 405 410 415	1248		
ccg ggc ggt ggc aac ggt ggc cgt ccg tct gac acc tac ggt gcg ccg Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Ala Pro 420 425 430	1296		
ggt ggc ggt aac ggt ggc cgt cct tct tcc tct tac ggt tct gcg gct Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Ser Ala Ala 435 440 445	1344		
gca gcc gcg gca gct gcg ggt ccg ggc ggt ggc aac ggt ggc cgt ccg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro 450 455 460	1392		
tct gac acc tac ggt gcg ccg ggt ggc ggt aac ggt ggc cgt cct tct Ser Asp Thr Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser 465 470 475 480	1440		
tcc tct tac ggt tct gcg gct gca gcc gcg gca gct gcg ggt ccg ggc Ser Ser Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly 485 490 495	1488		
ggt ggc aac ggt ggc cgt ccg tct gac acc tac ggt gcg ccg ggt ggc Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Ala Pro Gly Gly 500 505 510	1536		
ggt aac ggt ggc cgt cct tct tcc tct tac ggt tct gcg gct gca gcc Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala 515 520 525	1584		
gcg gca gct gcg ggt ccg ggc ggt ggc aac ggt ggc cgt ccg tct gac Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Asp 530 535 540	1632		
acc tac ggt gcg ccg ggt ggc ggt aac ggt ggc cgt cct tct tcc tct Thr Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Ser Ser 545 550 555 560	1680		
tac ggt tct gcg gct gca gcc gcg gca gct gcg ggt ccg ggc ggt ggc Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gly Gly 565 570 575	1728		
aac ggt ggc cgt ccg tct gac acc tac ggt gcg ccg ggt ggc ggt aac Asn Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn 580 585 590	1776		
ggt ggc cgt cct tct tcc tct tac ggt tct gcg gct gca gcc gcg gca Gly Gly Arg Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ala 595 600 605	1824		
gct gcg ggt ccg ggc ggt ggc aac ggt ggc cgt ccg tct gac acc tac Ala Ala Gly Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr 610 615 620	1872		
ggt gcg ccg ggt ggc ggt aac ggt ggc cgt cct tct tcc tct tac ggc Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Ser Ser Tyr Gly 625 630 635 640	1920		

<210> 4
 <211> 640
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Gen para proteína S16 repetitiva

<400> 4

```

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Met Gly
1          5          10          15

Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gly Gly Asn Gly
20          25          30

Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly
35          40          45

Arg Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
50          55          60

Gly Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Ala
65          70          75          80

Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Ser Ala
85          90          95

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg
100         105         110

Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro
115         120         125

Ser Ser Ser Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro
130         135         140

Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Ala Pro Gly
145         150         155         160

Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Ser Ala Ala Ala
165         170         175

Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser
    
```

ES 2 530 190 T3

180						185						190									
Asp	Thr	Tyr	Gly	Ala	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Ser						
		195					200					205									
Ser	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Gly						
	210					215						220									
Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ala	Pro	Gly	Gly	Gly						
225					230					235					240						
Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Ser	Ser	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala						
				245					250						255						
Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Asp	Thr						
			260					265						270							
Tyr	Gly	Ala	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Ser	Ser	Tyr						
		275					280						285								
Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn						
	290					295					300										
Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ala	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly						
305					310					315					320						
Gly	Arg	Pro	Ser	Ser	Ser	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala						
				325					330						335						
Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Gly						
			340					345					350								
Ala	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Ser	Ser	Tyr	Gly	Ser						
		355				360						365									
Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly						
		370				375						380									
Arg	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ala	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Arg						
385					390					395					400						
Pro	Ser	Ser	Ser	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly						
				405					410						415						
Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ala	Pro						
			420					425					430								

ES 2 530 190 T3

Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Ser Ala Ala
 435 440 445
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro
 450 455 460
 Ser Asp Thr Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser
 465 470 475 480
 Ser Ser Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly
 485 490 495
 Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Ala Pro Gly Gly
 500 505 510
 Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala
 515 520 525
 Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Asp
 530 535 540
 Thr Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Ser Ser
 545 550 555 560
 Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gly Gly
 565 570 575
 Asn Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn
 580 585 590
 Gly Gly Arg Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 595 600 605
 Ala Ala Gly Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr Tyr
 610 615 620
 Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Ser Ser Tyr Gly
 625 630 635 640

