

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 029**

51 Int. Cl.:

C07K 1/22

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2008 PCT/EP2008/065346**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2009 WO09062942**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2008 E 08850855 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2220107**

54 Título: **Polipéptidos de afinidad doble para purificación**

30 Prioridad:

12.11.2007 EP 07120454

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

22.05.2017

73 Titular/es:

**CHRETO APS (100.0%)
Lejrvej 17, 1.
3500 Værløse, DK**

72 Inventor/es:

KYHSE-ANDERSEN, JAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 613 029 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

Polipéptidos de afinidad doble para purificación

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación de una biomolécula diana sobre un soporte sólido, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto (i) una biomolécula diana, (ii) un polipéptido de afinidad doble y (iii) un soporte sólido que comprende un ligando de captura, como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

La recuperación y purificación de proteínas terapéuticas supone aproximadamente el 50 % de los costes de fabricación de los fármacos biológicos. Los procedimientos de purificación industriales generales a menudo incluyen varias etapas de operación unitarias, como la extracción, la precipitación así como cromatografía de intercambio aniónico y catiónico. La cromatografía de afinidad es la etapa de procedimiento aguas abajo preferente debido a su elevada recuperación, rendimiento y especificidad, pero el coste actual y las limitaciones de la cromatografía de afinidad son muy sustanciales y en muchos casos prohibitivos para un uso más general de esta operación unitaria. Para una descripción general de procedimientos de purificación convencionales que incluyen cromatografía de afinidad véase, por ejemplo, Jason y Rydén 1998 (Jason, J-C y Rydén, L., Protein Purification: Principles, high-Resolution, Methods and Applications, 2ª edición, Wiley & sons Inc. Nueva York, 1998).

La cromatografía de afinidad convencional se caracteriza en general por tener un ligando de captura inmovilizado en una matriz de fase sólida. El ligando se une de forma reversible a una molécula diana presente en un fluido tal como un medio de cultivo líquido o suero. Las moléculas diana se recuperan mediante la disociación del complejo en condiciones de elución. Las matrices de afinidad disponibles de forma comercial están en un formato listo para el uso que incluye ligandos de captura unidos a las matrices de forma covalente. En la cromatografía de afinidad convencional, la constante de disociación, K_D , entre el ligando y la proteína diana está en el intervalo de aproximadamente 10^{-5} - 10^{-7} M. Las interacciones con constantes de disociación que exceden 10^{-10} - 10^{-11} M a menudo son imposibles de usar dado que las condiciones necesarias para disociar el complejo son, entonces, las mismas que las que dan como resultado la desnaturalización de las proteínas diana. La técnica anterior incluye variaciones alternativas de los procedimientos de purificación por cromatografía de afinidad descritos en la bibliografía (Wilchek, M. y Gorecki, M. (1973), A New Approach for isolation of Biologically Active Compounds by Affinity Chromatography: Isolation of Trypsin).

FEBS Letters. 31, 1, 149-152, describe anticuerpos inmovilizados sobre un material insoluble. Los anticuerpos tienen afinidad por un determinado ligando unido a un complejo de dos o más proteínas, y son independientes de las propiedades químicas, físicas y biológicas del propio complejo. La matriz de anticuerpo inmovilizado sirve como medio para la concentración del complejo. Después, el complejo adsorbido puede recuperarse de la columna mediante elución. Para formar el complejo los inventores utilizan la enzima tripsina que reacciona con el inhibidor de la tripsina de soja dinitrofenilado (DNP-ITS). El complejo se adsorbe a una columna DNP y se eluye en condiciones que disocian la unión antígeno-anticuerpo. Después, la columna de afinidad está lista para el siguiente ciclo de purificación. En una etapa posterior, la tripsina diana se obtiene mediante separación del complejo enzima - inhibidor de la tripsina de soja dinitrofenilada en sus componentes.

Este procedimiento es distinto de la presente invención en que la columna de afinidad es reutilizable, y es la unión entre el agente inmovilizado y el conector lo que se disocia durante la elución y no el enlace entre el conector y la biomolécula diana.

Otro concepto descrito por Hammarbergh, B. y col., (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 86, 4367-4371 (1989)), es una estrategia por afinidad de proteína de fusión y su uso para expresar el factor de crecimiento similar a insulina II humano recombinante. El procedimiento se refiere a una proteína diana recombinante de interés (X) fusionada entre dos colas de proteína de afinidad distintas (A y B). La proteína (X) tiene un sitio sensible a proteasa. En primer lugar se pasa a través de una columna de afinidad que contiene un ligando específico para la cola B, un lisado celular que contiene la proteína de fusión tripartita recombinante. Por lo tanto, puede obtenerse una mezcla de proteína de longitud completa y de fragmentos proteolíticos que contienen la región C terminal de la proteína de fusión. En un segundo pasaje a través de una columna de afinidad específica para la cola A, las proteínas degradadas fluyen mientras se retiene la proteína de fusión de longitud completa. Después de la escisión específica de sitio de las colas, se obtiene la proteína de interés (X) pasando la mezcla de escisión a través de una columna de afinidad mixta para las colas A y B, y recogiendo el flujo de paso. Los inventores describen un procedimiento para obtener la proteína diana expresando la proteína diana como una parte integrada en medio de una construcción de proteína de afinidad doble.

Esto es distinto de la presente invención dado que el procedimiento de afinidad descrito requiere dos columnas de afinidad distintas y que el ligando inmovilizado en la columna y la proteína de fusión de afinidad doble se disocian para recuperar la biomolécula diana. Después de la etapa de elución y de un procedimiento de regeneración, las columnas de afinidad están listas para el siguiente ciclo de purificación de afinidad. La proteína diana es solo parte de la proteína de fusión y se obtiene siguiendo etapas de degradación enzimática.

En un artículo de revisión de Ford, C.F., Suominen, I., Glatz, C. E. (1991) Fusion Tails for the Recovery and Purification of Recombinant Proteins. Protein Expression and Purification, 2, 95-107, los inventores discuten las aplicaciones y las ventajas del uso de los sistemas de colas de fusión para promover la recuperación y purificación eficaces de proteínas recombinantes a partir de extractos celulares crudos o de medios de cultivo. En estos sistemas, se modifica por ingeniería genética una proteína diana para que contenga una cola de polipéptido C o N terminal, la cual proporciona la base bioquímica para la especificidad en la recuperación y la purificación. Las colas de fusión son útiles para potenciar los procedimientos de recuperación para el procesamiento aguas abajo industrial. No obstante, para la purificación de las proteínas diana se incluye un sitio para la escisión enzimática específica, lo que permite la eliminación de la cola después de la recuperación. El artículo describe la aplicación de proteínas de fusión con un compañero de unión que tiene afinidad por el ligando inmovilizado sobre una matriz. Los procedimientos incluyen una etapa de escisión enzimática para recuperar la proteína diana a partir de la cola de fusión según sea necesario.

Esto es distinto de la presente invención dado que, para recuperar la proteína, el procedimiento de afinidad descrito requiere que la proteína de fusión se disocie del ligando inmovilizado en la matriz de columna. Después de la etapa de elución y de un procedimiento de regeneración, la columna de afinidad está lista para el siguiente ciclo de purificación de afinidad. Además, es distinto de la presente invención en que la proteína diana es parte de la proteína de fusión y solo se obtiene después de una etapa de procesamiento enzimático.

