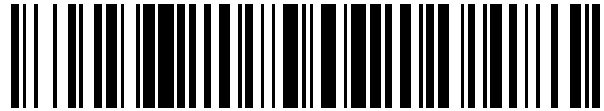


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 802**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/22** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2013 E 13700913 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2807179**

54 Título: **Uso de lisozima como marcador**

30 Prioridad:

**23.01.2012 EP 12152095**  
**23.01.2012 US 201261589408 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.09.2016**

73 Titular/es:

**MORPHOSYS AG (100.0%)**  
**Lena-Christ-Strasse 48**  
**82152 Martinsried/Planegg, DE**

72 Inventor/es:

**HAERTLE, STEFAN;**  
**JAEGER, SEBASTIAN y**  
**DAUBERT, DANIELA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 582 802 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

Uso de lisozima como marcador

5 **Antecedentes de la invención**

10 La expresión y purificación de polipéptidos y proteínas recombinantes es un proceso rutinario en la investigación biotecnológica. En general, el proceso de purificación comprende la expresión de un polipéptido deseado en células procariontas o EUCARIOTAS, SEGUIDA por la separación de otras partículas no proteináceas y proteináceas de la célula hospedadora. Para ello se utilizan diversos tipos de cromatografía para purificar la molécula deseada, v.g., por tamaño, carga o hidrofobicidad.

15 Una estrategia específica adicional consiste en utilizar un marcador que se fusiona con el polipéptido de interés. Marcadores específicos pueden utilizarse para soportar el plegamiento, solubilidad, estabilidad y expresión del polipéptido de interés, mientras que otros marcadores se utilizan principalmente para purificación. Por tanto, el polipéptido deseado se expresa como constructo de fusión en células procariontas o eucariotas y puede purificarse por la vía del marcador fusionado que es detectado por un resto de fijación de antígeno específico. Esta clase de estrategia de purificación se conoce como cromatografía de afinidad.

20 Un marcador de purificación utilizado en la comunidad científica es, v.g., el marcador His. En este caso, los polipéptidos que se fusionan con un marcador His pueden separarse utilizando, v.g. una columna de purificación con iones níquel o cobalto inmovilizados que tienen afinidad fuerte para el marcador His. La proteína se libera luego de la columna en un proceso de elución que implica imidazol, que compite con los marcadores His por la fijación de níquel o cobalto. Ejemplos adicionales son el marcador Flag y el marcador Strep que se fusionan ambos al polipéptido de interés y sirven como antígeno para restos de fijación de antígeno específicos del marcador respectivo como v.g. anticuerpos o Estreptactina, respectivamente. Estos restos de fijación (v.g., anticuerpos, estreptactina o iones metálicos) que se utilizan para purificación (v.g. por el marcador Flag, el marcador Strep o el marcador His, respectivamente) pueden inmovilizarse v.g. en un sustrato sólido (v.g. membranas, cuentas). Tales sustratos sólidos acoplados con restos de fijación específicos para marcadores definidos pueden utilizarse para capturar fácilmente el polipéptido marcado a partir de muestras complejas como lisados o medios acondicionados. Sin embargo, los marcadores Flag, Strep e His que son péptidos cortos a veces no están accesibles dentro de la estructura tridimensional de polipéptidos o proteínas específicos y por tanto no son adecuados para purificación. Adicionalmente, la purificación a partir de sobrenadantes de cultivo de células de mamífero por el marcador Strep se ve afectada debido a las altas concentraciones de biotina de la mayoría de los medios.

35 Ciertos marcadores globulares mayores pueden soportar el plegamiento, la solubilidad y la expresión de polipéptidos difíciles de expresar, tales como proteínas. La mayoría de las tecnologías de fusión de genes disponibles se desarrollaron para expresión de *E. coli* y purificación a partir de lisados brutos. Ejemplos de tales proteínas de fusión son MBP (proteína de fijación de maltosa), GST (Glutation-S-Transferasa) y SUMO (proteína pequeña modificadora de ubiquitina; véase por ejemplo WO 03/057174).

40 El marcador SUMO ha sido diseñado originalmente para expresión en procariontas (v.g., SUMOpro™ Expresión Kit, <http://www.lifesensors.com>), y fue desarrollado más tarde para expresión en mamíferos (SUMOstar™ Expresión Kit, <http://www.lifesensors.com>). SUMO funciona a la vez como una chaperona y como un iniciador del plegamiento de proteínas para mejorar la solubilidad y el nivel de expresión de la proteína de interés. Por utilización de una desumoliasa, el marcador SUMO, fusionado al término N de la proteína de interés, puede separarse dando como resultado la producción del término N nativo de la proteína. La fusión del marcador SUMO al término C de la proteína de interés no permite la separación del marcador de fusión. La purificación de la proteína diana fusionada al marcador SUMO no utiliza el marcador SUMO pero requiere la aplicación de un marcador de purificación tal como el marcador His.

50 Una alternativa para la expresión en mamíferos es el uso del marcador Fc que comprende la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3 de la IgG1 humana. El marcador Fc se utiliza para soportar la expresión, el plegamiento y la secreción de polipéptidos específicos y se utiliza también en paralelo como marcador para su purificación. Si bien los marcadores His y Flag son péptidos cortos con peso molecular bajo y muy adecuados para la expresión de polipéptidos y proteínas solubles, el marcador Fc es un polipéptido de más de 200 aminoácidos y soporta la expresión de proteínas hidrófobas específicas menos solubles. Sin embargo, la porción Fc relativamente grande forma agregados con puentes disulfuro, dando como resultado formas dímeras o multímeras de la proteína de interés aislada y purificada.

60 Otras alternativas comunes son la GST (glutación-S-transferasa) y MBP (proteína de fijación de maltosa) que se fijan a glutación y maltosa, respectivamente. Ambos marcadores tienen peso molecular alto (> 25 kDa) y aumentan significativamente la solubilidad y estabilidad de un polipéptido o proteína de interés. Sin embargo, ambos sistemas de fusión de genes no pueden utilizarse para purificación de proteínas a partir de proteínas secretadas de sobrenadantes de cultivo de células de mamífero acondicionadas como ingredientes del medio que previene la

fijación del marcador de fusión a su pareja de fijación, es decir glutatión o maltosa. Adicionalmente, ambos marcadores de fusión tienen cierta tendencia a agregarse en sistemas de expresión de mamífero y tienden también a formar cuerpos de inclusión.

5 Por tanto, si bien v.g. el marcador Fc no es adecuado para la expresión y purificación de polipéptidos y proteínas monómeros, todos los restantes marcadores disponibles presentan ventajas e inconvenientes específicos y no son adecuados para la expresión y/o purificación de ciertos polipéptidos o proteínas específicos. Considerada en su conjunto, la calidad de expresión y purificación depende no sólo de la naturaleza del polipéptido o proteína de interés, sino también del marcador respectivo que se utilice. Así, la combinación de un marcador específico y un polipéptido o proteína específico de interés es crucial para los resultados óptimos, pero difícilmente predecible. Por consiguiente, existe una necesidad inagotable de marcadores nuevos y convenientes que permitan la expresión y purificación o mejoren la calidad de polipéptidos y proteínas recombinantes problemáticos específicos. Los métodos descritos en la presente solicitud proporcionan una vía eficiente para expresar y purificar polipéptidos o proteínas por utilización de lisozima como marcador.

15

### Sumario de la Invención

La presente descripción proporciona un método para expresar y purificar polipéptidos y proteínas monómeros conforme a la reivindicación 1.

20

La presente descripción hace posible la purificación de polipéptidos y proteínas que no pueden expresarse y purificarse por utilización de otros marcadores conocidos en la técnica. En la presente descripción, se da a conocer el uso de lisozima como pareja de fusión. Adicionalmente, se describen métodos de purificación para aislar polipéptidos y proteínas marcados con lisozima por la vía de anticuerpos específicos de lisozima. El uso de lisozima como marcador dio como resultado permitir la expresión de polipéptidos y proteínas monómeros específicos o tasas de expresión mejoradas de polipéptidos y proteínas en comparación con otros marcadores que son estado actual en la técnica. El plegamiento inadecuado, la solubilidad y expresión bajas, la pérdida de actividad así como la agregación de los polipéptidos aislados, que conduce a la formación de proteínas multímeras no deseadas e indeseables pueden soslayarse por utilización de lisozima como pareja de fusión. Además, otra ventaja de la utilización de lisozima es su actividad antibacteriana que permite la reducción o evitación de antibióticos que usualmente son necesarios para el proceso de cultivo de células y expresión de proteínas en condiciones estériles.

25

30

La lisozima (EC 3.2.1.17), conocida también como muramidasa o N-acetilmuramida-glicanhidrolasa tiene un peso molecular de aproximadamente 14,6 kDa y cataliza la hidrólisis de los enlaces 1,4-beta entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina en un peptidoglicano y entre residuos N-acetil-D-glucosamina en las quitodextrinas.

35

La lisozima es producida típicamente como mecanismo de defensa contra bacterias por muchos organismos, tales como virus, plantas, insectos, aves, reptiles y mamíferos. La enzima causa la hidrólisis de las paredes de la célula bacteriana por escisión de los enlaces glicosídicos de peptidoglicano, una molécula estructural importante en las bacterias. Después de tener sus paredes celulares debilitadas por la acción de la lisozima, las células bacterianas se lisan como resultado de la presión osmótica.

40

La lisozima ha sido clasificada en cinco familias de glicosido-hidrolasa (GH) diferentes (Cazy, <http://www.cazy.org>): lisozima de clara de huevo de gallina (GH22), lisozima de clara de huevo de ganso (GH23), lisozima del bacteriófago T4 (GH24), proteína flagelar de esfingomonas (GH73) y lisozimas de Chalaropsis (HG25). Se ha encontrado que la familia de lisozimas GH25 no está relacionada estructuralmente con las otras familias de lisozima.

45

El uso de lisozima ha sido sugerido en alimentación animal (véanse por ejemplo WO 00/21381 y WO 04/026334), en la producción de queso (véase por ejemplo WO 05/080559), para la conservación de alimentos (Hughey y Johnson (1987) Appl Environ Microbiol 53:2165), como detergentes (véase por ejemplo US No. de Serie 07/248273 y EP 0425016), en el cuidado oral (véase por ejemplo US No. de Serie 06/279536, WO 04/017988 y WO 08/124764), en cosmetología y dermatología, contracepción, urología, y ginecología (véase por ejemplo WO 08/124764). La lisozima de clara de huevo de gallina es un producto de lisozima disponible comercialmente. Se conocen también lisozimas aisladas de fuentes microbianas pero también de mamífero. Sin embargo, no existe ningún informe público de expresión de lisozimas recombinantes en cultivos de células de mamífero o la expresión de péptidos o proteínas fusionados a lisozima en cultivo de células.

50

55

El documento US No. de Serie 10/024597 y WO 01/00855 dan a conocer la expresión de péptidos pequeños fusionados a lisozima en leche de animales transgénicos. Dado que la lisozima es una proteína de leche expresada naturalmente, los péptidos fusionados a lisozima se expresaron y los péptidos de fusión de lisozima básicos pudieron purificarse a partir de las proteínas predominantemente ácidas en la leche. Sin embargo, se describió que las células de glándulas mamarias de mamífero no eran aptas para producir proteínas de leche, tales como lisozima, en cultivo celular. (Streuli y Bissell (1990) The Journal of Cell Biology, volumen 110, abril de 1990, 1405-1415). Adicionalmente, la expresión proteínica de proteínas de leche en animales transgénicos no es predecible para expresión de culti-

60

65

vo de células, y los hallazgos respectivos no pueden transferirse a sistemas de cultivo de células (véase v.g. Furth et al., (1991), 19 Nucleic Acids Res. 6205 y Whitelaw et al., (1991); 1 Transgenic Res. 3).

5 En otra solicitud, Kobilka et al. utilizaron lisozima como estabilizador para receptores acoplados a proteína G (GPCRs) a fin de permitir la cristalización de GPCRs. Para ello, se inserta lisozima T4 en uno de los bucles intracelulares del GPCR respectivo expresado en células de insecto (véase WO 09/051769).