REIVINDICACIONES

1. Proteína repetitiva con unidades de repetición que contiene la unidad de repetición PGSSAAAAAASGPGQGQGQGQGGRPSDTYG.
- 5 2. Proteína repetitiva con unidades de repetición que contiene la unidad de repetición SAAAAAAGPGGGNGGRPSDTYGAPGGGNGGRPSSSYG.
3. Proteína repetitiva de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** contiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 2.
4. Proteína repetitiva de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada por que** contiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 4.
- 10 5. Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína repetitiva de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4.
6. Un organismo huésped que contiene una secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 5.
7. Procedimiento para la producción de una proteína repetitiva de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4, **caracterizado por que** la proteína la produce un organismo huésped de manera correspondiente a la reivindicación 6 y a continuación se aísla.
- 15 8. El uso de una proteína repetitiva de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4 en cosmética.
9. El uso de una proteína repetitiva de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4 para la formulación de principios activos y sustancias de efecto.
- 10 10. El uso de una proteína repetitiva de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4 para el acabado de papel, cuero y materiales textiles.
11. El uso de una proteína repetitiva de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4 para el revestimiento de superficies.
12. El uso de una proteína repetitiva de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4 en alimentación humana y animal.
- 25

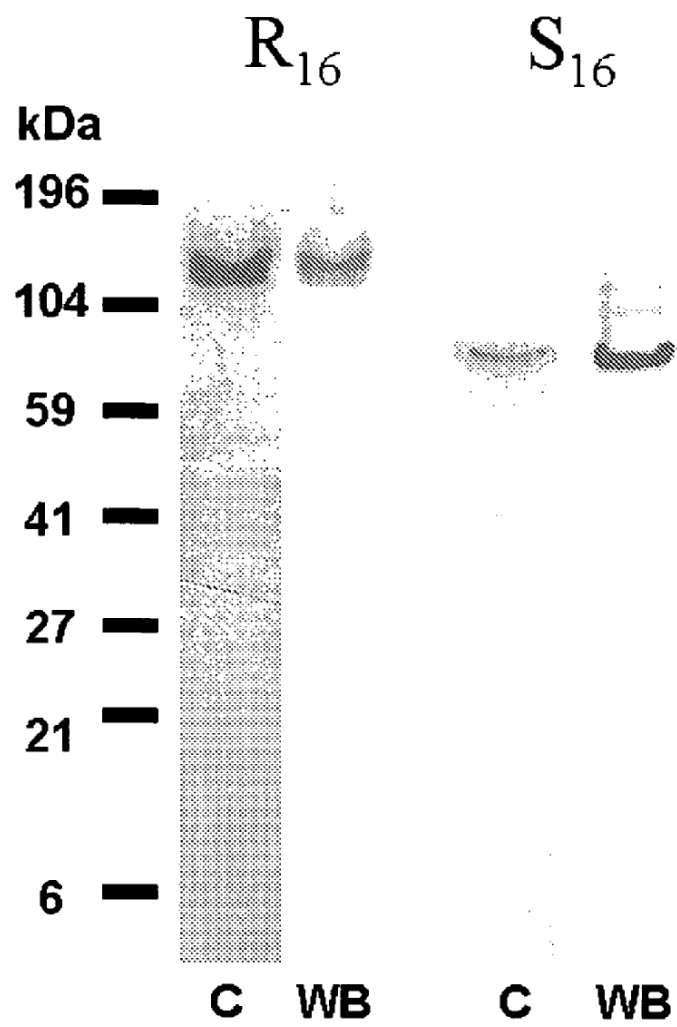


Fig. 1

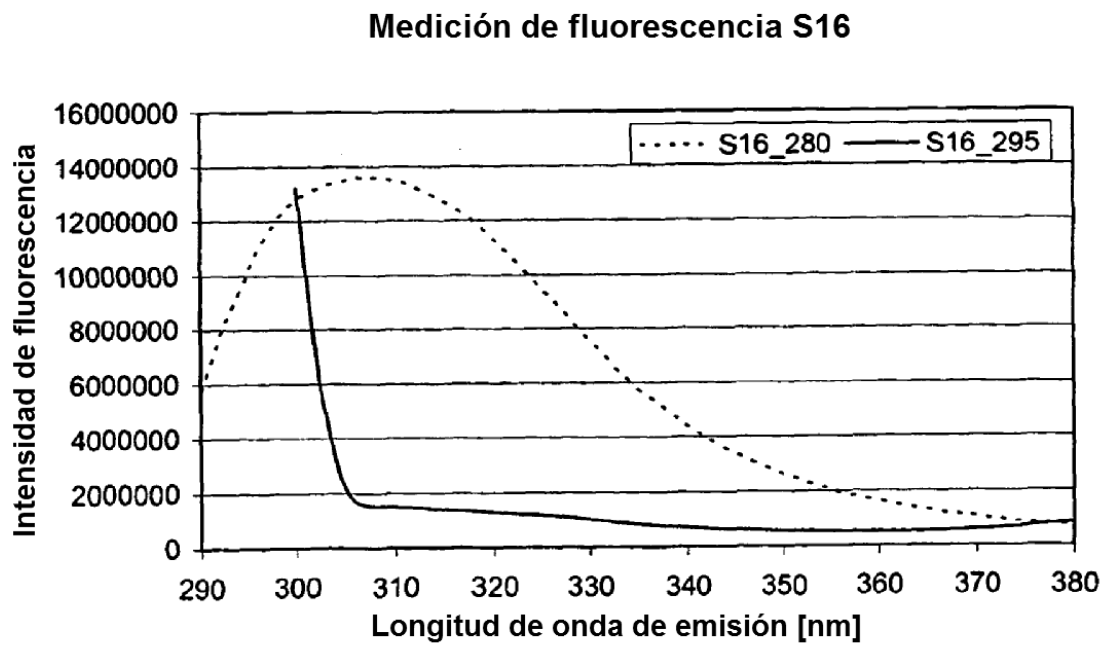
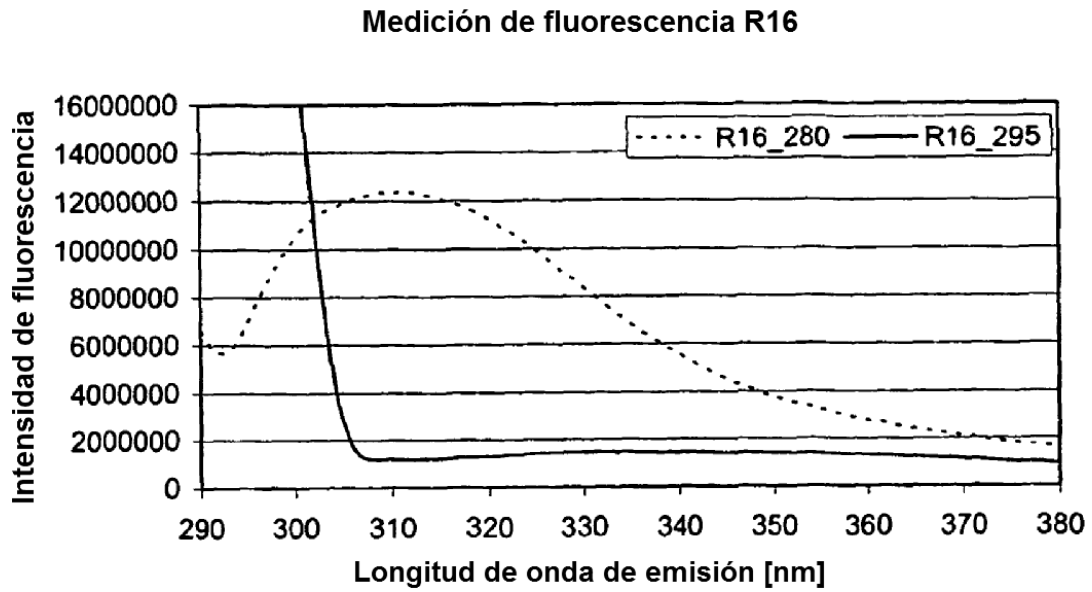