En Rigaut, G. y col. (1991) (A Generic Protein Purification Method for Protein Complex Characterization and Proteom Exploration. Nature Biotechnology, 17, 1030-1032), se describe un procedimiento genérico para la purificación de complejos de proteína que utilizan una etiqueta de purificación por afinidad en tándem (PAT). La purificación requiere una etapa de afinidad seguida de una etapa enzimática que escinde la primera etiqueta de afinidad del complejo, y una segunda etapa de purificación de afinidad para recuperar el complejo de la proteína diana a partir de la proteasa. En conjunto, el procedimiento implica dos compañeros de unión en combinación tanto para la unión a un ligando inmovilizado en una matriz de columna como para una etapa de escisión por proteasa para exponer el segundo compañero de unión.

Esto es distinto de la presente invención dado que el procedimiento de afinidad descrito requiere que la proteína de fusión se disociada del ligando inmovilizado en la matriz de columna para recuperar la proteína. Después de la etapa de elución y de un procedimiento de regeneración, la columna de afinidad está lista para el siguiente ciclo de purificación de afinidad. Además, es distinto de la presente invención en que la proteína diana es parte de la proteína de fusión y se obtiene después de una etapa de procesamiento enzimático.

El documento EP1529844 describe un procedimiento para modificar las propiedades de una proteína diana recombinante, que implica la coexpresión de la proteína diana y del compañero de unión. La proteína diana y el compañero de unión forman un complejo en la célula. La formación del complejo da como resultado propiedades modificadas tales como la acumulación, estabilidad y/o integridad, la localización subcelular, las modificaciones postraduccionales, la purificación y el comportamiento de partición de fase de las proteínas diana naturales y recombinantes, expresadas en un organismo hospedador. El compañero de unión puede proporcionar una etiqueta de afinidad que permite la copurificación del complejo y la proteína diana contenida en el. Esta descripción es distinta de la presente invención dado que describe una coexpresión de ligante y la diana para formar un complejo en la célula. El procedimiento desvelado es para la modificación de las propiedades de la proteína diana en general, mientras que la presente invención describe un polipéptido de afinidad doble diseñado de forma específica para facilitar un procedimiento de purificación exclusivo en el que los polipéptidos de afinidad doble necesitan poseer propiedades de unión específicas.

Linder y col., (Linder, M., Nevanen, T., Söderholm, L., Bengs, O. y Teeri, T., 1998, Biotechnology and Bioengineering, 60(5): 642-647) describen el uso del CBD (siglas del inglés *cellulose binding domain*, dominio de unión a celulosa) en proteínas de fusión para su uso como una etiqueta de afinidad para la purificación. Se observó algo de filtración de la columna.

Shpigel, E. y col. (Biotechnol. Appl. Biochem. (2000) 31, 197-203, "Expression, purification and application of Staphylococcal Protein A fused to cellulose-binding domain"), describen un ejemplo de purificación de IgG utilizando un polipéptido de afinidad doble Proteína A-CBD.

Ellos reivindican que evitaron los procedimientos de acoplamiento caros eligiendo la funcionalidad de la inmovilización de la proteína A a una fase sólida a través del dominio de unión a celulosa (CBD) de una proteína de fusión. La proteína de fusión se inmoviliza en la columna antes de añadir la diana.

Debido a los problemas de filtración, esta elección de una molécula de afinidad doble no es adecuada para aplicaciones biofarmacéuticas.

Sano y col. (patente de Estados Unidos 5.328.985) describe una proteína de fusión que consiste en estreptavidina y uno o dos dominios de unión a inmunoglobulina G (IgG) de la proteína A expresada en *Escherichia coli*. La proteína de fusión estreptavidina-proteína A (ET-PA) tiene sitios de unión a biotina e IgG funcionales. Sano describe adicionalmente complejos de la proteína de fusión estreptavidina-proteína A, un anticuerpo monoclonal para la

seroalbúmina bovina (BSA) y peroxidasa de rábano picante biotinilada. Sano también describe un procedimiento de marcado de células utilizando la proteína de fusión ET-PA. Las células se incuban con un anticuerpo para el antígeno de superficie celular, Thy-1. Posteriormente, se añade a la suspensión celular el complejo marcador biotinilado de proteína quimérica. Esta técnica se utilizó para entregar FITC biotinilado a la superficie de las células que tienen antígenos Thy-1 en su superficie.

Sin embargo, Sano no describe o sugiere el uso de la proteína de fusión ET-PA como una herramienta para fines de purificación, ni describe un procedimiento de materiales de columna de cromatografía de afinidad de un solo uso, ni la recuperación de una proteína diana.

El documento WO 97/19957 describe una invención relacionada con la entrega de toxinas o de ácidos nucleicos en tipos celulares específicos utilizando para el fin proteínas de fusión ET-PA. De forma similar a Sano y col. (ver anteriormente), un anticuerpo reconoce un antígeno de superficie en la superficie celular. La ET-PA se une al anticuerpo y facilita el ligamiento a una toxina biotinilada unida al sitio de unión a biotina. Sin embargo, no se describe o sugiere el uso de la proteína de fusión ET-PA como una herramienta para los fines de purificación.

El documento WO 01/95857 desvela un procedimiento y los componentes para extraer sustancias tóxicas a partir de sangre de mamífero. El procedimiento incluye preparar una columna de afinidad (~dispositivo extracorporeal) y un procedimiento para la extracción extracorporeal de material tóxico a partir de fluidos corporales de mamífero en relación con el diagnóstico o el tratamiento de una afección o enfermedad de mamífero.

La columna de afinidad extracorporeal ejemplificada en la patente se fabrica acoplando entidades biotiniladas a una matriz que contiene avidina inmovilizada. La entidad biotinilada incluye una parte que se une de forma fuerte a la toxina en la sangre de mamífero. El material tóxico se elimina (es decir, se inmoviliza pero no se recupera mediante elución de la columna) de la sangre después de un procedimiento de cromatografía de afinidad convencional. El producto del procedimiento de cromatografía de flujo de paso es sangre purificada, dado que la diana (los materiales tóxicos) permanece inmovilizada en la columna después del procedimiento.

Esto es distinto de la presente invención dado que describe un procedimiento que une la diana de forma firme, con alta afinidad, para eliminar la diana del producto. El procedimiento de purificación también es distinto de la presente invención, dado que el producto no se une a la columna de afinidad, pero fluye y se recoge como empobrecido en el material tóxico (la diana). El material tóxico no se libera o recupera.

El documento WO 97/09068 desvela un procedimiento y componentes químicos que modifican la constante de disociación en equilibrio entre dos parejas de biomoléculas. El componente químico es un polímero que puede estimularse para cambiar de conformación y, por lo tanto, la eficacia de unión. El polímero se acopla, por ejemplo, a un sitio específico del compañero de unión (el ligando) inmovilizado en la matriz de la columna de cromatografía de afinidad. El documento WO 97/09068 no describe o sugiere el uso de un componente de afinidad doble para la purificación de afinidad, ni la recuperación de las moléculas diana.

En general, son convenientes los procedimientos que mejoren la eficiencia de captura y simplifiquen el procedimiento de purificación, así como que reduzcan los costes.