10 La presente descripción proporciona un método para la producción y purificación de proteínas, péptidos y/o aminoácidos aislados en una célula hospedadora, en donde dichas proteínas, péptidos y/o aminoácidos se fusionan a lisozima, comprendiendo dicho método

- (a) cultivar dicha célula hospedadora en condiciones que permiten la expresión de un gen que codifica una proteína de interés, y,
- (b) aislamiento de dichas proteínas, péptidos o aminoácidos.

15 La presente descripción proporciona también células hospedadoras y vectores para utilizar en los métodos descritos en esta memoria. La presente descripción proporciona también vasijas de reacción, tales como fermentadores, para uso en los métodos de la presente invención. La presente invención proporciona también un kit, que comprende

- (a) un vector conforme a la presente invención,
- (b) un anticuerpo específico para lisozima, y
- 20 (c) opcionalmente, instrucciones para utilizar dichos vector y anticuerpo conforme a los métodos descritos en esta memoria.

### Descripción de las Figuras

25 Figura 1: Vector utilizado para expresión de la proteína de fusión de lisozima. Se subclonó una secuencia codificante de lisozima de pollo en la cadena principal del vector pMax.

Figura 2 A-C: Secuencia de nucleótidos codificante del constructo de expresión pMax entero (SEQ ID NO: 15) que comprende lisozima de pollo (subrayada).

### 30 Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para mejora de la expresión de un polipéptido o proteína de interés, con una longitud de al menos 110 aminoácidos, por expresión de dicho polipéptido o proteína de interés como proteína de fusión que comprende lisozima.

35 En una realización de la descripción, el polipéptido o proteína de interés es un polipéptido o proteína monómero de interés. En una realización adicional, el polipéptido o proteína de interés tiene una composición monómera fisiológica. En otra realización, el polipéptido o proteína de interés tiene una composición monómera fisiológica y actúa como un monómero. En otra realización, la proteína de interés es un receptor de la superficie celular que se expresa fisiológicamente como un monómero. En una realización adicional, la proteína de interés es una proteína soluble que se expresa fisiológicamente como monómero.

45 En una realización de la descripción, la proteína de fusión comprende un polipéptido o proteína de interés y lisozima en donde la lisozima está fusionada al término N del polipéptido o proteína de interés. En una realización de la descripción, la proteína de fusión comprende un polipéptido o proteína de interés y lisozima, en donde la lisozima está fusionada al término C del polipéptido o proteína de interés.

50 En una realización, la descripción se refiere a un método para mejorar la expresión de un polipéptido o proteína de interés, por expresión de dicho polipéptido o proteína de interés como una proteína de fusión que comprende lisozima, en donde el rendimiento de dicha proteína de fusión es al menos dos veces mayor que el rendimiento comparado con el polipéptido o proteína de interés que no comprende lisozima.

55 En una realización, la descripción se refiere a un método para mejora de la expresión de un polipéptido o proteína de interés, por expresión de dicho polipéptido o proteína de interés como proteína de fusión que comprende lisozima, en donde la proteína de fusión que comprende el polipéptido o proteína de interés y lisozima no forma agregado o cuerpo de inclusión alguno. En una realización adicional de la expresión, menos de 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% de la proteína de fusión que comprende el polipéptido o proteína de interés y lisozima forma agregados.

60 En una realización de la descripción, dicha proteína de fusión se expresa en una célula hospedadora. En una realización adicional de la descripción dicha célula hospedadora es una célula procariota o una célula eucariota. En una realización preferida, la célula hospedadora es una célula eucariota. En una realización más preferida de la descripción, dicha célula eucariota es una célula seleccionada de una célula CHO, una célula PER.C6, una célula HKB11 y una célula HEK293.

65

En una realización de la descripción, dicha célula hospedadora se transfectó con un vector de expresión que codificaba dicha proteína de fusión que comprendía el polipéptido o proteína de interés y lisozima.

5 En una realización de la descripción, dicha proteína de fusión se expresa en una célula hospedadora, en la que el cultivo de dicha célula hospedadora requiere al menos 50% menos de antibióticos como suplemento para el medio de cultivo comparado con un medio de cultivo para el cultivo de dicha proteína o polipéptido de interés no fusionada(o) a lisozima. En una realización preferida de la descripción, dicha proteína de fusión se expresa en una célula hospedadora en la que el cultivo de dicha célula hospedadora requiere al menos 50% menos, 60% menos, 70% menos, 80% menos, 90% menos, o 95% menos de antibióticos como suplemento para el medio de cultivo comparado con un medio de cultivo para el cultivo de dicha proteína o polipéptido de interés no fusionada(o) a lisozima. En una realización más preferida de la descripción, dicha proteína de fusión se expresa en una célula hospedadora en la que el medio de cultivo para el cultivo de dicha célula hospedadora está exento de antibióticos.

15 En una realización de la descripción, dicha proteína de fusión que comprende el polipéptido o proteína de interés y lisozima se aísla después de la expresión. En una realización adicional de la descripción, dicha proteína de fusión se aísla de la célula hospedadora, del medio de cultivo o de ambos.

20 En una realización de la descripción, dicha proteína de fusión se aísla de un anticuerpo específico para lisozima. En una realización adicional de la descripción, el anticuerpo específico para la lisozima es un anticuerpo aislado. En una realización preferida de la descripción, el anticuerpo específico para lisozima es un anticuerpo monoclonal. En una realización preferida de la descripción, el anticuerpo específico para lisozima comprende una región HCDR1 de secuencia NSAAWS (SEQ ID NO: 9), una región HCDR2 de secuencia RIYYRSKWYNDYAVSVKS (SEQ ID NO: 10), una región HCDR3 de secuencia LDHRYHEDTVYPGMDV (SEQ ID NO: 11), una región LCDR1 de secuencia SGDNLPAYTVT (SEQ ID NO: 12), una región LCDR2 de secuencia DDSRPS (SEQ ID NO: 13), y una región LCDR3 de secuencia ASWDPSSGV (SEQ ID NO: 14). En una realización preferida de la descripción, el anticuerpo específico para lisozima es MOR03207. En otra realización de la descripción, el anticuerpo específico para lisozima se fija al mismo epítipo que MOR03207. En una realización adicional de la descripción, el anticuerpo específico para lisozima compite con MOR03207.

30 En una realización de la descripción, el anticuerpo específico para lisozima se fija a un sustrato de soporte. En realizaciones adicionales de la descripción, el anticuerpo específico para lisozima se une a un sustrato de soporte seleccionado del grupo constituido por agarosa, Sepharose, poli(acrilamida), copolímeros agarosa/poli(acrilamida), dextrano, celulosa, polipropileno, policarbonato, nitrocelulosa, vidrio, papel y partículas magnéticas. En una realización adicional, el sustrato de soporte se incorpora en una columna de purificación. En una realización adicional, el sustrato de soporte se incorpora en cuentas separables.

40 En un aspecto de la descripción, el polipéptido o proteína de interés se fusiona a una lisozima de mamífero. En una realización, la lisozima de mamífero se selecciona del grupo constituido por lisozima humana, de ratón, de rata, de pollo, de conejo, de cabra y de primate. En una realización preferida, la lisozima de mamífero es lisozima de pollo.

45 En un aspecto de la descripción, el polipéptido o proteína de interés está fusionado a lisozima o un fragmento, análogo, homólogo, variante o derivado de la misma. En una realización, la lisozima o fragmento, análogo, homólogo, variante o derivado de la misma se deriva de lisozima de mamífero. En una realización adicional, la lisozima de mamífero se selecciona del grupo constituido por lisozima humana, de ratón, de rata, de pollo, de conejo, de cabra y de primate. En una realización preferida, la lisozima de mamífero es lisozima de pollo.

50 En una realización, la proteína de fusión comprende el polipéptido o proteína de interés, lisozima o un fragmento, análogo, homólogo, variante o derivado de la misma y un sitio de escisión de proteasa. En una realización preferida, el sitio de escisión es Factor Xa, Enteroquinasa (enteropeptidasa), Proteasa TEV o Proteasa HRV3C (Proteasa PreScission). En una realización preferida, el sitio de escisión de proteasa puede utilizarse para eliminación del dominio del polipéptido lisozima.

55 En un aspecto, la presente descripción se refiere a un kit que comprende un vector de expresión que codifica una proteína de fusión que comprende un polipéptido o proteína de interés, con una longitud de al menos 110 aminoácidos, y lisozima y un anticuerpo específico para lisozima. En una realización, dicho anticuerpo específico para lisozima está unido a un sustrato de soporte. En una realización preferida, dicho sustrato de soporte es un sustrato de soporte sólido. En una realización adicional, dicho sustrato de soporte sólido se selecciona del grupo constituido por agarosa, Sepharose, poli(acrilamida), copolímeros agarosa/poli(acrilamida), dextrano, celulosa, polipropileno, policarbonato, nitrocelulosa, vidrio, papel y partículas magnéticas.

60 En un aspecto, la presente descripción se refiere a una proteína de fusión que comprende un polipéptido o proteína de interés y lisozima, en donde el polipéptido o proteína de interés tiene una longitud de al menos 110 aminoácidos, al menos 120 aminoácidos, al menos 125 aminoácidos, al menos 150 aminoácidos, al menos 200 aminoácidos, al menos 250 aminoácidos, al menos 300 aminoácidos, al menos 400 aminoácidos o al menos 500 aminoácidos.

65

En un aspecto, la presente descripción se refiere a un polipéptido o proteína, que está marcado con lisozima. En una realización, el polipéptido o proteína, que está marcado con lisozima, tiene una longitud de al menos 110 aminoácidos, al menos 120 aminoácidos, al menos 125 aminoácidos, al menos 150 aminoácidos, al menos 200 aminoácidos, al menos 250 aminoácidos, al menos 300 aminoácidos, al menos 400 aminoácidos o al menos 500 aminoácidos.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para mejora de la expresión de un polipéptido o proteína monómero de interés, por expresión de dicho polipéptido o proteína monómero de interés como una proteína de fusión que comprende lisozima.

En una realización, la descripción se refiere a un método para mejora de la expresión de un polipéptido o proteína monómero de interés, por expresión de dicho polipéptido o proteína monómero de interés como una proteína de fusión que comprende lisozima, en donde el rendimiento de dicha proteína de fusión es al menos 2 veces mayor, al menos 3 veces mayor, al menos 4 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 6 veces mayor, al menos 7 veces mayor, al menos 8 veces mayor, al menos 10 veces mayor, al menos 15 veces mayor, al menos 20 veces mayor, al menos 25 veces mayor, al menos 50 veces mayor o al menos 100 veces mayor que el rendimiento comparado con el polipéptido o proteína monómero de interés que no comprende lisozima.

En una realización, la descripción se refiere a un método para mejora de la expresión de un polipéptido monómero o proteína de interés, por expresión de dicho polipéptido monómero o proteína de interés como una proteína de fusión que comprende lisozima, en donde la proteína de fusión que comprende el polipéptido o proteína monómero de interés y lisozima no forma agregado o cuerpo de inclusión alguno. En una realización adicional de la descripción, menos de 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% de la proteína de fusión que comprende el polipéptido o proteína monómero de interés y lisozima forma agregados.

En una realización de la descripción, dicha célula hospedadora se transfectó con un vector de expresión que codificaba dicha proteína de fusión que comprende el polipéptido o proteína monómero de interés y lisozima.

En una realización de la descripción, la proteína de fusión comprende un polipéptido o proteína monómero de interés y lisozima en donde la lisozima está fusionada al término N del polipéptido o proteína monómero de interés. En una realización de la descripción, la proteína de fusión comprende un polipéptido o proteína monómero de interés y lisozima en donde la lisozima está fusionada al término C del polipéptido o proteína monómero de interés.