Fig. 2

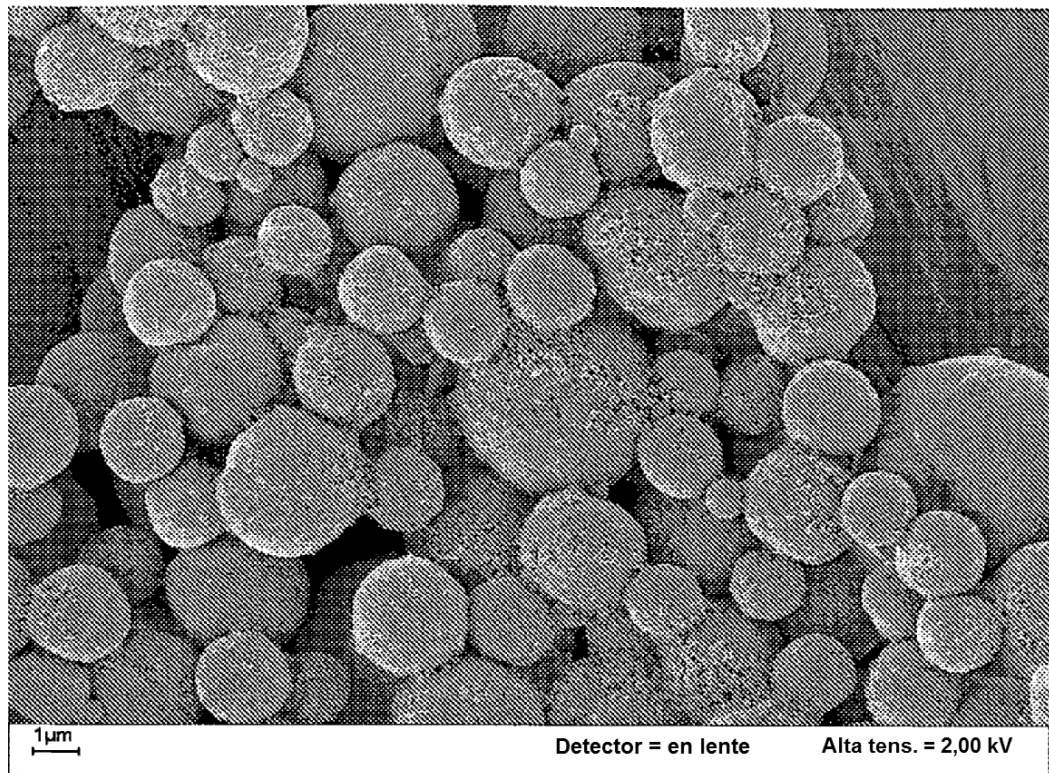


Fig. 3