Sumario de la invención

La presente invención mejora de forma significativa y simplifica el procesamiento aguas abajo y reduce el coste de los procesos de cromatografía de afinidad en general. La presente invención incluye un ligando de captura genérico inmovilizado a una matriz, una biomolécula diana y un polipéptido de afinidad doble semigenérico, con distinta afinidad de unión para la diana y el ligando de captura, respectivamente. El polipéptido de afinidad doble reacciona con la biomolécula diana para formar un complejo de afinidad media de unión, y el complejo se une de forma no covalente a una matriz de afinidad genérica con una fuerte afinidad de unión. La biomolécula diana se recupera de la matriz genérica mediante elución específica, dejando el polipéptido de afinidad doble unido al ligando de captura sobre la matriz, debido a la estrecha unión al ligando, impidiendo la filtración de la matriz de fase sólida.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la purificación de una biomolécula diana, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto (i) una biomolécula diana, (ii) un polipéptido de afinidad doble y (iii) un soporte sólido que comprende un ligando de captura o un sitio de unión a polipéptido de afinidad doble, en el que la proporción entre las constantes de disociación en equilibrio del polipéptido de afinidad doble, $[K_{D,t}/K_{D,s}]$ es de al menos 10^0 en condiciones convencionales, y (b) recuperar la biomolécula diana mediante elución.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la purificación de una biomolécula diana, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto (i) un polipéptido diana, (ii) un polipéptido de afinidad doble, y (iii) un soporte sólido que comprende un ligando de captura, en el que el polipéptido de afinidad doble tiene una constante de disociación en equilibrio, $K_{D,t}$ para la biomolécula diana en el intervalo de 10^{-2} a 10^{-13} M, de forma más particular de 10^{-4} a 10^{-13} M en condiciones convencionales y en el que la unión del polipéptido de afinidad doble al ligando de captura sobre el soporte sólido se proporciona mediante la escisión de una bencilguanina para-sustituída, lo que da como resultado un enlace de tioéter; y (b) recuperar la biomolécula diana mediante elución.

Descripción detallada de la invención

En la cromatografía de afinidad convencional, el ligando de captura se une de forma directa al soporte. Los principales desafíos técnicos son para optimizar el sistema completo con respecto por ejemplo al acoplamiento de ligando, la naturaleza del material de soporte, el flujo, la contrapresión y las dimensiones físicas de la columna. Debe entenderse que varias de las limitaciones técnicas de las columnas de afinidad de alto rendimiento están estrechamente vinculadas, lo que hace difícil la optimización del rendimiento y los costes así como el cambio de escala. El ligando, en la cromatografía de afinidad tradicional, preferentemente posee las siguientes características:

- a) El ligando debe tener propiedades químicas que permitan la unión covalente fácil a la matriz.
- b) El ligando debe tener la capacidad de formar un complejo reversible con la molécula diana.
- c) La especificidad de la afinidad del ligando por la molécula diana debe ser apropiada para la aplicación planeada.
- d) La constante de disociación para el complejo ligando-molécula diana en "condiciones de carga" debe ser lo suficientemente fuerte para permitir la formación de complejos estables o para proporcionar suficiente retardo en la elución de la molécula diana.
- e) Debe ser fácil disociar el ligando de la molécula diana cambiando las condiciones, por ejemplo el pH o la concentración de sales, sin dañar a ninguno de forma irreversible.

Además, en la cromatografía de afinidad tradicional, el ligando normalmente está unido de forma covalente a la matriz y es también el componente que se une a la molécula diana.

La capacidad y calidad de purificación está influenciada en gran medida por el tiempo de contacto en la columna de afinidad entre la diana y el ligando, el denominado tiempo de residencia.

Además de la velocidad de asociación de la proteína diana a un ligando inmovilizado, la difusión dentro de los poros entre las perlas de la cromatografía en la columna y la transferencia de masa de la proteína a partir del soluto afectará la capacidad de unión dinámica de una matriz de cromatografía.

La transferencia de masa de la proteína diana a partir del soluto depende de una diversidad de factores, que incluyen el tipo y el grado de entrecruzamiento, la compresibilidad del material de soporte, el tamaño de los poros y el tamaño físico de la proteína diana.

Los caudales, las concentraciones de proteína, el largo de la columna, la temperatura, el tampón, la conductividad y el pH también pueden influir sobre la difusión en el poro y la capacidad de unión dinámica del adsorbente.

Debido a la necesidad de un desarrollo rápido de los procesos aguas abajo y de limitaciones reguladoras, el tiempo de residencia para un tipo particular de producto biológico tal como, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico se fija normalmente en el desarrollo temprano. Por lo tanto, a menudo se intenta ajustar el caudal en la columna a gran escala con, por ejemplo, alturas de lecho más grandes, para mantener el tiempo deseado de residencia utilizado durante el desarrollo a pequeña escala.

Debido a las limitaciones técnicas y a la gran inversión necesaria para adquirir equipamiento de cromatografía para la escala del procedimiento, el cambio de escala de la cromatografía de afinidad de alto rendimiento tradicional es un gran desafío.

La presente invención sugiere un procedimiento de cambio de escala más simple y flexible con menos limitaciones técnicas.

Además, la cromatografía de afinidad convencional se caracteriza por los procedimientos de regeneración para proporcionar usos repetidos de los materiales de columna. Estos procedimientos de limpieza necesitan una validación extensa para permitir múltiples usos de la columna.

La presente invención difiere en varios aspectos de la cromatografía de afinidad convencional, por ejemplo

- el ligando inmovilizado se une de forma firme al polipéptido de afinidad doble (PAD) para impedir la disociación en las condiciones de elución
- está destinada a aplicaciones de un único uso.

A partir de lo anterior está claro que en la presente invención el papel del ligando es unirse a la molécula de PAD y no a la molécula diana.

El beneficio atractivo de la cromatografía de afinidad es que proporciona un gran aumento de la pureza con una pérdida mínima del material de molécula diana en una única operación unitaria. Sin embargo, la cromatografía de afinidad también se caracteriza por los elevados costes que hacen prohibitivo el uso de columnas grandes y favorecen así el uso repetitivo de columnas más pequeñas. Esto conduce a procesos de producción prolongados y a una pérdida de capacidad proporcional a la cantidad de reutilizaciones de la columna, una pérdida aumentada y/o la modificación de la molécula diana. En principio, una matriz de cromatografía de afinidad típica puede utilizarse

durante hasta 100 o más ejecuciones, pero la cantidad promedio de ejecuciones a la escala de fabricación parece ser varias veces menor. Una de las razones por las que la matriz se desecha mucho antes del final de su vida útil teórica es que las columnas de afinidad utilizadas en la fabricación se dimensionan para procesar el lote de fermentación completo en mucho menos de 100 ejecuciones - para ahorrar costes, pero también reducir el riesgo de contaminación y de fallas de manipulación. En lugar de utilizar la misma matriz para varios lotes de fermentación, la matriz puede desecharse después del procesamiento de un lote de fermentación, lo que conduce a la relativa baja cantidad de ejecuciones promedio en una matriz de afinidad.

El control del caudal a través del soporte de una cromatografía de afinidad es importante para conseguir la unión. El caudal a través del soporte de la columna está relacionado de forma insoluble a la eficacia de la separación; un flujo demasiado rápido provocará que la fase móvil pase por las perlas más rápido que el tiempo de difusión necesario para alcanzar el volumen de las perlas internas.