En una realización de la descripción, dicha proteína de fusión que comprende el polipéptido o proteína monómero de interés y lisozima se aísla después de la expresión. En una realización adicional de la descripción, dicha proteína de fusión se aísla de la célula hospedadora, del medio de cultivo, o de ambos.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para la producción de una proteína de fusión, comprendiendo dicho método los pasos de:

- (a) expresión de dicha proteína de fusión en una célula hospedadora, y
  - (b) aislamiento de dicha proteína de fusión,
- en donde uno de los dominios polipeptídicos de dicha proteína de fusión es lisozima.

En una realización de la descripción, la proteína de fusión se aísla de la célula hospedadora. En realizaciones adicionales, la proteína de fusión se aísla del medio de cultivo. En una realización preferida, la proteína de fusión se aísla de la célula hospedadora y del medio de cultivo.

En un aspecto, la transcripción se refiere a un método para la producción de una proteína de fusión, comprendiendo dicho método los pasos de:

- (a) expresión de dicha proteína de fusión en una célula hospedadora, y
  - (b) aislamiento de dicha proteína de fusión de la célula hospedadora y del medio de cultivo,
- en donde uno de los dominios polipeptídicos de dicha proteína de fusión es lisozima y en donde el rendimiento de dicha proteína de fusión en el paso (a) es al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces mayor que el rendimiento comparado con una proteína que no comprende un dominio polipeptídico de lisozima.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para la producción de una proteína de fusión, comprendiendo dicho método los pasos de:

- (a) expresión de dicha proteína de fusión en una célula hospedadora, y
  - (b) aislamiento de dicha proteína de fusión de la célula hospedadora y del medio de cultivo,
- en donde uno de los dominios polipeptídicos de dicha proteína de fusión es lisozima y en donde la proteína de fusión expresada en el paso (a) no forma agregado o cuerpo de inclusión alguno.

En una realización de la descripción, menos de 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% de la proteína de fusión aislada forma agregados.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para la producción de un polipéptido o proteína de interés aislado, comprendiendo dicho método los pasos de:

- 5 (a) expresión de dicha proteína de fusión en una célula hospedadora, en donde dicha proteína de fusión comprende dicho polipéptido o proteína de interés y lisozima y  
 (b) aislamiento de dicha proteína de fusión.

10 En una realización de la descripción, la proteína de fusión se aísla de la célula hospedadora. En realizaciones adicionales, la proteína de fusión se aísla del medio de cultivo. En una realización preferida, la proteína de fusión se aísla de la célula hospedadora y del medio de cultivo.

15 En un aspecto, la descripción se refiere a un método para la producción de un polipéptido o proteína monómero aislado. En un aspecto, la descripción se refiere a un método para la producción de un polipéptido o proteína monómero aislado de interés. En una realización preferida, el polipéptido o proteína tiene una composición fisiológica monómera. En una realización preferida, la proteína de interés tiene una composición fisiológica monómera. En una realización preferida, la proteína de interés es un receptor de la superficie celular que se expresa fisiológicamente como un monómero. En una realización preferida, la proteína de interés es una proteína soluble que se expresa fisiológicamente como un monómero.

20 En un aspecto, la descripción se refiere a un método para la producción de un polipéptido o proteína monómero aislado de interés, comprendiendo dicho método los pasos de:

- 25 (a) expresión de una proteína de fusión en una célula hospedadora, en donde dicha proteína de fusión comprende dicho polipéptido o proteína monómero de interés y lisozima y  
 (b) aislamiento de dicha proteína de fusión de la célula hospedadora y del medio de cultivo.

En una realización de la descripción, el rendimiento de dicha proteína de fusión en el paso (a) es al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces mayor que el rendimiento comparado con el polipéptido o proteína monómero de interés que no comprende lisozima.

30 En una realización de la descripción, la proteína de fusión expresada en el paso (a) no forma agregado o cuerpo de inclusión alguno. En una realización preferida de la descripción, menos de 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% de la proteína de fusión aislada forma agregados.

35 En una realización de la descripción, la lisozima es un marcador. En realizaciones adicionales, la lisozima es un marcador de expresión o purificación. En una realización preferida, la lisozima es un marcador de expresión y purificación.

40 En un aspecto, la descripción se refiere al uso de lisozima como marcador para la producción de un polipéptido o proteína de interés caracterizado por la expresión de un polipéptido o proteína de interés fusionado a lisozima y el aislamiento de dicho polipéptido o proteína de interés fusionado a lisozima.

45 En un aspecto, la descripción se refiere al uso de lisozima como marcador para la producción de un polipéptido o proteína de interés caracterizado por la expresión de un polipéptido o proteína de interés fusionado a lisozima en una célula hospedadora y el aislamiento de dicho polipéptido o proteína de interés fusionado a lisozima de la célula hospedadora y del medio de cultivo.

50 En un aspecto, la descripción se refiere al uso de lisozima como marcador para la producción de un polipéptido o proteína de interés caracterizado por la expresión de un polipéptido o proteína de interés fusionado a lisozima en una célula hospedadora y el aislamiento de dicho polipéptido o proteína de interés fusionado a lisozima de la célula hospedadora y del medio de cultivo en donde dicho polipéptido o proteína de interés fusionado a lisozima se aísla de un anticuerpo específico para lisozima.

55 En una realización de la descripción, el rendimiento de dicho polipéptido o proteína de interés fusionado a lisozima es al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces mayor que el rendimiento comparado con dicho polipéptido o proteína de interés que no comprende un dominio de polipéptido lisozima.

### Definiciones

60 El término "**polipéptido**" se utiliza en esta memoria en su sentido más amplio tal como es apreciado por el profesional experto. Los polipéptidos comprenden al menos dos aminoácidos unidos por un enlace peptídico. Típicamente, los polipéptidos comprenden más de 30 aminoácidos.

65 El término "**proteína**" se utiliza también en esta memoria en su sentido más amplio tal como es apreciado por el profesional experto. Una proteína uno o más polipéptidos, en donde al menos parte del polipéptido tiene o es capaz

de adquirir una configuración de estructura tridimensional definida por la formación de estructuras secundarias, terciarias, o cuaternarias dentro de y/o entre su o sus cadenas polipeptídicas. Las proteínas pueden ser monómeras (compuestas de una sola cadena polipeptídica) o multímeras (compuestas de dos o más cadenas polipeptídicas).

5 El término "**célula hospedadora**", como se utiliza en esta memoria, puede ser cualquiera de cierto número de células utilizadas comúnmente en la producción de polipéptidos o proteínas exógenos, con inclusión de células hospedadoras eucariotas y procariotas. Células hospedadoras preferidas de la presente invención son células hospedadoras eucariotas, tales como células de hongos, células de levadura, células de plantas, células de insecto o células de mamífero. Son muy preferidas las células hospedadoras de mamífero. En otras realizaciones preferidas  
10 adicionales, dicha célula hospedadora de mamífero se selecciona de una célula CHO (European Collection of Cell Culture; ECACC #85050302), una célula PER.C6 (Crucell, Leiden, Países Bajos), una célula HKB11 (Bayer Health-Care, Berkley/CA, USA) y una célula HEK293 (American Type Culture Collection; Order no. CRL-1573).

15 El término "**condiciones que permiten la expresión [de un polipéptido]**", como se utiliza en esta memoria, se refiere a condiciones que conducen a la expresión de un polipéptido dado. La selección intencionada de las condiciones de la célula hospedadora hace posible la activación (o la desactivación) de la expresión de los polipéptidos de la presente invención. Típicamente, dicho cambio de condiciones se lleva a cabo por la adición de un producto químico o un compuesto existente naturalmente, un "inductor", al medio de crecimiento de la célula hospedadora. Dependiendo del promotor específico utilizado, la naturaleza del inductor varía. Otros cambios de  
20 condiciones que pueden conducir a la expresión de polipéptidos son un aumento de temperatura o una exposición a la luz o UV.

25 El término "**lisozima**", como se utiliza en esta memoria, incluye todas las lisozimas existentes naturalmente, tales como lisozima de clara de huevo de gallina, lisozimas sintéticas y lisozimas recombinantes, tales como lisozima recombinante humana, así como sales de lisozima. En una realización preferida, la lisozima es lisozima de pollo (SEQ ID NO: 1). En una realización, el término "lisozima" se refiere a lisozima procedente de microorganismos tales como algas, archea, bacterias, levaduras, hongos filamentosos, o protozoos. En una realización, el término "lisozima" se refiere a lisozima de mamíferos, aves, reptiles y anfibios. En una realización, el término "lisozima" se refiere a lisozima de ratón (SEQ ID NO: 2), conejo (SEQ ID NO: 3), cabra (SEQ ID NO: 4), humana (SEQ ID NO: 5),  
30 de vaca (SEQ ID NO: 6), de rata (SEQ ID NO: 7) o de cinomolgus (SEQ ID NO: 8).

35 En una realización preferida, la lisozima utilizada en la presente descripción comparte al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100 de identidad con la secuencia de aminoácidos de la lisozima que es expresada por un organismo existente naturalmente.

40 El término "**variante**" se define en esta memoria como un polipéptido que comprende una alteración, tal como una sustitución, inserción, y/o delección, de uno o más (varios) residuos de aminoácido en una o más (varias) posiciones específicas. El polipéptido alterado (variante) puede obtenerse por intervención humana mediante modificación de la secuencia de polinucleótidos que codifica la lisozima parental. La lisozima parental puede estar codificada por SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o una secuencia que es al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a una de estas secuencias. La secuencia de polipéptido variante es preferiblemente una que no se encuentra en la naturaleza. La presente invención se refiere a variantes de lisozima, que comprenden una alteración,  
45 preferiblemente en la forma de una sustitución y/o una inserción y/o una delección en una o más posiciones (varias).

50 El término "**aislado(a)**", como se utiliza en esta memoria, se refiere a un polipéptido o proteína o variantes de los mismos que se aísla de una fuente, v.g. la célula hospedadora a partir de la cual se expresa. Preferiblemente, el polipéptido tiene una pureza de al menos 40%, tal como una pureza de al menos 60%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95%, como se determina por SDS-PAGE.

55 El término "**proteína de fusión**" se refiere a una sola cadena de polipéptido que tiene al menos dos dominios polipeptídicos que no están presentes normalmente en un polipéptido natural simple. Así, las proteínas existentes naturalmente no son "proteínas de fusión", como se utiliza en esta memoria. Preferiblemente, un polipéptido de interés está fusionado con al menos un dominio polipeptídico por un enlace peptídico y la proteína de fusión puede incluir también las realizaciones enlazadoras de aminoácidos entre porciones de aminoácidos derivadas de proteínas separadas. El dominio polipeptídico fusionado al polipéptido de interés puede aumentar la solubilidad y/o expresión del polipéptido de interés y puede proporcionar también un marcador de purificación para permitir la purificación de la proteína de fusión recombinante de la célula hospedadora o sobrenadante de cultivo, o ambos. El  
60 dominio polipeptídico fusionado al polipéptido de interés puede fusionarse en el término N o en el término C del polipéptido de interés.

65 El término "**recombinante**" se refiere a una combinación artificial de dos segmentos de secuencia, separados en caso contrario, v.g., por síntesis química o por la manipulación de segmentos aislados de aminoácidos o de ácidos nucleicos por técnicas de ingeniería genética.



El término "**expresión**", como se utiliza en esta memoria, se refiere a la producción de un producto final funcional (v.g., un mRNA o una proteína (precursora o madura)).

5 El término "**vector**" tiene por objeto hacer referencia a una molécula de polinucleótido capaz de transportar otro polinucleótido al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de DNA bicatenario circular en el cual pueden insertarse segmentos de DNA adicionales. Además, la secuencia codificante del gen de interés puede transcribirse a partir de ciertos vectores por la maquinaria de transcripción celular y traducirse  
10 **ulteriormente** en la proteína de interés. A tales vectores se hace referencia en esta memoria como "**vectores de expresión**". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de DNA recombinante se encuentran a menudo en forma de plásmido. En la presente descripción, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse intercambiamente, dado que el plásmido es la forma de vector utilizada más comúnmente. Sin embargo, la descripción tiene por objeto incluir tales otras formas de vector de expresión, tales como vectores virales (v.g.,  
15 retrovirus deficientes en replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), que desempeñan funciones equivalentes.