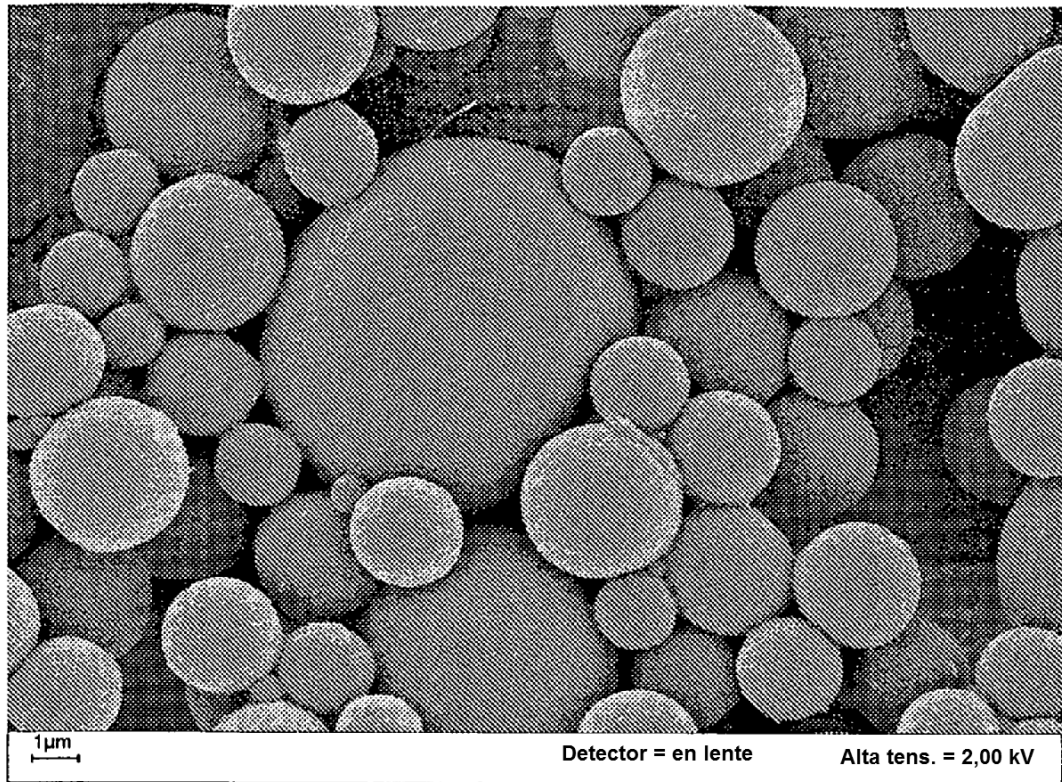


Fig. 4

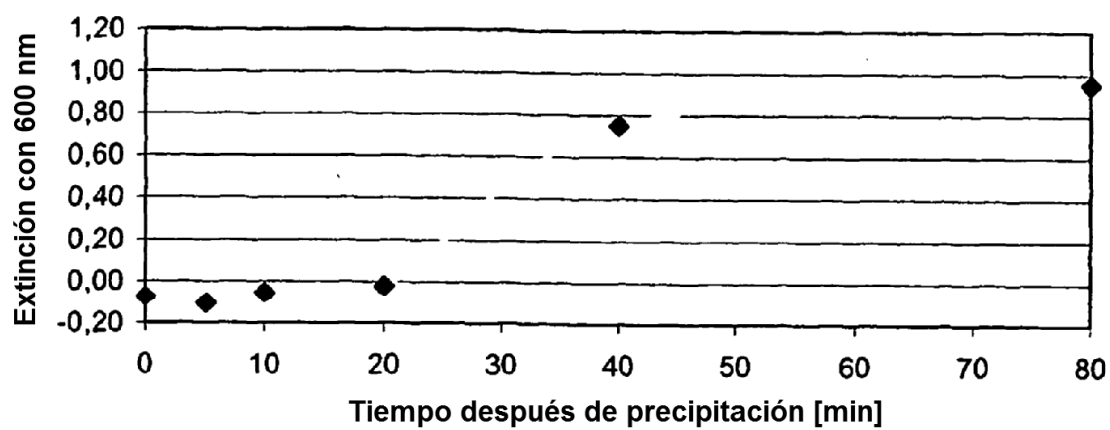