Para cada aplicación se puede seleccionar un caudal para conseguir un balance óptimo entre la unión eficaz y la elución de la proteína diana y una separación rápida. La cromatografía de flujo dirigido por gravedad es muy lenta y la resolución de la separación de la proteína puede verse afectada de forma desfavorable por efectos de difusión secundarios. Por lo tanto, los sistemas modernos tienen un bombeo activo para controlar los caudales y el control continuo de la contrapresión para asegurar que no se esté excediendo la contrapresión de funcionamiento máxima.

En las columnas convencionales las obstrucciones son una preocupación importante. Los residuos, las proteínas y las sales pueden acumular capas de obstrucción en los canales de los soportes de la cromatografía de afinidad de alto rendimiento, dando como resultado caudales cambiados, velocidades de transferencia de masa reducidas, una contrapresión aumentada y ligandos de afinidad ocultos y desactivados. En especial, los materiales lipídicos y de lipoproteínas pueden atascar rápidamente las columnas de cromatografía y a menudo es necesario eliminarlos antes de la purificación de afinidad. Esto es especialmente importante para las muestras obtenidas a partir de líquido ascítico.

Esta etapa de prepurificación puede realizarse mediante etapas de precipitación con, por ejemplo, sulfato de dextrano y polivinilpirrolidina, seguido de centrifugación y diálisis o desalado. La etapa puede dar como resultado la pérdida del 5-10 % de la proteína diana.

Para el sistema de purificación de afinidad de la presente invención puede ser posible la omisión de la etapa de deslipidación, dado que la columna es de único uso. Esto dará como resultado una recuperación global más elevada de la diana y un flujo de trabajo de procesamiento aguas abajo más eficaz.

Debido al uso único pretendido de las columnas de acuerdo con la invención, la etapa de elución también se simplifica. Dado que el material de soporte de la invención no es para reutilizar, las condiciones de elución se pueden seleccionar de forma más libre. Por ejemplo, es posible seleccionar cualquiera de los tampones de elución con una concentración elevada no convencional de sales, caotropos fuertes, disolventes orgánicos, etc., lo que permitirá la recuperación de la diana intacta y dejará la molécula de PAD unida al soporte. No tiene importancia si las propiedades del material de soporte se cambian de forma irreversible con respecto a, por ejemplo, las características de la estructura y del flujo, y no puede reutilizarse.

Esta flexibilidad en la selección de las condiciones de elución a menudo no es posible cuando se utilizan sistemas de purificación de afinidad de alto rendimiento tradicionales dado que las estructuras y las superficies internas están elevadamente optimizadas y son sensibles al hinchamiento o la precipitación del polímero. De forma adicional, debido al coste de las columnas de afinidad tradicionales, los operarios pueden ser reacios a probar nuevas condiciones de elución reduciendo aún más la flexibilidad de la optimización de la elución.

La operación tradicional de la purificación de afinidad incluye ciclos de equilibrado, carga de la muestra, elución y de limpieza sin desmontar (LSD).

Las etapas de limpieza o los protocolos de desinfección tienen que diseñarse para la purificación de cada diana específica. Como se describe anteriormente, la acumulación de capas de obstrucción o la contaminación cruzada entre ejecuciones durante el funcionamiento, es una preocupación importante.

A menudo, la etapa de limpieza incluye utilizar tampones químicamente severos como NaOH 0,1 M/NaCl 1 M o ácido fosfórico 0,1 M en una combinación con cloruro de sodio o etanol, seguido de regeneración. Está bien establecido que, en general, la capacidad de unión dinámica disminuye a medida que la cantidad de ciclos de LSD aumenta. Por lo tanto, se necesita encontrar un óptimo entre la calidad de la diana purificada, el número de ejecuciones, las LSD, y el tamaño y el coste de la columna particular. Adicionalmente, para la mayoría de las purificaciones farmacéuticas se precisa controlar el cambio de la calidad de purificación.

Como se sugiere en la presente invención, el coste de esta validación de calidad, y la optimización de la LSD y las ejecuciones puede reducirse enormemente.

En la cromatografía de afinidad convencional descrita anteriormente para la purificación de, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, el ligando de captura (Proteína A), se une a una matriz de fase sólida y tiene afinidad para la biomolécula diana (anticuerpos monoclonales). La presente invención proporciona ventajas en comparación con las

tecnologías de purificación de afinidad convencionales para la industria del procesamiento aguas abajo debido a los costes más bajos, la especificidad elevada y la facilidad de uso sin comprometer la calidad de los procesos aguas abajo. Una característica esencial de la presente invención es el uso de un polipéptido de afinidad doble como un conector entre la molécula diana y el soporte sólido que comprende un ligando. Estos polipéptidos de afinidad doble son particularmente útiles para el procesamiento aguas abajo de las proteínas y péptidos biofarmacéuticos y de diagnóstico.

La invención sugiere la mejora del procedimiento completo de purificación de afinidad eliminando varias de las limitaciones de los sistemas actuales.

Utilizando el polipéptido de afinidad doble (PAD) y los soportes genéricos de la invención, la mayoría de los problemas y limitaciones anteriores se puede eliminar de forma completa, o reducir.

De acuerdo con la presente invención, la tecnología de purificación de afinidad doble se caracteriza por un soporte sólido genérico, el cual, en una realización, es una matriz de fase sólida, más los polipéptidos de afinidad doble específicos listos para su uso que sirven como moléculas conectoras. Un polipéptido de afinidad doble reacciona con la biomolécula diana. Posteriormente, el complejo polipéptido de afinidad doble - biomolécula diana conecta de forma no covalente con un ligando de captura inmovilizado sobre un soporte sólido, poniendo en contacto el complejo y el soporte sólido. La biomolécula diana se recupera mediante elución específica. Durante la elución el polipéptido de afinidad doble permanece unido al ligando sobre el soporte sólido.

Por lo tanto, en un aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación de una biomolécula diana, que comprende las etapas de : (a) poner en contacto (i) una biomolécula diana, (ii) un polipéptido de afinidad doble y (iii) un soporte sólido que comprende un ligando de captura o un sitio de unión a polipéptido de afinidad doble, en el que la proporción entre las constantes de disociación en equilibrio del polipéptido de afinidad doble, $[K_{D,t}/K_{D,s}]$ es al menos 10^0 en condiciones convencionales; y (b) recuperar la biomolécula diana mediante elución.

El polipéptido de afinidad doble actúa como el compañero de ligamiento entre el soporte sólido y la molécula diana. En una realización particular, la afinidad del polipéptido de afinidad doble por el ligando inmovilizado es más fuerte que la afinidad por la molécula diana. Además, esta diferencia en la afinidad de unión puede expresarse como la proporción entre las constantes de disociación en equilibrio. En una realización esta proporción es al menos de 1.

El polipéptido de afinidad doble de acuerdo con la invención comprende al menos dos sitios de unión, de los cuales, un sitio de unión tiene afinidad por el ligando y otro sitio de unión tiene afinidad por la molécula diana. Estos sitios de unión son a base de polipéptido lo que significa que comprenden ya sea proteínas completas o fragmentos de proteínas. Tales fragmentos deberían al menos comprender la parte de la proteína que contiene el sitio de unión para la diana específica. El polipéptido de afinidad doble podría ser un polipéptido de fusión o podrían ser dos o más polipéptidos ligados de forma química en cualquier modo adecuado, por ejemplo, mediante un segmento conector.