El término "**monómero**", y sus equivalentes gramaticales, como se utilizan en esta memoria, se refieren a un polipéptido o proteína que está constituido una sola cadena de polipéptido. Los polipéptidos o proteínas monómeros de la presente invención no están asociados covalentemente ni de manera no covalente con o unidos a otro polipéptido o proteína.

20 El término "**marcador**" se utiliza en esta memoria y se refiere a una secuencia de péptido o polipéptido que puede unirse a un segundo polipéptido. Preferiblemente, un marcador es un marcador de purificación o un marcador de expresión, o ambas cosas.

25 El término "**marcador de purificación**", como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquier secuencia peptídica adecuada para purificación o identificación de un polipéptido. El marcador de purificación se fija específicamente a otro resto con afinidad para el marcador de purificación. Tales restos que se fijan específicamente a un marcador de purificación están unidos usualmente a una matriz o una resina, tal como cuentas de agarosa. Restos que se fijan específicamente a marcadores de purificación incluyen anticuerpos, otras proteínas (v.g. Proteína A o  
30 Estreptavidina), iones níquel o cobalto o resinas, biotina, amilosa, maltosa, y ciclodextrina. Marcadores de purificación ilustrativos incluyen marcadores histidina (HIS) (tales como un péptido hexahistidina), que se fijan a iones metálicos tales como los iones níquel o cobalto. Otros marcadores de purificación ilustrativos son el marcador myc (EQKLISEEDL), el marcador Strep (WSHPQFEK), el marcador Flag (DYKDDDDK) y el marcador V5 (GKPIPNPLLGLDST). El término "marcador de purificación" incluye también "marcadores epitópicos", es decir secuencias peptídicas que son reconocidas específicamente por anticuerpos. Marcadores epitópicos ilustrativos incluyen el marcador FLAG, que es reconocido específicamente por un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. La secuencia peptídica reconocida por el anticuerpo anti-FLAG está constituida por la secuencia DYKDDDDK o una variante sustancialmente idéntica de la misma. El término "marcador de purificación" incluye también variantes sustancialmente idénticas de marcadores de purificación. "Variante físicamente idéntica" como se utiliza en esta  
40 memoria, se refiere a derivados o fragmentos de marcadores de purificación que están modificados en comparación con el marcador de purificación original (v.g. por sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos), pero que retienen la propiedad del marcador de purificación de fijarse específicamente a un resto que reconoce específicamente el marcador de purificación.

45 El término "**marcador de expresión**" como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquier péptido o polipéptido que puede estar unido a un segundo polipéptido y se supone que refuerza la solubilidad, estabilidad y/o expresión de un polipéptido recombinante de interés. Marcadores de expresión ilustrativos incluyen el marcador Fc y el marcador SUMO. En principio, puede utilizarse como marcador de expresión cualquier péptido, polipéptido o proteína.

50 El término "**anticuerpo**", como se utiliza en esta memoria, incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento o cadena simple del mismo. Un "anticuerpo" existente naturalmente es una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. En una realización preferida, el anticuerpo descrito en la solicitud es un "anticuerpo monoclonal". El término "**anticuerpo monoclonal**", como se  
55 utiliza en esta memoria, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular simple. Una composición de anticuerpo monoclonal exhibe un solo sitio de fijación que tiene especificidad de fijación y afinidad singulares para epítopos particulares.

60 El término "**transfección**" como se utiliza en esta memoria, se refiere a una gran diversidad de técnicas utilizadas comúnmente para la introducción de DNA exógeno en una célula hospedadora procarionota o eucariota, v.g., electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, y análogos. La célula hospedadora puede ser "**transfectada**" con el vector de la presente invención por cualquier medio convencional conocido por el profesional experto. Por ejemplo, la transfección puede ser una transfección transitoria. Para ello, en ciertas realizaciones de la presente invención, dicho gen codificante de dicha proteína de fusión que comprende el

polipéptido o proteína de interés y lisozima se introduce en dicha célula hospedadora eucariota por transfección transitoria.

5 El término "**% de identidad**", como se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, se calcula como sigue. La secuencia de consulta se alinea con la secuencia diana utilizando el algoritmo CLUSTALW (Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J., Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680 (1994)). Se hace una comparación a lo largo de la ventana correspondiente a la más corta de las secuencias alineadas. Se comparan los residuos de aminoácido en dicha posición, y el porcentaje de posiciones en la secuencia de consulta que tienen correspondencias idénticas en la secuencia diana se consigna como % de identidad.

10

<b>Secuencia de Lisozima #/ Especie</b>	<b>Secuencia</b>
SEQ ID NO:1 Pollo (Gallus Gallus)	KVFGRCELAAMKRHGLDNYRGSYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRN TDGSTDYGILQINSRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITASVNC AKKIVSDGNGMNAWVAWRNRCKGTDVQAWIRGCR
SEQ ID NO:2 Ratón (Mus Musculus)	KVYNRCELARILKRNGMDGYRGVVKLADWVCLAQHESNYNTRATNYN RGDRSTDYGIFQINSRYWCNDGKTPRSKNACGINCSALLQDDITAAIQ CAKRVRDPQGIRAWVAWRTQCQNRDLSQYIRNCGV
SEQ ID NO:3 Conejo (Oryctolagus cuniculus)	KIYERCELARTLKKLGLDGYKGVSLANWMCLTKWESSYNTQATNYNP GDKSTDYGIFQINSRYWCNDGKTPRAVNACHIPCSDLLKDDITQAVAC AKRVVSDPQGIRAWVAWRNHCQSQDLTSYIQGCGV
SEQ ID NO:4 Cabra (Capra hircus)	KVFERCELARTLKRFGMDGFRGISLANWMCLARWESSYNTQATNYN SGDRSTDYGIFQINSHWWCNDGKTPGAVNACHIPCSALLQDDITQAV ACAKRVVSDPQGIRAWVAWRSHCQNRDLTSYIQGCGV
SEQ ID NO:5 Humana (Homo sapiens)	KVFERCELARTLKRFGMDGFRGISLANWMCLAKWESGYNTRATNYN AGDRSTDYGIFQINSRYWCNDGKTPGAVNACHLSCSALLQDNIADAV ACAKRVVRDPQGIRAWVAWRNRCQNRDVRQYVQGCGV
SEQ ID NO:6 Vaca (Bos taurus)	KVFERCELARTLKKLGLDGYKGVSLANWLCLTKWESSYNTKATNYNP SSESTDYGIFQINSKWWCNDGKTPNAVDGCHVSCSELMENDIAKAVA CAKHIVSEQGITAWVAWKSHCRDHDVSSYVQGCTL
SEQ ID NO:7 Rata (Rattus norvegicus)	KIYERCEFARTLKRNGMSGYGVSLADWVCLAQHESNYNTQARNYN PGDQSTDYGIFQINSRYWCNDGKTPRAKNACGIPCSALLQDDITQAIQ CAKRVRDPQGIRAWVAWQRHCKNRDLSGYIRNCGV
SEQ ID NO:8 Cinomolgus (Macaca fascicularis)	ASLISRCDLAQLVLELDLDFESYSLSDWLCLAFVESKFNISKINENAD GSFDYGLFQINGHYWCNDYRSHSENLCQVDCQGLARAPGWER

### Ejemplos

15 Todos los reactivos están disponibles comercialmente y se adquieren de, v.g., Sigma-Aldrich, Sartorius, TTP, GE Healthcare, etc. y son reactivos estándar utilizados en un laboratorio de biología molecular.

20 A no ser que se indique otra cosa, la clonación molecular se llevó a cabo utilizando protocolos estándar, como se describe esencialmente en Sambrook et al.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3 Vol.; Cold Spring Harbor Laboratory (diciembre de 2000). La expresión y purificación se realizaron conforme a procedimientos estándar como se describe en Current Protocols in Protein Science (Wiley Interscience).

#### Ejemplo 1: Generación de un vector adecuado para uso en los métodos de la presente invención

25 Para realizar la presente invención se utilizaron vectores de expresión eucariotas, v.g. un vector estándar pcDNA 3.1 (Invitrogen) o un vector de expresión pMAX (Figura 1, Figura 2), que es un vector de expresión modificado basado en pcDNA 3.1. El vector de expresión pMAX comprende v.g. un origen de replicación, resistencia a los antibióticos y

secuencias reguladoras (v.g. promotor, intensificador, sitio de poliadenilación) para transcripción y traducción eficientes. Las parejas de fusión o marcadores respectivos (v.g., lisozima, GST, His, Fc) se insertaron en el extremo 3' del sitio de clonación múltiple (MCS) por sub-clonación estándar (Figura 1). En la Figura 2 se incluye como ejemplo la secuencia de nucleótidos del constructo de expresión pMAX que comprende lisozima de pollo.

La secuencia codificante de cualquier proteína de interés puede insertarse en el MCS del vector de expresión, dando como resultado un constructo de fusión del gen de interés y v.g. la lisozima. El vector obtenido se transfirió en células hospedadoras de mamífero, v.g. células HKP11 o HEK293, en condiciones tales que se expresaba la proteína de fusión que comprendía una proteína de interés.

#### Ejemplo 2: Transfección del vector en células hospedadoras adecuadas

Se generaron diferentes variantes de vectores de expresión conforme al Ejemplo 1 que codificaban proteínas específicas de interés fusionadas a un marcador respectivo (v.g. lisozima como GST, His, Fc) y se transfirieron en células hospedadoras de mamífero.

Por ejemplo, se sembraron células HKB11 de suspensión a una densidad de  $0,5 \times 10^6$  vc/ml y se incubaron a 37°C y 6% de CO<sub>2</sub> en una incubadora de CO<sub>2</sub> humidificada. Al día siguiente, se transfirieron las células con DNA plasmídico utilizando Lipofectamin 2000 y OptiMEM (Invitrogen) conforme a las instrucciones del fabricante. Tres días más tarde, se cosechó el sobrenadante del cultivo de células acondicionado. Después de ello, la proteína expresada se purificó del sobrenadante cosechado por métodos de purificación estándar (cromatografía de afinidad de Proteína A para el marcador Fc o IMAC para el marcador His) o utilizando un anticuerpo específico para lisozima (MOR03207) para proteínas marcadoras con lisozima. En este caso, el anticuerpo específico para lisozima estaba acoplado a Sepharose 4FF (GE Healthcare) conforme a las instrucciones del fabricante. La proteína de interés de fusión expresada se fijó a la columna y la muestra se eluyó con glicina 100 mM, pH 4,0.

La medida de la absorbancia UV a 280 nm se utilizó para determinación de la concentración de proteínas. El estado nativo de la proteína purificada se analizó por cromatografía de exclusión de tamaños (utilizada para determinación del % de agregados) y difusión dinámica de la luz (utilizada para determinación del tamaño de partícula).

#### Ejemplo 3: Expresión y purificación de proteínas de interés utilizando lisozima como marcador

##### 3.1. Ocho proteínas analizadas

Se seleccionaron ocho proteínas de interés para expresión y purificación como proteínas de fusión de lisozima. Todas las proteínas eran expresadas y secretadas por líneas de células de mamífero (v.g. HKB11) y se purificaron a partir del sobrenadante de cultivo de células. Las proteínas seleccionadas exhibían tasas de expresión muy bajas y/o agregación alta como fusiones Fc, fusiones GST o como proteínas marcadas con His. En contraste, la fusión con lisozima conduce a tasas de expresión incrementadas y/o calidad de proteína sumamente mejorada en todos los ejemplos.