Fig. 5

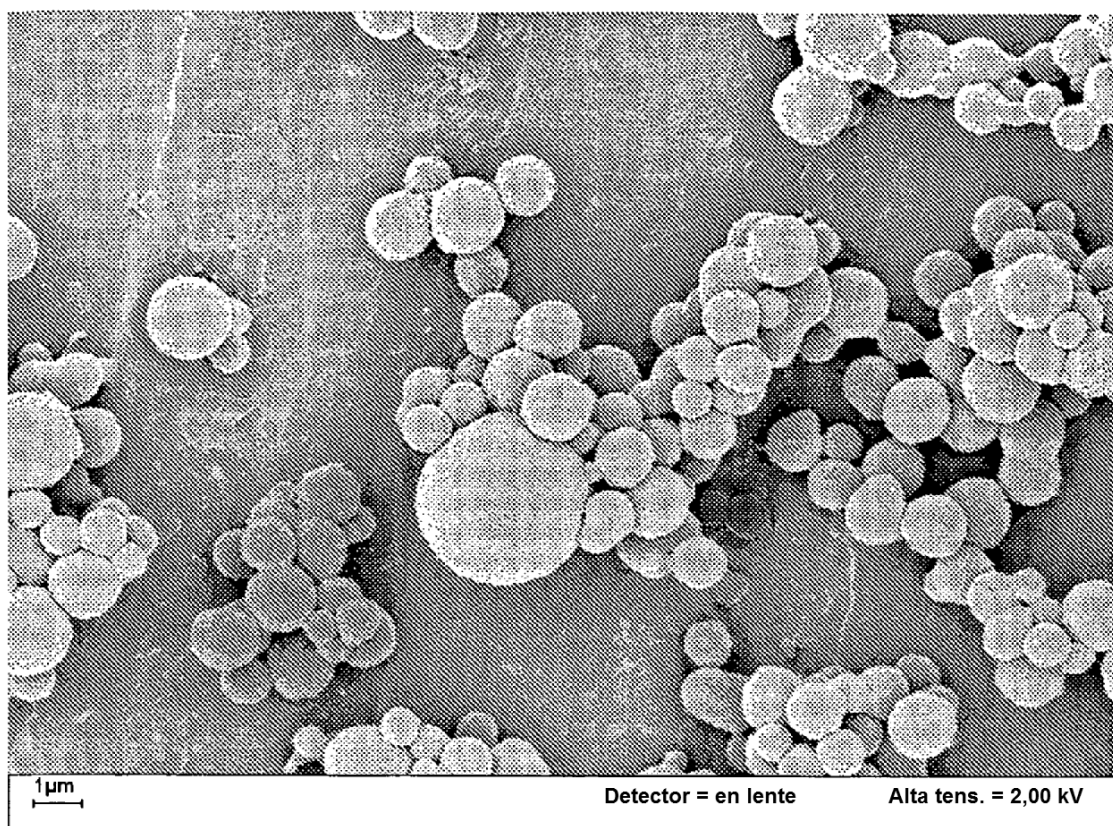


Fig. 6

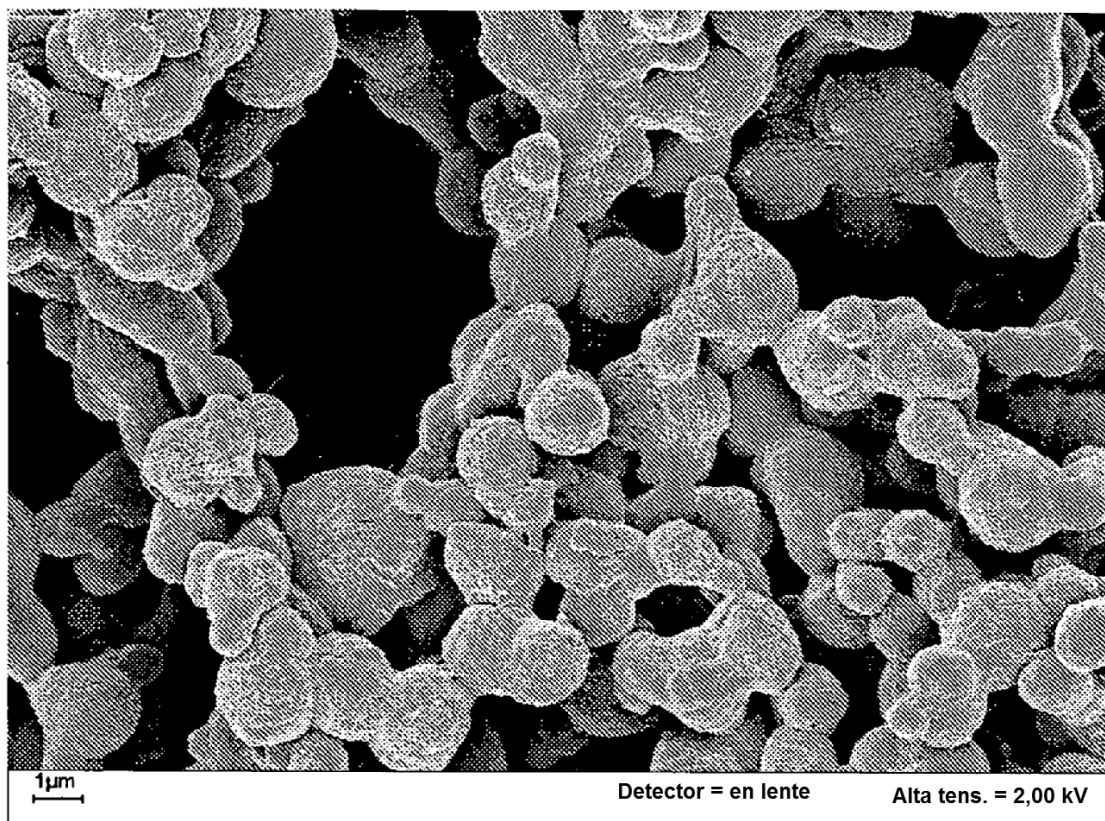