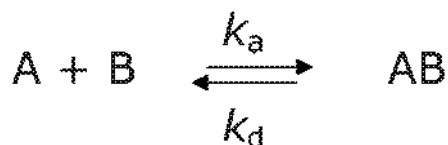
Por lo tanto, en realizaciones adicionales la presente invención se refiere a un polipéptido de afinidad doble que tiene una constante de disociación en equilibrio para una biomolécula diana, $K_{D,t}$, en el intervalo de 10^{-2} a 10^{-13} M, por ejemplo 10^{-8} M y una constante de disociación en equilibrio para un ligando de captura, $K_{D,s}$, en el intervalo de 10^{-9} a 10^{-16} M, por ejemplo 10^{-10} M, y al mismo tiempo la proporción $K_{D,t}/K_{D,s}$, debería coincidir de forma que la proporción sea de al menos 10^0 , de forma más particular al menos 10^1 , de forma más particular 10^2 , de forma más particular 10^3 o incluso de forma más particular 10^4 .

En otras palabras, lo anterior significa que la unión del PAD a la diana es, en realizaciones preferentes, más débil que la unión del PAD al ligando.

De forma particular, el dicho polipéptido de afinidad doble tiene una constante de disociación en equilibrio, $K_{D,t}$ para el polipéptido diana en el intervalo de 10^{-4} a 10^{-13} M, de forma más particular en el intervalo de 10^{-6} a 10^{-13} M y una constante de disociación en equilibrio, $K_{D,s}$, para el ligando de captura en el intervalo de 10^{-9} a 10^{-16} M, de forma más particular en el intervalo de 10^{-11} a 10^{-16} M.

En general, la unión al ligando o la columna no puede ser demasiado fuerte. Por lo tanto, el valor en el extremo superior del intervalo no es importante con respecto a la $K_{D,s}$.

En el contexto de la presente invención, la constante de disociación en equilibrio se mide de acuerdo con la reacción:



A y B representan los compañeros de unión: la biomolécula diana y el polipéptido de afinidad doble, o el polipéptido

de afinidad doble y el ligando de captura inmovilizado sobre la matriz de fase sólida.

Las constantes de velocidad para la reacción anterior representan la velocidad a la que las dos moléculas A y B se asocian y disocian.

$$\text{Tasa de disociación} \quad - \frac{d[AB]}{dt} = k_d [AB]$$

$$\text{Tasa de asociación:} \quad \frac{d[AB]}{dt} = k_a [A][B]$$

- 5 Cuando las velocidades son iguales en el equilibrio, $k_a[A][B] = k_d [AB]$, lo que da

$$\frac{k_d}{k_a} = \frac{[A][B]}{[AB]} = K_D$$

$$\frac{k_a}{k_d} = \frac{[AB]}{[A][B]} = K_A$$

- 10 El dominio de unión candidato a emplear en el polipéptido de afinidad doble debería evaluarse de acuerdo con las constantes de disociación en equilibrio aparentes a base de la afinidad de unión total de cada una de las afinidades dobles en una dada molécula PAD, independientemente de si contiene uno o varios dominios de unión para cada especificidad (diana/ligando de captura). Si, por ejemplo, A y B representan la proteína A (tiene de cuatro a cinco dominios de unión) y la avidina (que tiene cuatro sitios de unión), respectivamente, los intervalos anteriores deberían aplicarse para una molécula de proteína A fusionada a una molécula de avidina. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que, por ejemplo, la molécula de PAD pudiera estar compuesta de varios candidatos de unión para la
- 15 diana y varios candidatos para el ligando sobre la matriz. El PAD podría, por ejemplo, en otra realización, consistir en 3 moléculas de proteína A ligadas a una o más moléculas de avidina. Por lo tanto, los intervalos especificados, como se define anteriormente, deberían, en el contexto de la presente invención, evaluarse a base de las constantes de unión aparentes para los dominios de unión en común.

- 20 En el contexto de la presente invención, las constantes de disociación en equilibrio especificadas se determinan mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (RPS) utilizando un instrumento Biacore, como se ilustra en detalle en los ejemplos. Las condiciones descritas en el presente documento representan las condiciones convencionales. Como un punto de partida adecuado para la selección de distintos dominios de unión a combinar en la molécula de PAD, se pueden utilizar las K_D publicadas.

- 25 Las dos parejas de unión debían seleccionarse a base de las K_D durante las condiciones de unión específicas, pero también considerando las condiciones de elución planeadas, cuando la diana se recupera y la molécula de PAD permanece en el soporte.

- 30 Como se describe anteriormente, la determinación de las afinidades de disociación de diversos dominios de unión en el contexto de una molécula de PAD se lleva a cabo utilizando resonancia de plasmón superficial (RPS). Tal evaluación puede realizarse con el sistema Biacore. Biacore tiene una instrumentación comercial en donde las mediciones a base de RPS hacen determinaciones sobre las interacciones proteína-proteína. La evaluación se realizó teniendo el PAD completo inmovilizado sobre el chip sensor utilizado en el instrumento Biacore. El sistema Biacore define las características de las proteínas en términos de su especificidad de interacción con otras moléculas, las velocidades a las que interactúan (asociación y disociación) y su afinidad (qué tan estrechamente se unen a otra molécula). Esta técnica se ha descrito, por ejemplo, para la determinación de interacciones de unión
- 35 entre anticuerpos específicos y sus diana (véase, por ejemplo, Rönnmark, 2002, Eur. J. Biochem., 269: 2647-2655).

En los ejemplos anteriores se han evaluado varios PAD candidatos y sus afinidades de unión en condiciones convencionales (como se describe en los ejemplos) se han medido para el PAD completo. También, pueden utilizarse otros procedimientos, sin embargo, los resultados pueden diferir. A continuación se describe un listado de procedimientos alternativos.

La medición cuantitativa de las interacciones no covalentes proteína-ligando es bien conocida. Los procedimientos adecuados para la medición cuantitativa de las constantes de unión de particular importancia para la presente invención, incluyen diversas versiones de la resonancia de plasmón superficial (RPS) y el dicróismo circular (DC).

- 5 Otros procedimientos incluyen procedimientos de espectrometría de masas para titulaciones dinámicas, como la titulación ESI-MS (ionización por electronebulización-espectrometría de masas), la titulación HPLC-ESI-MS (cromatografía líquida de alto rendimiento-ionización por electronebulización-espectrometría de masas) o la titulación MALDI-SUPREX (desorción/ionización láser asistida por matriz-SUPREX).

- 10 Otros procedimientos son a base de la determinación de la constante de disociación de un ligando en un sitio de unión de forma indirecta mediante el desplazamiento competitivo de un ligando radioactivo o mediante la medición del cambio químico de RMN en función de la concentración, el análisis por espectroscopia de fluorescencia de, por ejemplo, la extinción de señal, medición cristalográfica por rayos X de la ocupación de ligando, calorimetría isotérmica (CIT) o inhibición enzimática.

Aún otros procedimientos utilizan ligandos marcados, por ejemplo electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser de los ligandos marcados de forma enzimática.

- 15 Como alternativa, se pueden hallar las constantes de unión a partir de técnicas computacionales utilizando diseño *de novo*, la extracción de datos y algoritmos sofisticados.

En el contexto de la presente invención, los intervalos apropiados para las constantes de disociación en equilibrio, como se especifica en las reivindicaciones, deberían aplicarse al polipéptido de afinidad doble completo y no a las partes de unión individuales medidas por separado.

- 20 Además, si un único dominio de unión candidato tiene una capacidad de unión más débil para la diana o el ligando que la necesaria de acuerdo con la presente invención, todavía podría ser aplicable combinando varios de tales dominios de unión candidatos en un PAD.