En las Tablas 1-8, se testaron y compararon la expresión y purificación de 8 proteínas diferentes. Todas las proteínas de interés analizadas son proteínas que se expresan fisiológicamente como monómeros y tienen una longitud mayor que 110 aminoácidos. Las proteínas ejemplificadas tienen un tamaño mínimo de 116 aminoácidos en el caso de la Proteína 1, en donde la Proteína 2 tiene una longitud de 517 aminoácidos, la Proteína 3 una longitud de 257 aminoácidos, la proteína 4 una longitud de 237 aminoácidos, la proteína 5 una longitud de 217 aminoácidos, la proteína 6 y la proteína 7 tienen ambas una longitud de 193 aminoácidos y la proteína 8 una longitud de 209 aminoácidos.

Se encontró que algunas proteínas ejemplificadas no se expresaban cuando estaban fusionadas al marcador Fc. Por consiguiente, se testaron el marcador His, lisozima o combinaciones de las mismas para expresar dichas proteínas de interés monómeras. La purificación subsiguiente se realizó por la vía del marcador His o por la vía de lisozima. Se utilizó el marcador Avi como un marcador ulterior para biotilación subsiguiente de las proteínas respectivas. El marcador Avi tiene una longitud de 15 aminoácidos y comprende un sitio de reconocimiento para la enzima BirA que media la biotilación específica de sitio. El marcador Avi no produce impacto alguno sobre el nivel de expresión de un polipéptido o proteína expresado recombinantemente y no afecta a su tendencia a agregarse.

##### 3.2. El marcador lisozima hace posible o mejora la expresión de las proteínas

La Proteína 1 se codificó en un vector de expresión de mamífero y se fusionó a combinaciones específicas de dos marcadores diferentes. Para ello, se utilizó un marcador His o un marcador lisozima y la purificación se realizó por la vía del marcador His (utilizando cromatografía de afinidad de metales inmovilizados, IMAC) o por la vía de lisozima (utilizando MOR2307 como anticuerpo específico de lisozima acoplado a Sepharose 4 FF). Si bien no era detectable expresión alguna de Proteína 1 utilizando el marcador His, la fusión con lisozima permitía la expresión de Proteína 1 (Tabla 1). Adicionalmente, la purificación de la proteína de fusión por un anticuerpo específico de lisozima producía

cantidades significativamente mayores en comparación con la purificación por la vía de IMAC. Adicionalmente, no era detectable agregación alguna de la proteína purificada.

**Tabla 1: Expresión y purificación de una Proteína 1 fusionada a un marcador His o una lisozima. La Proteína 1 tiene un tamaño de 116 aminoácidos**

Constructo	Expresión	Purificación	Rendimiento [mg/L]	Agregados <sup>2</sup> [%]
pMAX_Proteína 1_His	200 ml transitoria	IMAC	0	n.d.
pMAX_Proteína 1_Lys	200 ml transitoria	Lys (MOR3207)	2,0	0

En las Tablas 2 y 3 se ejemplifican proteínas adicionales que no podían expresarse utilizando una combinación de marcador Fc o marcador His. Sin embargo, la fusión con lisozima permitía la expresión y purificación de ambas proteínas. Proteína 2 y Proteína 3. Para Proteína 2, se consiguió un aumento de rendimiento después de purificación desde 0,3 mg/L a 4,0 mg/L por fusión de lisozima a Proteína 2. Adicionalmente, el nivel de agregaciones era inferior a 7% de las proteínas de fusión purificadas.

**Tabla 2: Expresión y purificación de Proteína 2 fusionada a un marcador Fc, His o lisozima. La Proteína 2 tiene un tamaño de 517 aminoácidos**

Constructo	Expresión	Purificación	Rendimiento [mg/L]	Agregados [%]
pMAX_Proteína 2_Fc-Avi_His	600 ml transitoria	IMAC	0,3	n.d.
pMAX_Proteína 2_Avi-His	600 ml transitoria	IMAC	0	n.d.
pMAX_Proteína 2_Lys-Avi	200 ml transitoria	Lys (MOR3207)	4,0	3,44%

**Tabla 3: Expresión y purificación de Proteína 3 fusionada a un marcador Fc, His o lisozima. La Proteína 3 tiene un tamaño de 257 aminoácidos**

Constructo	Expresión	Purificación	Rendimiento [mg/L]	Agregados [%]
pMAX_Proteína 3_Fc_His	200 ml transitoria	IMAC	0	n.d.
pMAX_Proteína 3_His	200 ml transitoria	IMAC	0	n.d.
pMAX_Proteína 3-Lys-His	200 ml transitoria	Lys (MOR3207)	0,4	6,6
pMAX_Proteína 3_Lys-Avi	200 ml transitoria	Lys (MOR3207)	0,1	2

### 3.2 Las proteínas de fusión de lisozima exhiben menos agregación

Las proteínas analizadas 4, 5 y 6 no sólo mostraban tasas de expresión aumentadas sino también menos agregación si se expresaban como proteína de fusión con lisozima. La expresión de la proteína 4 aumentaba más de tres veces y la agregación se reducía más de tres veces si la proteína se marcaba con lisozima en lugar de His (Tabla 4).

**Tabla 4: Expresión y purificación de una proteína específica fusionada al marcador His o al marcador lisozima. La proteína 4 tiene un tamaño de 237 aminoácidos**

Constructo	Expresión	Purificación	Rendimiento [mg/L]	Agregados [%]
pMAX_Proteína 4_His	200 ml transitoria	IMAC	3,4	7
pMAX_Proteína 4_Lys-Avi	200 ml transitoria	Lys (MOR3207)	13	2

Se observaron resultados similares con las proteínas 5 (Tabla 5) y 6 (Tabla 6) cuando se comparó el marcador lisozima con el marcador GST.

**Tabla 5: Expresión y purificación de una proteína específica fusionada al marcador GST o al marcador lisozima. La proteína 5 tiene un tamaño de 217 aminoácidos**

Constructo	Expresión	Purificación	Rendimiento [mg/L]	Agregados [%]
pMAX_Proteína 5_GST_His	200 ml transitoria	IMAC	3,8	13,4
pMAX_Proteína 5_Lys-Avi	200 ml transitoria	Lys (MOR3207)	10,4	5,7

**Tabla 6: Expresión y purificación de una proteína específica fusionada a un marcador GST o un marcador lisozima. La proteína 6 tiene un tamaño de 193 aminoácidos**

Constructo	Expresión	Purificación	Rendimiento [mg/L]	Agregados [%]
pMAX_Proteína 6_GST_His	200 ml transitoria	IMAC	8,8	10
pMAX_Proteína 6_Lys-Avi	200 ml transitoria	Lys (MOR3207)	13,5	<2

De acuerdo con ello, las proteínas analizadas en las Tablas 7 y 8 pudieron purificarse también con agregación significativamente menor después de marcación con marcador lisozima en comparación con las proteínas fusionadas a un marcador GST-His o marcador His. Adicionalmente, los niveles de expresión de la proteína 8 se incrementaban por fusión con lisozima en comparación con el marcador GST-His o el marcador His, mientras que los niveles de expresión de la proteína 7 aumentaban sólo en comparación con el marcador His pero no con el marcador GST-His.

**Tabla 7: Expresión y purificación de una proteína específica fusionada a un marcador GST, His o lisozima. La proteína 7 tiene un tamaño de 193 aminoácidos**

Constructo	Expresión	Purificación	Rendimiento [mg/L]	Agregados [%]
pMAX_Proteína 7_GST_His	200 ml transitoria	IMAC	19,2	17
pMAX_Proteína 7_His	200 ml transitoria	IMAC	4,2	5 (dos especies)
pMAX_Proteína 7_Lys-Avi	200 ml transitoria	Lys (MOR3207)	9,8	5

**Tabla 8: Expresión y purificación de una proteína específica fusionada a un marcador GST, His o lisozima. La proteína 8 tiene un tamaño de 209 aminoácidos**

Constructo	Expresión	Purificación	Rendimiento [mg/L]	Agregados [%]
pMAX_Proteína 8_GST_His	200 ml transitoria	IMAC	4,7	17
pMAX_Proteína 8_His	200 ml transitoria	IMAC	1,2	Baja recuperación en SEC debido a agregados
pMAX_Proteína 8_Lys-Avi	200 ml transitoria	Lys (MOR3207)	7,5	0

### 15 3.3. Sumario

Considerada en su conjunto, la fusión de lisozima a todas las proteínas analizadas era ventajosa en comparación con los marcadores alternativos (v.g. His, GST\_His, Fc\_His, His).

20 Para las proteínas 1, 2 y 3 los niveles de expresión aumentaban significativamente cuando las proteínas se fusionaron a lisozima. Para la proteína 7, los niveles de expresión no aumentaban pero la fusión a lisozima mejoraba notablemente la calidad de la proteína purificada en términos de agregación reducida. Sin embargo, para las proteínas 4, 5, 6 y 8 se observó una tendencia notablemente reducida a la agregación, acompañada con una tasa de expresión incrementada cuando las proteínas se fusionaron a lisozima.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MorphoSys AG

<120> Uso de lisozima como marcador

5 <160> 15

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

< 211> 129

< 212> PRT

10 < 213> Gallus gallus

<220>

< 221> FUENTE

< 222> 1..129

< 223> /tipo de molécula = "proteína"

15 /nota="Lisozima de pollo"

/organismo="Gallus gallus"

<400> 1

Lys	Val	Phe	Gly	Arg	Cys	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Met	Lys	Arg	His	Gly
1				5					10					15	
Leu	Asp	Asn	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Ser	Leu	Gly	Asn	Trp	Val	Cys	Ala	Ala
		20						25					30		
Lys	Phe	Glu	Ser	Asn	Phe	Asn	Thr	Gln	Ala	Thr	Asn	Arg	Asn	Thr	Asp
		35					40					45			
Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Gly	Ile	Leu	Gln	Ile	Asn	Ser	Arg	Trp	Trp	Cys
		50				55					60				
Asn	Asp	Gly	Arg	Thr	Pro	Gly	Ser	Arg	Asn	Leu	Cys	Asn	Ile	Pro	Cys
65					70					75				80	
Ser	Ala	Leu	Leu	Ser	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Ser	Val	Asn	Cys	Ala	Lys
				85					90					95	
Lys	Ile	Val	Ser	Asp	Gly	Asn	Gly	Met	Asn	Ala	Trp	Val	Ala	Trp	Arg
			100					105					110		
Asn	Arg	Cys	Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Gln	Ala	Trp	Ile	Arg	Gly	Cys	Arg
		115					120					125			

Leu

<210> 2

< 211> 130

< 212> PRT

20 < 213> Mus musculus

<220>

< 221> FUENTE

< 222> 1..130

< 223> /tipo de molécula = "proteína"

25 /nota="Lisozima de ratón"

/organismo="Mus musculus"

30

ES 2 582 802 T3

<400> 2  
 Lys Val Tyr Asn Arg Cys Glu Leu Ala Arg Ile Leu Lys Arg Asn Gly  
 1 5 10 15  
 Met Asp Gly Tyr Arg Gly Val Lys Leu Ala Asp Trp Val Cys Leu Ala  
 20 25 30  
 Gln His Glu Ser Asn Tyr Asn Thr Arg Ala Thr Asn Tyr Asn Arg Gly  
 35 40 45  
 Asp Arg Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Phe Gln Ile Asn Ser Arg Tyr Trp  
 50 55 60  
 Cys Asn Asp Gly Lys Thr Pro Arg Ser Lys Asn Ala Cys Gly Ile Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Ser Ala Leu Leu Gln Asp Asp Ile Thr Ala Ala Ile Gln Cys Ala  
 85 90 95  
 Lys Arg Val Val Arg Asp Pro Gln Gly Ile Arg Ala Trp Val Ala Trp  
 100 105 110  
 Arg Thr Gln Cys Gln Asn Arg Asp Leu Ser Gln Tyr Ile Arg Asn Cys  
 115 120 125  
 Gly Val  
 130

5 <210> 3  
 < 211> 130  
 < 212> PRT  
 < 213> Oryctolagus cuniculus

10 <220>  
 < 221> FUENTE  
 < 222> 1..130  
 < 223> /tipo de molécula = "proteína"  
 /nota="Lisozima de conejo"  
 /organismo="Oryctolagus cuniculus"