Fig. 7

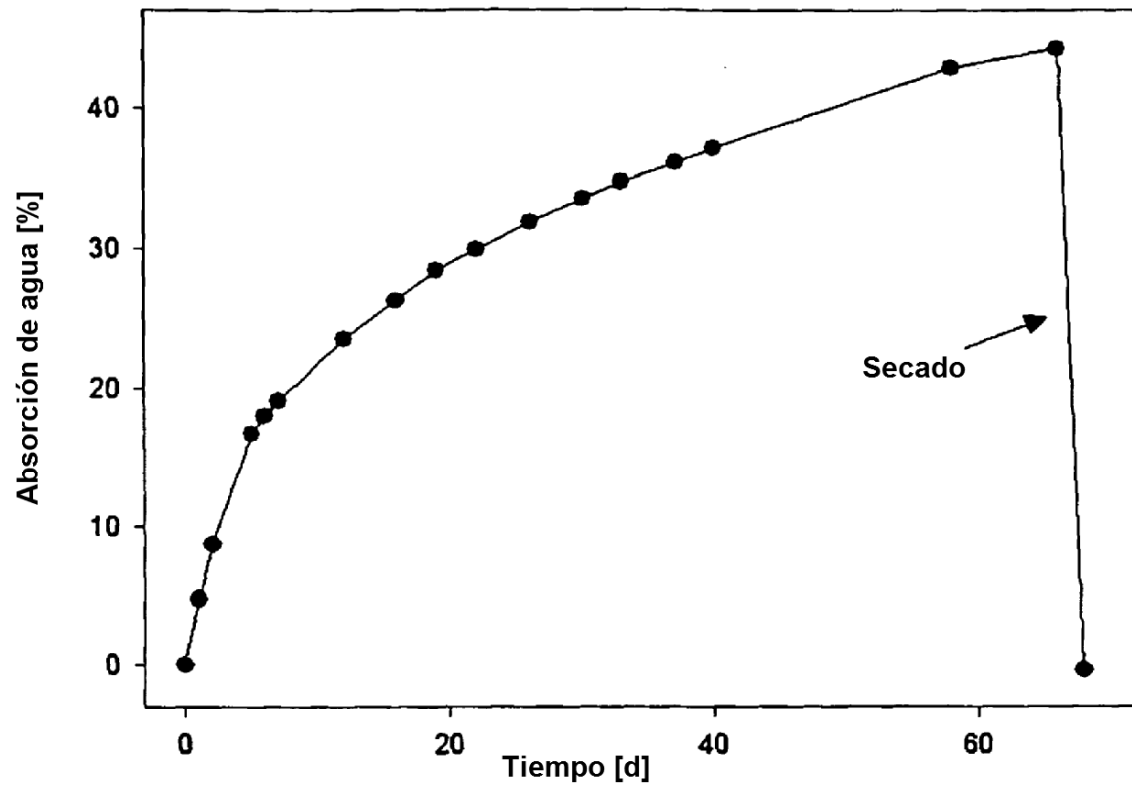


Fig. 8