- Esto es debido al efecto valencia. Es posible obtener una fuerza de unión aumentada debido a una ganancia de avidéz. Los dominios individuales con una baja afinidad intrínseca combinados en multímeros, a menudo generan efectos de avidéz que conducen a velocidades de disociación más lentas y afinidades funcionales aumentadas en más de 100 veces (MacKenzie, C. R. y col (1996), Analysis by surface plasmon resonance of the influence of valence on the ligand binding affinities and kinetics of and anti carbohydrate antibody. Journal of Biological Chemistry, 271, 1527-1533). Es posible medir los efectos de uniones las monovalentes y bivalentes, pero a valencias de unión más elevadas la situación se hace tan compleja que es imposible distinguir entre valencias de unión distintas. No obstante, pueden obtenerse datos relativos y utilizarse en el contexto de la presente invención.

La invención proporciona un procedimiento de purificación en el que la primera reacción entre la molécula diana y el polipéptido de afinidad doble se completa en solución libre. La cinética de unión de la reacción es aproximadamente 1000 veces más rápida en solución libre, en comparación con las reacciones de interfaz (Nygren, H. y Stenberg, M. (1989) Immunochemistry at interfaces. Immunology, 66, 321-327).

- 35 Los complejos molécula diana-polipéptido de afinidad doble posteriormente se presentan, y se unen de forma eficaz, al ligando en el soporte sólido. La unión fuerte (velocidad de asociación rápida y velocidad de disociación lenta de los ligandos con el polipéptido de afinidad doble) empobrece la fase móvil de complejos diana-PAD. Las moléculas diana se recuperan a partir de la solución a través de este procedimiento secuencial facilitado por la segunda funcionalidad de unión del polipéptido de afinidad doble.

- 40 Debido a las diferencias descritas en las constantes de disociación en equilibrio, el polipéptido diana puede eluirse de forma eficaz sin la elución del polipéptido de afinidad doble. En una realización, la elución puede realizarse cambiando ya sea el pH, la fuerza iónica o los iones caotrópicos en solución, o cualquier combinación de los mismos.

- 45 Se puede influir sobre el valor de la K_D cambiando condiciones como el pH, la fuerza iónica, la temperatura y propiedades polares. Desafortunadamente, los valores de la bibliografía para la K_D no siempre se enumeran las condiciones de elución relevantes. Sin embargo, el experto en la materia será capaz de encontrar condiciones de elución que solo rompan la unión más débil sin alterar la unión más fuerte, en los casos en donde la unión a la matriz sólida es suficientemente fuerte (es decir, $K_{D,s} < 10^{-9}$ M y la proporción entre los valores de K_D es al menos 1, cuando se mide en condiciones de unión convencionales).

- 50 Los criterios para la selección de las parejas de unión específica a la diana de la invención se parecen a los de la cromatografía de afinidad tradicional con respecto a la constante de disociación, la especificidad, la unión y las condiciones de elución posibles. Sin embargo, dado que las condiciones de elución habitualmente son distintas de las condiciones aplicadas cuando se miden las K_D , en el instrumento Biacore, en la presente invención los límites establecidos para los intervalos aplicables de las dos distintas afinidades de unión del PAD se han determinado en condiciones convencionales, las cuales son iguales a las condiciones utilizadas en los ejemplos.

Los criterios para la selección de los dominios de unión a ligando específicos de la invención son algo distintos de los criterios utilizados en la cromatografía de afinidad tradicional, dado que la molécula de PAD no debe eluirse del

soporte.

Los dominios de unión que son específicos y fuertes, pero que no pueden romperse en condiciones de elución normales, no son adecuados para la cromatografía de afinidad tradicional. Tales dominios de unión pueden utilizarse en la presente invención. Los ejemplos incluyen la unión muy específica biotina-estreptavidina, la cual para la mayoría de las aplicaciones prácticas no puede invertirse en condiciones de elución y, en consecuencia, es muy adecuada como uno de los pares de unión de la invención.

En general, la unión entre el PAD y el ligando debería ser más fuerte que la unión entre el PAD y la diana, y suficientemente fuerte para impedir la filtración de la molécula de PAD del soporte durante la elución de la diana.

Las parejas de unión ligando-PAD preferentes son fuertes y no presentan o presentan poca reducción de la fuerza de unión debida al cambio de pH, fuerza iónica, disolventes, agentes caotrópicos, temperatura, etc.

Debería estar claro que, cuando se cambia la escala de purificación utilizando el sistema de la invención, la cantidad de PAD añadida se ajusta a la cantidad y la concentración de la proteína diana. Dado que la molécula de PAD puede entregarse como un concentrado, las condiciones de unión se pueden ajustar con respecto, a por ejemplo, el pH y las sales. Además, se pueden seleccionar la temperatura y el tiempo para proporcionar la mejor unión y posterior purificación.

El tamaño y la capacidad de la columna genérica se seleccionan para que sea suficientemente grandes para capturar las moléculas de PAD. De forma potencial, se utilizan varias columnas en paralelo o en conjunto.

En la purificación de otra diana, se selecciona otra molécula de PAD apropiada. Puede utilizarse la misma u otra columna.

En una realización, el polipéptido de afinidad doble es un polipéptido de fusión. Tales polipéptidos de fusión pueden prepararse ya sea ligando de forma química dos proteínas apropiadas o, de forma alternativa, en otra realización la proteína de fusión puede sintetizarse como un polipéptido recombinante. El polipéptido de fusión puede ligarse de cualquier modo adecuado, por ejemplo mediante un segmento conector, y el polipéptido de fusión debería comprender al menos los dominios de unión de las proteínas seleccionadas. El péptido conector debería seleccionarse de tal modo que no sea inestable, dando como resultado la degradación. El conector podría, por ejemplo, ser un conector elevadamente O-glucosilado, como los conectores entre dominios catalíticos o dominios de unión de hidratos de carbono conocidos, procedentes de carbohidrasas fúngicas, o podrían ser conectores ricos en prolina.

El polipéptido de afinidad doble comprende al menos un dominio de unión que tiene la capacidad de unirse a la biomolécula diana con la especificidad de unión deseada, como se describe. El dominio de unión puede estar comprendido en la proteína completa o puede ser un fragmento de la proteína que haya retenido su capacidad de unión. Se han descrito en la bibliografía muchas proteínas que presentan afinidad por biomoléculas, por ejemplo péptidos, proteínas, ADN, ARN, hidratos de carbono y todas tales proteínas o fragmentos de las mismas que son potencialmente útiles, en el contexto de la presente invención, como candidatas para el polipéptido de afinidad doble.

Por lo tanto, en una realización dicho dominio de unión dirigido hacia la biomolécula diana puede seleccionarse a partir, pero sin limitación, del grupo que consiste en proteína A, fragmentos de proteína A, dominios derivados de proteína A (por ejemplo, dominios conocidos como un affibody®), anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, lipocalinas y lectinas.