15 <400> 3  
 Lys Ile Tyr Glu Arg Cys Glu Leu Ala Arg Thr Leu Lys Lys Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Asp Gly Tyr Lys Gly Val Ser Leu Ala Asn Trp Met Cys Leu Thr  
 20 25 30  
 Lys Trp Glu Ser Ser Tyr Asn Thr Gln Ala Thr Asn Tyr Asn Pro Gly  
 35 40 45  
 Asp Lys Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Phe Gln Ile Asn Ser Arg Tyr Trp  
 50 55 60  
 Cys Asn Asp Gly Lys Thr Pro Arg Ala Val Asn Ala Cys His Ile Pro  
 65 70 75 80  
 Cys Ser Asp Leu Leu Lys Asp Asp Ile Thr Gln Ala Val Ala Cys Ala  
 85 90 95  
 Lys Arg Val Val Ser Asp Pro Gln Gly Ile Arg Ala Trp Val Ala Trp  
 100 105 110  
 Arg Asn His Cys Gln Ser Gln Asp Leu Thr Ser Tyr Ile Gln Gly Cys  
 115 120 125  
 Gly Val  
 130

20 <210> 4  
 < 211> 130  
 < 212> PRT  
 < 213> Capra hircus

<220>  
 < 221> FUENTE  
 < 222> 1..130  
 < 223> /tipo de molécula = "proteína" /nota="Lisozima de cabra" /organismo="Capra hircus"

5 <400> 4

```
Lys Val Phe Glu Arg Cys Glu Leu Ala Arg Thr Leu Lys Arg Phe Gly
1          5          10          15
Met Asp Gly Phe Arg Gly Ile Ser Leu Ala Asn Trp Met Cys Leu Ala
20          25          30
Arg Trp Glu Ser Ser Tyr Asn Thr Gln Ala Thr Asn Tyr Asn Ser Gly
35          40          45
Asp Arg Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Phe Gln Ile Asn Ser His Trp Trp
50          55          60
Cys Asn Asp Gly Lys Thr Pro Gly Ala Val Asn Ala Cys His Ile Pro
65          70          75          80
Cys Ser Ala Leu Leu Gln Asp Asp Ile Thr Gln Ala Val Ala Cys Ala
85          90          95
Lys Arg Val Val Ser Asp Pro Gln Gly Ile Arg Ala Trp Val Ala Trp
100         105         110
Arg Ser His Cys Gln Asn Gln Asp Leu Thr Ser Tyr Ile Gln Gly Cys
115         120         125
Gly Val
130
```

10 <210> 5  
 < 211> 130  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

15 <220>  
 < 221> FUENTE  
 < 222> 1..130  
 < 223> /tipo de molécula = "proteína"  
 /nota="Lisozima humana"  
 /organismo="Homo sapiens"

20 <400> 5

```
Lys Val Phe Glu Arg Cys Glu Leu Ala Arg Thr Leu Lys Arg Leu Gly
1          5          10          15
Met Asp Gly Tyr Arg Gly Ile Ser Leu Ala Asn Trp Met Cys Leu Ala
20          25          30
Lys Trp Glu Ser Gly Tyr Asn Thr Arg Ala Thr Asn Tyr Asn Ala Gly
35          40          45
Asp Arg Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Phe Gln Ile Asn Ser Arg Tyr Trp
50          55          60
Cys Asn Asp Gly Lys Thr Pro Gly Ala Val Asn Ala Cys His Leu Ser
65          70          75          80
Cys Ser Ala Leu Leu Gln Asp Asn Ile Ala Asp Ala Val Ala Cys Ala
85          90          95
Lys Arg Val Val Arg Asp Pro Gln Gly Ile Arg Ala Trp Val Ala Trp
100         105         110
Arg Asn Arg Cys Gln Asn Arg Asp Val Arg Gln Tyr Val Gln Gly Cys
115         120         125
Gly Val
130
```



ES 2 582 802 T3

<210> 6  
 < 211> 129  
 < 212> PRT  
 < 213> Bos taurus

5 <220>  
 < 221> FUENTE  
 < 222> 1..129  
 < 223> /tipo de molécula = "proteína"  
 /nota="Lisozima de vaca"  
 10 /organismo="Bos taurus"

<400> 6

```

Lys Val Phe Glu Arg Cys Glu Leu Ala Arg Thr Leu Lys Lys Leu Gly
1          5          10          15
Leu Asp Gly Tyr Lys Gly Val Ser Leu Ala Asn Trp Leu Cys Leu Thr
          20          25          30
Lys Trp Glu Ser Ser Tyr Asn Thr Lys Ala Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
          35          40          45

Ser Glu Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Phe Gln Ile Asn Ser Lys Trp Trp
50          55          60
Cys Asn Asp Gly Lys Thr Pro Asn Ala Val Asp Gly Cys His Val Ser
65          70          75          80
Cys Ser Glu Leu Met Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Val Ala Cys Ala
          85          90          95
Lys His Ile Val Ser Glu Gln Gly Ile Thr Ala Trp Val Ala Trp Lys
          100          105          110
Ser His Cys Arg Asp His Asp Val Ser Ser Tyr Val Gln Gly Cys Thr
          115          120          125
15 Leu
  
```

<210> 7  
 <211> 130  
 < 212> PRT  
 < 213> Rattus norvegicus

20 <220>  
 < 221> FUENTE  
 < 222> 1..130  
 < 223> /tipo de molécula = "proteína"  
 /nota="Lisozima de rata"  
 25 /organismo="Rattus norvegicus"

<400> 7

```

Lys Ile Tyr Glu Arg Cys Glu Phe Ala Arg Thr Leu Lys Arg Asn Gly
1           5           10           15
Met Ser Gly Tyr Tyr Gly Val Ser Leu Ala Asp Trp Val Cys Leu Ala
           20           25           30
Gln His Glu Ser Asn Tyr Asn Thr Gln Ala Arg Asn Tyr Asn Pro Gly
           35           40           45
Asp Gln Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Phe Gln Ile Asn Ser Arg Tyr Trp
           50           55           60
Cys Asn Asp Gly Lys Thr Pro Arg Ala Lys Asn Ala Cys Gly Ile Pro
           65           70           75           80
Cys Ser Ala Leu Leu Gln Asp Asp Ile Thr Gln Ala Ile Gln Cys Ala
           85           90           95
Lys Arg Val Val Arg Asp Pro Gln Gly Ile Arg Ala Trp Val Ala Trp
           100          105          110
Gln Arg His Cys Lys Asn Arg Asp Leu Ser Gly Tyr Ile Arg Asn Cys
           115          120          125
Gly Val
           130

```

<210> 8

< 211> 91

5 < 212> PRT

< 213> Macaca fascicularis

<220>

< 221> FUENTE

< 222> 1..91

10 < 223> /tipo de molécula = "proteína"

/nota="Lisozima de Cinomolgus"

/organismo="Macaca fascicularis"

<400> 8

```

Ala Ser Leu Ile Ser Arg Cys Asp Leu Ala Gln Val Leu Gln Leu Glu
1           5           10           15
Asp Leu Asp Gly Phe Glu Ser Tyr Ser Leu Ser Asp Trp Leu Cys Leu
           20           25           30
15 Ala Phe Val Glu Ser Lys Phe Asn Ile Ser Lys Ile Asn Glu Asn Ala
           35           40           45
Asp Gly Ser Phe Asp Tyr Gly Leu Phe Gln Ile Asn Gly His Tyr Trp
           50           55           60
Cys Asn Asp Tyr Arg Ser His Ser Glu Asn Leu Cys Gln Val Asp Cys
           65           70           75           80
Gln Gly Leu Ala Arg Ala Pro Gly Trp Glu Arg
           85           90

```

<210> 9

20 < 211> 6

< 212> PRT

< 213> constructo sintético

<220>

< 221> FUENTE

25 < 222> 1..6

< 223> /tipo de molécula = "proteína"

/nota="MOR3207 HCDR1"

/organismo="constructo sintético"

ES 2 582 802 T3

<400> 9

Asn Ser Ala Ala Trp Ser  
1 5

<210> 10  
< 211> 18  
5 < 212> PRT  
< 213> constructo sintético

<220>  
< 221> FUENTE  
< 222> 1..18  
10 < 223> /tipo de molécula = "proteína"  
/nota="MOR3207 HCDR2"  
/organismo="constructo sintético"

<400> 10

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

15 <210> 11  
< 211> 16  
< 212> PRT  
< 213> constructo sintético

<220>  
20 < 221> FUENTE  
222> 1..16  
< 223> /tipo de molécula = "proteína"  
/nota="MOR3207 HCDR3"  
/organismo="constructo sintético"

25 <400> 11

Leu Asp His Arg Tyr His Glu Asp Thr Val Tyr Pro Gly Met Asp Val  
1 5 10 15

30 <210> 12  
< 211> 11  
< 212> PRT  
< 213> constructo sintético

<220>  
< 221> FUENTE  
< 222> 1..11  
35 < 223> /tipo de molécula = "proteína"  
/nota="MOR3207 LCDR1"  
/organismo="constructo sintético"

<400> 12

40 Ser Gly Asp Asn Leu Pro Ala Tyr Thr Val Thr  
1 5 10

ES 2 582 802 T3

<210> 13  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> constructo sintético

5 <220>  
 < 221> FUENTE  
 < 222> 1..7  
 < 223> /tipo de molécula = "proteína"  
 /nota="MOR3207 LCDR2"  
 10 /organismo="constructo sintético"  
 <400> 13

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
 1 5

15 <210> 14  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> constructo sintético

<220>  
 < 221> FUENTE  
 20 < 222> 1..9  
 < 223> /tipo de molécula = "proteína"  
 /nota="MOR3207 LCDR3"  
 /organismo="constructo sintético"  
 <400> 14

25 Ala Ser Trp Asp Pro Ser Ser Gly Val  
 1 5

30 <210> 15  
 < 211> 6275  
 < 212> DNA  
 < 213> constructo sintético

<220>  
 < 221> FUENTE  
 < 222> 1..6275  
 35 < 223> /tipo de molécula="DNA"  
 /nota="pMAX"  
 /organismo="constructo sintético"

<400> 15

40 gatctcccga tcccctatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa 60  
 gccagtatct gctccctgct tgtgtgttgg aggtcgctga gtagtgcgcg agcaaaatth 120  
 aagctacaac aaggcaaggc ttgaccgaca tttgcatgaa gaatctgctt agggttaggc 180  
 gttttgcgct gcttcgcat gtacgggcca gatatacgcg ttgacattga ttattgacta 240