Se ha aplicado la ingeniería combinatorial de proteínas para desarrollar proteínas artificiales que pueden unirse a dianas seleccionadas con elevada afinidad y utilizarse como alternativas a los anticuerpos (Nygren, P.-Å. y Skerra, A. (2004). Binding proteins from alternative scaffolds. *J. Immunol. Methods*, 290, pág. 3-28; Binz, H. K. y Plückthun, A. (2005). Engineered proteins as specific binding reagents. *Curr. Opin. Biotech.* 16, p. 459-469). En el contexto de la presente invención, el término "aficuerpo" define una clase de proteínas diseñadas seleccionadas por su actividad de unión específica para una diana deseada y a base del dominio Z, el cual es un conjunto trihelicoidal de 58 restos obtenido de una sustitución de aminoácidos única en el dominio B de la proteína estafilocócica A (PEA) (Nilsson, B., Moks, T., Jansson, B., Abrahmsén, L., Elmlblad, A., Holmgren, E. y col. (1987) *Protein Eng.* 1, pág. 107-113). El dominio Z se une a la región Fc de las inmunoglobulinas, como lo hacen los cinco dominios homólogos de la PEA, pero a diferencia del dominio parental, no se une a la región Fab. Tales aficuerpos son ejemplos de un dominio de unión obtenido de la proteína A.

El polipéptido de afinidad doble también comprende al menos un dominio de unión que tiene la capacidad de unirse al ligando de captura inmovilizado sobre el soporte sólido. Este segundo dominio de unión puede estar comprendido en la proteína completa o puede ser un fragmento de la proteína que ha retenido su especificidad de unión. En una realización, el segundo dominio de unión se selecciona de, pero sin limitación, el grupo que consiste en avidina, estreptavidina, neutravidina, receptor de esteroides, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, amiloglucosidasa (AMG), dominio de enzima (por ejemplo, dominio de unión a celulosa, CBD), lipocalinas y lectinas. Como se indica anteriormente, estos candidatos para el segundo dominio de unión se entienden como ejemplos que ilustran la

invención, sin embargo, estos ejemplos no deberían verse como las únicas combinaciones utilizables.

En una realización, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos de llama y de camello.

En una realización particular, el polipéptido de afinidad doble de acuerdo con la invención comprende al menos un dominio de unión de proteína A fusionado con al menos un dominio de unión a biotina de avidina, estreptavidina o neutravidina.

En una realización particular, el polipéptido de afinidad doble de acuerdo con la invención comprende al menos un dominio de unión de un dominio de unión obtenido de proteína A fusionado a al menos un dominio de unión a biotina de avidina, estreptavidina o neutravidina.

En otra realización particular, el polipéptido de afinidad doble comprende al menos un dominio de unión de un anticuerpo fusionado a al menos un dominio de unión a biotina de avidina, estreptavidina o neutravidina.

En otra realización particular, el polipéptido de afinidad doble comprende al menos un dominio de unión de un anticuerpo fusionado a al menos un dominio de unión a biotina de avidina, estreptavidina o neutravidina.

En otra realización particular, el polipéptido de afinidad doble comprende al menos un dominio de unión de proteína A fusionado a AMG, CBD o (VhhRR6(R2)).

En otra realización particular, el polipéptido de afinidad doble comprende al menos un dominio de unión de un dominio de unión obtenido de proteína A fusionado a AMG, CBD o (VhhRR6(R2)).

En otra realización particular, el polipéptido de afinidad doble comprende al menos un dominio de unión de un anticuerpo fusionado a AMG, CBD o (VhhRR6(R2)).

En otra realización particular, el polipéptido de afinidad doble comprende al menos un dominio de unión de un anticuerpo fusionado a AMG, CBD o (VhhRR6(R2)).

El polipéptido de afinidad doble puede, como se ilustra en los ejemplos, ligarse de forma química; sin embargo, un modo más rentable para producir el polipéptido de afinidad doble sería expresarlo como una proteína de fusión recombinante.

En una realización de la invención, el polipéptido de fusión se produce como un polipéptido recombinante.

Otra posibilidad también prevista sería coexpresar la proteína de fusión y la biomolécula diana en la célula hospedadora, haciendo posible cargar el extracto de cultivo celular crudo de forma directa en el soporte sólido.

En una realización adicional, la biomolécula diana y el PAD se expresan de forma separada pero en el mismo tipo de célula hospedadora.

En una realización particular, la proteína de fusión se expresa como una proteína recombinante, en particular, en una realización, la proteína de fusión es estreptavidina ligada a proteína A recombinante. Tal proteína de fusión puede producirse de forma intracelular en *E. coli* como se describe en Sano (T. Sano y C. R. Cantor (1991) BioTechnology 9 pág. 1378 - 1381), preferentemente utilizando la construcción pTSAPA-2, que porta dos dominios de unión a IgG. Sin embargo, esta construcción no es industrialmente factible dado que la producción intracelular con la recuperación de cuerpos de inclusión en *E. coli* no proporciona rendimientos industrialmente relevantes y los procedimientos de producción son elevadamente complejos. Un procedimiento a base de una fusión secretada producida en, por ejemplo, *Bacillus* o *Aspergillus* es de una relevancia industrial mucho más alta.

La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de acuerdo con la invención puede, preferentemente, expresarse insertando la secuencia de nucleótidos o una construcción de ácido nucleico que comprende la secuencia, en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se emplaza en el vector de forma que la secuencia codificante esté unida operativamente con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que puede someterse de forma conveniente a procedimientos de ADN recombinante y puede dar lugar a la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector normalmente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula hospedadora en la que el vector de debe introducir. Los vectores pueden ser lineales o plásmidos circulares cerrados.

El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación de la cual es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Como alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula hospedadora, se integra en el genoma y replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en el que se ha integrado. Además, puede utilizarse un único vector o plásmido, o dos o más vectores o plásmidos que

juntos contengan el ADN total a introducir en el genoma de la célula hospedadora, o un transposón.

Los vectores de la presente invención preferentemente contienen uno o más marcadores de selección que permiten la selección fácil de las células transformadas. Un marcador de selección es un gen, el producto del cual proporciona resistencia a biocidas o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares.

- 5 Un gen esencial condicional puede funcionar como un marcador de selección no antibiótico. Son ejemplo de marcadores de selección no antibióticos esenciales condicionales bacterianos los genes *dal* de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* u otros *Bacilli*, que son solo esenciales cuando la bacteria se cultiva en ausencia de D-alanina. Además, los genes que codifican enzimas implicadas en la renovación de la UDP-galactosa pueden funcionar en una célula como marcadores esenciales condicionales cuando la célula se crece en presencia de galactosa o se crece en un medio que da lugar a la presencia de galactosa. Los ejemplos no limitativos de tales genes son los de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, que codifican la fosforilasa dependiente de UTP (EC 2.7.7.10), la uridililtransferasa dependiente de UDP-glucosa (EC 2.7.7.12) o la UDP-galactosa epimerasa (EC 5.1.3.2). Además, puede utilizarse como marcador de selección en células crecidas en medio mínimo con xilosa como única fuente de carbono un gen de la xilosa isomerasa tal como *xylA*, de *Bacilli*. Los genes necesarios para la utilización de gluconato, *gntK* y *gntP*, también pueden utilizarse como marcadores de selección en células crecidas en medio mínimo con gluconato como única fuente de carbono. Se conocen en la técnica otros ejemplos de genes esenciales condicionales. Los marcadores de selección de antibiótico confieren resistencia a antibióticos tales como ampicilina, kanamicina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, neomicina, higromicina o metotrexato.