ES 2 582 802 T3

gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg 300  
 ttacataact tacggtaaatt ggccccctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga 360  
 cgtcaataat gacgtatggt cccatagtaa cgccaatag gactttccat tgacgtcaat 420  
 ggggtggagta tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa 480  
 gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta aatggccccg ctggcattat gcccagtaca 540  
 tgacctatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcacg gctattacca 600  
 tggatgatgc gttttggcag tacatcaatg ggcgtagata gcggtttgac tcacgggat 660  
 ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg 720  
 actttccaaa atgtcgtaac aactccgcc cattgacgca aatgggcggg aggcgtgtac 780  
 ggtgggaggt ctatataagc agagctctct ggctaactag agaaccact gcttactggc 840  
 ttatcgaat taatacgact cactataggg agaccaagc tggctagcaa gcttctagcg 900  
 ccaccatggt gttgcagacc caggtcttca tttctctgtt gctctggatc tctgggtcct 960  
 acgggatggg taccgggaaa atgatggata tcatcgaggg ccggatggac aagggtgttcg 1020  
 gcagatgcga gctggccgct gccatgaagc ggacggcct ggacaactac cggggctaca 1080  
 gcctgggcaa ctgggtctgc gccgccaagt tcgagagcaa cttcaatact caggccacca 1140  
 accggaacac cgacggcagc accgactacg gcatcctgca gatcaacagc cgggtggtgg 1200  
 gcaacgacgg caggaccccc ggacggcga acctgtgcaa catcccttgc agcgccttgc 1260  
 tgtccagcga catcaccgcc agcgtgaact gcgccaagaa aatcgtgtcc gacggcaacg 1320  
 gcatgaacgc ctgggtggcc tggcggaacc ggtgcaaggg cacagacgtg caggcctgga 1380  
 tcagaggctg cagactggtt aactctagag gtctgaacga catcttctgag gctcagaaaa 1440  
 tcgaatggca cgaataatga gaattctcta gataatgagt ttaaagggt ggcatccctg 1500  
 tgaccctcc ccagtgcctc tcttggcctt ggaagttgcc actccagtgc ccaccagcct 1560  
 tgtcctaata aaattaagtt gcatcatttt gtctgactag gtgtccttct ataattat 1620  
 ggggtggagg ggggtggtat ggagcaaggg gcaagttggg aagacaacct gtagggcctg 1680  
 cggggtctat tgggaaccaa gctggagtgc agtggcacia tcttggctca ctgcaatctc 1740  
 cgctccttgg gttcaagcga ttctcctgcc tcagcctccc gagttgttgg gattccaggc 1800  
 atgcatgacc aggtcacct aatthttgtt tttttggtag agacggggtt tcaccatatt 1860  
 ggccaggctg gtctccaact cctaactca ggtgatctac ccaccttggc ctcccaaatt 1920  
 gctgggatta caggcgtgaa ccaactgctc cttccctgtc cttctgattt taaaataact 1980  
 ataccagcag gaggacgtcc agacacagca taggtacct ggccatgccc aaccgggtgg 2040  
 acatttgagt tgcttgctt gcaactgtcct tcatgctgtt ggggtccactc agtagatgcc 2100

ES 2 582 802 T3

tgttgaattg ggtacgcggc atcgattcca cgcgcctgt agcggcgcat taagcgcggc 2160  
 ggggtgtggg gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccttag cgcgccctcc 2220  
 tttcgccttc ttcccttctt ttctcgccac gttcgccggc tttccccgtc aagctctaaa 2280  
 tcgggggctc cctttagggt tccgatttag tgetttacgg cacctcgacc ccaaaaaact 2340  
 tgattagggg gatgggtcac gtagtgggcc atcgccctga tagacgggtt ttcgcccttt 2400  
 gacgttggag tccacgttct ttaatagtgg actcttgttc caaactggaa caaactcaa 2460  
 ccctatctcg gtctattctt ttgatttata agggattttg ccgatttcgg cctattgggt 2520  
 aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaattaa ttctgtggaa tgtgtgtcag 2580  
 ttaggggtg gaaagtcccc aggtccccca gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc 2640  
 aattagtcat caaccagggt tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa 2700  
 agcatgcatc tcaattagtc agcaaccata gtcccgcccc taactccgcc catcccgccc 2760  
 ctaactccgc ccagttccgc ccattctccg ccccatggct gactaatttt ttttatttat 2820  
 gcagaggccc aggcgccctc tgctctgag ctattccaga agtagtgagg aggtttttt 2880  
 ggaggcctag gcttttgcaa aaagctcccg ggagcttgta tatccatttt cggatctgat 2940  
 caagagacag gatgaggatc gtttcgcatg attgaacaag atggattgca cgcaggttct 3000  
 ccggccgctt ggggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcggctgc 3060  
 tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg cagggggccc cggttctttt tgtcaagacc 3120  
 gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc 3180  
 acgacggggc ttcccttcgc agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg aagggactgg 3240  
 ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctctgtcat ctcaacttgc tcctgccgag 3300  
 aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc ggctacctgc 3360  
 ccattcgacc accaagcgaac acatcgcatc gagcagcac gtactcggat ggaagccggt 3420  
 cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc cgaactgttc 3480  
 gccaggtca aggcgcgcat gcccgacggc gaggatctcg tcgtgacca tggcgatgcc 3540  
 tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg 3600  
 ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggtta cccgtgatat tgctgaagag 3660  
 cttggcggcg aatgggctga ccgcttctc gtgctttacg gtatcgccgc tcccgatcgc 3720  
 cagcgcacgc ccttctatcg ccttcttgac gagttcttct gacggggact ctggggttcg 3780  
 aatgaccga ccaagcgagc cccaacctgc catcacgaga tttcgattcc accgcgcct 3840  
 tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg atcctccagc 3900  
 ggggggatct catgctggag ttcttcgccc accccaactt gtttattgca gcttataatg 3960  
 gttacaaata aagcaatagc atcacaat tcaaaaataa agcatttttt tcaactgcatt 4020

ES 2 582 802 T3

ctagttgtgg tttgtccaaa ctcacatg tatcttatca tgtctgtata ccgtcgacct 4080  
ctagctagag cttggcgtaa tcatggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc 4140  
tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagt taaagcctgg ggtgcctaata 4200  
gagtgagcta actcacatta attgctgtgc gtcactgccc cgctttccag tcgggaaacc 4260  
tgtcgtgccca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgctgattg 4320  
ggcgctcttc cgcttcctcg ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcccggag 4380  
cggtatcagc tcaactcaaag gcggtaatac ggttatccac agaactcagg gataacgcag 4440  
gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc 4500  
tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc 4560  
agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataaccaggc gtttccccct ggaagctccc 4620  
tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt 4680  
cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggtc tctcagttcg gtgtaggtcg 4740  
ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat 4800  
ccgtaacta tcgtcttgag tccaaccogg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag 4860  
ccactgtaa caggattagc agagcaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt 4920  
ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc 4980  
cagttacctt cgaaaaaga gttgtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggtc 5040  
gcggtggttt ttttgttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag 5100  
atccttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgtaagggc 5160  
ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa 5220  
gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggc tgacagttac caatgcttaa 5280  
tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc 5340  
ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga 5400  
taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa 5460  
gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattgtt 5520  
gccgggaagc tagagtaagt agttcggcag ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg 5580  
ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc 5640  
aacgatcaag gcgagttaca tgatccccc tgtgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg 5700  
gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag 5760  
cactgcataa ttctcttact gtcattgcat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt 5820  
actcaaccaa gtcattctga gaatagtga tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt 5880

# ES 2 582 802 T3

caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac	5940
gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctggt gagatccagt tcgatgtaac	6000
ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag	6060
caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatggtgaa	6120
tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga	6180
gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc	6240
cccgaaaagt gccacctgac gtcgacggat cggga	6275



**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la producción de un polipéptido o proteína monómero aislado, comprendiendo dicho método los pasos de
- 5 (a) expresión de dicho polipéptido o proteína monómero como proteína de fusión en una célula hospedadora, en donde dicha proteína de fusión comprende dicho polipéptido o proteína monómero y lisozima y  
(b) aislamiento de dicha proteína de fusión,  
En donde dicho polipéptido o proteína monómero tiene una longitud de al menos 110 aminoácidos.
- 10 2. El método conforme a la reivindicación 1, en donde el rendimiento de dicha proteína de fusión es al menos dos veces mayor que el rendimiento comparado con el polipéptido o proteína monómero que no comprende lisozima.
- 15 3. El método conforme a la reivindicación 1, en donde menos de 15% de la proteína de fusión que comprende el polipéptido o proteína monómero y lisozima forma agregados.
4. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones siguientes, en el que dicha célula hospedadora es una célula procariota o una célula eucariota.
- 20 5. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones siguientes, en el que dicha célula hospedadora se ha transfectado con un vector de expresión que codifica dicha proteína de fusión que comprende el polipéptido o proteína monómero y lisozima.
- 25 6. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones siguientes, en el que dicho polipéptido o proteína monómero tiene una longitud de al menos 120 aminoácidos, al menos 125 aminoácidos, al menos 150 aminoácidos, al menos 200 aminoácidos, al menos 250 aminoácidos, al menos 300 aminoácidos, al menos 400 aminoácidos o al menos 500 aminoácidos.
- 30 7. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones siguientes, en el que dicha proteína de fusión se aísla a partir de la célula hospedadora, el medio de cultivo o ambos.
8. El método conforme a la reivindicación 7, en el que dicha proteína de fusión se aísla con un anticuerpo específico para lisozima.
- 35 9. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones siguientes, en el que dicha lisozima es una lisozima de mamífero.
10. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones siguientes, en el que dicha lisozima es un fragmento, análogo, homólogo, variante o derivado de lisozima.
- 40 11. Un kit que comprende un vector de expresión que codifica una proteína de fusión que comprende un polipéptido o proteína con una longitud de al menos 110 aminoácidos, lisozima y un anticuerpo específico para lisozima.
- 45 12. Un kit conforme a la reivindicación 11, en el que dicho anticuerpo específico para lisozima está unido a un sustrato de soporte.
- 50 13. Un kit conforme a la reivindicación 12, en el que dicho sustrato de soporte se selecciona del grupo constituido por agarosa, Sepharose, poliácridamida, copolímeros agarosa/poliácridamida, dextrano, celulosa, polipropileno, policarbonato, nitrocelulosa, vidrio, papel y partículas magnéticas.

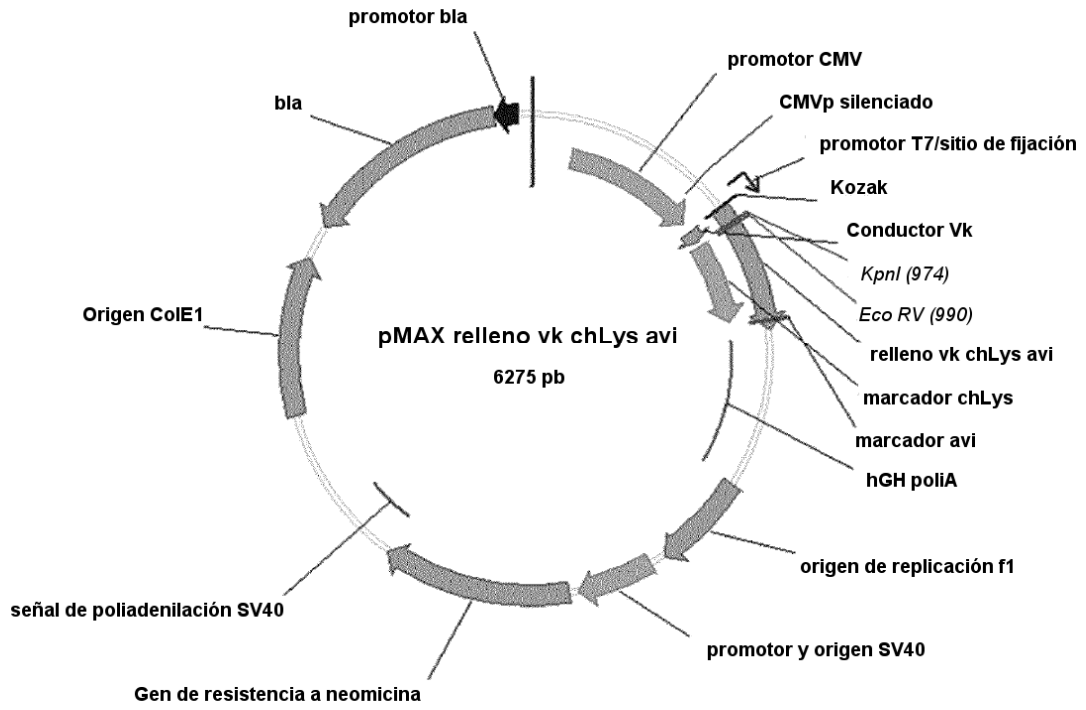


Figura 2A

1 GATCTCCCGA TCCCCTATGG TGCACTCTCA GTACAATCTG CTCTGATGCC  
 51 GCATAGTTAA GCCAGTATCT GCTCCCTGCT TGTGTGTTGG AGGTCGCTGA  
 101 GTAGTGC GCG AGCAAAAATTT AAGCTACAAC AAGGCAAGGC TTGACCGACA  
 151 TTTGCATGAA GAATCTGCTT AGGGTTAGGC GTTTTGCGCT GCTTCGCGAT  
 201 GTACGGGCCA GATATACGCG TTGACATTGA TTATTGACTA GTTATTAATA  
 251 GTAATCAATT ACGGGGTCAT TAGTTCATAG CCCATATATG GAGTTCGCGG  
 301 TTACATAACT TACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCTGACCGCC CAACGACCCC  
 351 CGCCATTGA CGTCAATAAT GACGTATGTT CCCATAGTAA CGCCAATAGG  
 401 GACTTTCCAT TGACGTCAAT GGGTGGAGTA TTTACGGTAA ACTGCCCACT  
 451 TGGCAGTACA TCAAGTGTAT CATATGCCAA GTACGCCCCC TATTGACGTC  
 501 AATGACGGTA AATGGCCCGC CTGGCATTAT GCCCAGTACA TGACCTTATG  
 551 GGACTTTTCT ACTTGGCAGT ACATCTACGT ATTAGTCATC GCTATTACCA  
 601 TGGTGATGCG GTTTTGGCAG TACATCAATG GCGGTGGATA GCGGTTTGAC  
 651 TCACGGGGAT TTCCAAGTCT CCACCCCAT GACGTCAATG GGAGTTTGT  
 701 TTGGCACCAA AATCAACGGG ACTTTCCAA ATGTCGTAAC AACTCCGCC  
 751 CATTGACGCA AATGGGCGGT AGGCGTGTAC GGTGGGAGGT CTATATAAGC  
 801 AGAGCTCTCT GGCTAACTAG AGAACCCACT GCTTACTGGC TTATCGAAAT  
 851 TAATACGACT CACTATAGGG AGACCCAAGC TGGCTAGCAA GCTTCTAGCG  
 901 CCACCATGGT GTTGCAGACC CAGGICTTCA TTTCTCTGTT GCTCTGGATC  
 951 TCTGGTGCCT ACGGGGATGG TACCGGGAAA ATGATGGATA TCATCGAGGG  
 1001 CCGGATGGAC AAGGTGTTCG GCAGATGCGA GCTGGCCGCT GCCATGAAGC  
 1051 GGCACGGCCT GGACAACACTAC CGGGGCTACA GCCTGGGCAA CTGGGTCTGC  
 1101 GCCGCCAAGT TCGAGAGCAA CTTCAATACT CAGGCCACCA ACCGGAACAC  
 1151 CGACGGCAGC ACCGACTACG GCATCCTGCA GATCAACAGC CGGTGGTGGT  
 1201 GCAACGACGG CAGGACCCCC GGCAGCCGGA ACCTGTGCAA CATCCCTTGC  
 1251 AGCGCCCTGC TGTCCAGCGA CATCACC GCC AGCGTGA ACT GCGCCAAGAA  
 1301 AATCGTGTCC GACGGCAACG GCATGAACGC CTGGGTGGCC TGGCGGAACC  
 1351 GGTGCAAGGG CACAGACGTG CAGGCCTGGA TCAGAGGCTG CAGACTGGTT  
 1401 AACTCTAGAG GTCTGAACGA CATCTTCGAG GCTCAGAAAA TCGAATGGCA  
 1451 CGAATAATGA GAATTCTCTA GATAATGAGT TTAAACGGGT GGCATCCCTG  
 1501 TGACCCCTCC CCAGTGCCTC TCCTGGCCCT GGAAGTTGCC ACTCCAGTGC  
 1551 CCACCAGCCT TGTCCTAATA AAATTAAGTT GCATCATTTT GTCTGACTAG  
 1601 GTGTCCCTTCT ATAATATTAT GGGGTGGAGG GGGGTGGTAT GGAGCAAGGG  
 1651 GCAAGTTGGG AAGACAACCT GTAGGGCCTG CGGGGTCTAT TGGGAACCAA  
 1701 GCTGGAGTGC AGTGGACAAA TCTTGGCTCA CTGCAATCTC CGCCTCCTGG  
 1751 GTTCAAGCGA TTCTCCTGCC TCAGCCTCCC GAGTTGTTGG GATTCCAGGC  
 1801 ATGCATGACC AGGCTCACCT AATTTTTGTT TTTTGGTAG AGACGGGGTT  
 1851 TCACCATATT GGCCAGGCTG GTCTCCA ACT CCTAATCTCA GGTGATCTAC  
 1901 CCACCTTGGC CTCCCAAATT GCTGGGATTA CAGGCGTGAA CCACTGCTCC  
 1951 CTTCCCTGTC CTTCTGATTT TAAAATAACT ATACCAGCAG GAGGACGTCC  
 2001 AGACACAGCA TAGGCTACCT GGCCATGCCC AACCGGTGGG ACATTTGAGT  
 2051 TGCTTGCTTG GCACTGTCCT CTCATGCGTT GGGTCCACTC AGTAGATGCC  
 2101 TGTTGAATTG GGTACGCGGC ATCGATTCCA CGCGCCCTGT AGCGGCGCAT  
 2151 TAAGCGCGGC GGGTGTGGTG GTTACGCGCA GCGTGACCGC TACACTTGCC  
 2201 AGCGCCCTAG CGCCCCCTCC TTTCGCTTTC TTCCCTTCTC TTCTCGCCAC  
 2251 GTTCGCCGGC TTTCCCCGTC AAGCTCTAAA TCGGGGGCTC CCTTTAGGGT  
 2301 TCCGATTTAG TGCTTTACGG CACCTCGACC CCAAAAAACT TGATTAGGGT  
 2351 GATGGTTTAC GTAGTGGGCC ATCGCCCTGA TAGACGGTTT TTCGCCCTTT  
 2401 GACGTTGGAG TCCACGTTCT TTAATAGTGG ACTCTTGTTT CAAACTGGAA  
 2451 CAACACTCAA CCCTATCTCG GTCTATTCTT TTGATTTATA AGGGATTTTG  
 2501 CCGATTTTCG CCTATTGGTT AAAAAATGAG CTGATTTAAC AAAAATTTAA

Figura 2B

2551 CGCGAATTAA TTCTGTGGAA TGTGTGTCAG TTAGGGTGTG GAAAGTCCCC  
 2601 AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA GTATGCAAAG CATGCATCTC AATTAGTCAG  
 2651 CAACCAGGTG TGGAAAGTCC CCAGGCTCCC CAGCAGGCAG AAGTATGCAA  
 2701 AGCATGCATC TCAATTAGTC AGCAACCATA GTCCCGCCCC TAACTCCGCC  
 2751 CATCCCGCCC CTAACTCCGC CCAGTTCCGC CCATTCTCCG CCCCATGGCT  
 2801 GACTAATTTT TTTTATTTAT GCAGAGGCCG AGGCCGCCCTC TGCCCTCGAG  
 2851 CTATTCCAGA AGTAGTGAGG AGGCTTTTTT GGAGGCCTAG GCTTTTGCAA  
 2901 AAAGCTCCCG GGAGCTTGTA TATCCATTTT CGGATCTGAT CAAGAGACAG  
 2951 GATGAGGATC GTTTCGCATG ATTGAACAAG ATGGATTGCA CGCAGGTTCT  
 3001 CCGGCCGCTT GGGTGGAGAG GCTATTCCGC TATGACTGGG CACAACAGAC  
 3051 AATCGGCTGC TCTGATGCCG CCGTGTTCGG GCTGTCAGCG CAGGGGCGCC  
 3101 CGGTTCTTTT TGTCAAGACC GACCTGTCCG GTGCCCTGAA TGAAGTCAG  
 3151 GACGAGGCAG CGCGGCTATC GTGGCTGGCC ACGACGGGCG TTCCTTGCGC  
 3201 AGCTGTGCTC GACGTTGTCA CTGAAGCGGG AAGGGACTGG CTGCTATTGG  
 3251 GCGAAGTGCC GGGGCAGGAT CTCCTGTCAT CTCACCTTGC TCCTGCCGAG  
 3301 AAAGTATCCA TCATGGCTGA TGCAATGCGG CGGCTGCATA CGCTTGATCC  
 3351 GGCTACCTGC CCATTGCACC ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC  
 3401 GTACTCGGAT GGAAGCCGGT CTTGTGATC AGGATGATCT GGACGAAGAG  
 3451 CATCAGGGGC TCGCGCCAGC CGAACTGTTC GCCAGGCTCA AGGCGCGCAT  
 3501 GCCCGACGGC GAGGATCTCG TCGTGACCCA TGGCGATGCC TGCTTGCCGA  
 3551 ATATCATGGT GGAAAATGGC CGCTTTTCTG GATTTCATCGA CTGTGGCCGG  
 3601 CTGGGTGTGG CGGACCGCTA TCAGGACATA GCGTTGGCTA CCCGTGATAT  
 3651 TGCTGAAGAG CTTGGCGGCG AATGGGCTGA CCGCTTCCTC GTGCTTACG  
 3701 GTATCGCCGC TCCCATTTCG CAGCGCATCG CCTTCTATCG CCTTCTGAC  
 3751 GAGTTCCTCT GAGCGGGACT CTGGGGTTTCG AAATGACCGA CCAAGCGACG  
 3801 CCCAACCTGC CATCACGAGA TTTCGATTCC ACCGCCGCCT TCTATGAAAG  
 3851 GTTGGGCTTC GGAATCGTTT TCCGGGACGC CGGCTGGATG ATCCTCCAGC  
 3901 GCGGGGATCT CATGCTGGAG TTCTTCGCCC ACCCCAACCT GTTTATTGCA  
 3951 GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCACAAAT TCACAAATAA  
 4001 AGCATTTTTT TCACTGCATT CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATG  
 4051 TATCTTATCA TGTCTGTATA CCGTCGACCT CTAGCTAGAG CTTGGCGTAA  
 4101 TCATGGTCAT AGCTGTTTCC TGTGTGAAAT TGTTATCCGC TCACAATTCC  
 4151 ACACAACATA CGAGCCGAA GCATAAAGTG TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT  
 4201 GAGTGAGCTA ACTCACATTA ATTGCGTTGC GCTCACTGCC CGCTTTCCAG  
 4251 TCGGGAAACC TGTCGTGCCA GCTGCATTAA TGAATCGGCC AACCGCGGG  
 4301 GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GGCGCTCTTC CGCTTCCTCG CTCACTGACT  
 4351 CGCTGCGCTC GGTGCTTCGG CTGCGGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG  
 4401 GCGGTAATAC GGTATCCAC AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT  
 4451 GTGAGCAAAA GGCCAGCAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC  
 4501 TGGCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA  
 4551 CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGAATAAAA GATACCAGGC  
 4601 GTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC  
 4651 TTACCGGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GGCCTTTCT  
 4701 CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA  
 4751 GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCTTCA GCCCGACCGC TGCGCCTTAT  
 4801 CCGGTAAC TAAGACACGA CTTATCGCCA  
 4851 CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG  
 4901 TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGAA  
 4951 CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA  
 5001 GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT  
 5051 TTTTGTGTTG AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG

Figura 2C

```

5101 ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAACCTCA
5151 CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT
5201 CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT
5251 AAACCTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA
5301 GCGATCTGTC TATTTCTGTT ATCCATAGTT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA
5351 GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA
5401 TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACCCAG
5451 CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC
5501 CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG
5551 TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGCCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA
5601 CGCTCGTCGT TTGGTATGGC TTCATTGAGC TCCGGTTCCC AACGATCAAG
5651 GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTTGTGCAA AAAAGCGGTT AGTCTCCTCG
5701 GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGTT ATCACTCATG
5751 GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG
5801 CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA
5851 TGCGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT CAATACGGGA TAATACCGCG
5901 CCACATAGCA GAACTTTAAA AGTGCTCATC ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG
5951 GCGAAAACCTC TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC
6001 CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTTACTTT CACCAGCGTT
6051 TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGCAAAAA AGGGAATAAG
6101 GGCGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCTTTTTT CAATATTATT
6151 GAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCATCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT
6201 ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCCG CGCACATTTT CCCGAAAAGT
6251 GCCACCTGAC GTCGACGGAT CGGGA

```