- 20 Los marcadores adecuados para células hospedadoras de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores de selección para su uso en una célula hospedadora de hongo filamentoso incluyen, pero sin limitación, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfinotricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa) y *trpC* (antranilato sintetasa), así como equivalentes de los mismos. Son preferentes para su uso en una célula de *Aspergillus* los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*, y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

Los vectores de la presente invención preferentemente contienen un elemento (o elementos) que permite la integración del vector en el genoma de la célula hospedadora o la replicación autónoma del vector, independiente del genoma, en la célula.

- 30 Para la integración en el genoma de la célula hospedadora, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o de cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Como alternativa, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para la dirección de la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula hospedadora en un emplazamiento (o emplazamientos) preciso en el cromosoma (o cromosomas). Para aumentar la probabilidad de integración en un emplazamiento preciso, los elementos integracionales deberían contener preferentemente una cantidad suficiente de ácidos nucleicos, tal como 100 a 10.000 pares de bases, preferentemente 400 a 10.000 pares de bases y muy preferentemente 800 a 10.000 pares de bases, que tengan un alto grado de identidad con la secuencia diana correspondiente para potenciar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga con la secuencia diana en el genoma de la célula hospedadora. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos no codificantes o codificantes. Por otro lado, puede integrarse al vector en el genoma de la célula hospedadora mediante recombinación no homóloga.

- 45 Para la replicación autónoma, el vector puede comprender adicionalmente un origen de replicación que permita que el vector se replique de forma autónoma en la célula hospedadora en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador de plásmido que medie la replicación autónoma que funcione en una célula. La expresión "origen de replicación" o "replicador de plásmido", como se define en el presente documento, es una secuencia de nucleótidos que permite a un plásmido o vector replicarse *in vivo*.

Los ejemplos de orígenes de replicación bacterianos son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184, que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAM β 1, que permiten la replicación en *Bacillus*.

- 50 Los ejemplos de orígenes de replicación para su uso en una célula hospedadora de levadura son los orígenes de replicación de 2 micrómetros, ARS1, ARS4, y la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

- Los ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula de hongo filamentoso son AMA1 y ANS1 (Gems y col., 1991, Gene 98: 61-67, Cullen y col., 1987, Nucleic Acids Research 15: 9163-9175; documento WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos y vectores que comprenden el gen, se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos desvelados en el documento WO 00/24883.

Para aumentar la producción del producto génico puede insertarse en la célula hospedadora más de una copia de un polinucleótido de la presente invención. Un aumento en el número de copias del polinucleótido puede obtenerse integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula hospedadora o incluyendo un

gen marcador de selección amplificable con el polinucleótido, en donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador de selección, y por lo tanto las copias adicionales del polinucleótido, pueden seleccionarse cultivando las células en presencia del agente de selección apropiado.

- 5 Los procedimientos utilizados para ligar los elementos descritos anteriormente, para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención, son bien conocidos para un experto en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, citado anteriormente).

10 La presente invención también se refiere a células hospedadoras recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, las cuales se utilizan de forma ventajosa en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula hospedadora de forma que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicativo, como se describió antes. La expresión "célula hospedadora" abarca cualquier progenie de una célula parental que no es idéntica a la célula parental debido a mutaciones que se produjeron durante la replicación. La elección de una célula hospedadora dependerá en gran medida del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

- 15 La célula hospedadora puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procariota, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota.

20 Los microorganismos unicelulares útiles son células bacterianas tales como bacterias grampositivas que incluyen, pero sin limitación, una célula de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*; o una célula de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* y *Streptomyces murinus*, o bacterias gramnegativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas* sp. En un aspecto preferente, la célula hospedadora bacteriana es una célula de *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. En otro aspecto preferente, la célula de *Bacillus* es un *Bacillus alcalófilo*.

- 25 La introducción de un vector en una célula hospedadora bacteriana puede, por ejemplo, efectuarse mediante transformación por protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111-115), utilizando células competentes (véase, por ejemplo, Young y Spizizin, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751) o conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5771-5278).

La célula hospedadora también puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, vegetal o fúngica.

- 35 En un aspecto preferente, la célula hospedadora es una célula fúngica. "Hongos", como se utiliza en el presente documento, incluye los filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota* (como define Hawksworth y col., en, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, RU) así como *Oomycota* (como se cita en Hawksworth y col., 1995, citado anteriormente, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth y col., 1995, citado anteriormente).

- 40 En un aspecto más preferente, la célula hospedadora fúngica es una célula de levadura. "Levadura", como se utiliza en el presente documento, incluye levaduras ascosporógenas (*Endomycetales*), levaduras basidiosporógenas y levaduras que pertenecen a los Hongos Imperfectos (*Blastomycetes*). Dado que la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, para los fines de la invención, las levaduras se definirán como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F. A., Passmore, S. M. y Davenport, R. R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series n.º 9, 1980).

- 45 En incluso un aspecto más preferente, la célula hospedadora de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

- 50 En un aspecto muy preferente, la célula hospedadora de levadura es una célula de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*. En otro aspecto muy preferente, la célula hospedadora de levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*. En otro aspecto muy preferente, la célula hospedadora de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

- 55 En otro aspecto más preferente, la célula hospedadora de levadura es una célula de hongo filamentoso. "Hongos filamentosos" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como define Hawksworth y col., 1995, citado anteriormente). Los hongos filamentosos se caracterizan en general por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es mediante elongación de la hifa y el catabolismo del carbono es aerobio obligado. En contraste, el crecimiento vegetativo de levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es mediante gemación de un talo unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo.

En un aspecto incluso más preferente, la célula hospedadora de hongo filamentoso es una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyptocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

En un aspecto muy preferente, la célula hospedadora de hongo filamentoso es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto muy preferente, la célula hospedadora de hongo filamentoso es una célula de *Fusarium bacridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*. En otro aspecto muy preferente, la célula hospedadora de hongo filamentoso es una célula de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa* o *Ceriporiopsis subvermispora*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

Las células fúngicas pueden transformarse mediante un proceso que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Los procedimientos adecuados para la transformación de las células hospedadoras de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en el documento EP 238 023 y en Yelton y col., 1984, Proceedings de la National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474. Los procedimientos adecuados para la transformación de especies de *Fusarium* se describen en Malardier y col., 1989, Gene 78: 147-156 y el documento WO 96/00787. Las levaduras pueden transformarse utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J. N. Y Simon, M. I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volumen 194, pág. 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito y col., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen y col., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

El contacto entre la biomolécula diana, el polipéptido de afinidad doble (PAD) y el soporte sólido, puede realizarse por varias vías optativas. En una realización, todos los componentes podrían ponerse en contacto en una etapa, por ejemplo cargando el polipéptido diana y la proteína de fusión sobre el soporte sólido sin preincubación en solución. El polipéptido de afinidad doble puede, sin embargo, ponerse en contacto con la diana antes de la carga de este complejo en el soporte sólido. En esta realización, en primer lugar se ponen en contacto la biomolécula diana y el polipéptido de afinidad doble, por ejemplo en solución, y, posteriormente, el complejo formado se pone en contacto con el soporte sólido. Dependiendo de la naturaleza del soporte sólido, las realizaciones preferentes de este principio podrían diferir.

En una realización preferente, el soporte sólido es una matriz de fase sólida. Esto incluye matrices de fase sólida convencionales. En el caso de matrices de fase sólida en la forma de columnas, en primer lugar se ponen en contacto la diana y el polipéptido de afinidad doble en solución y posteriormente se ponen en contacto con la matriz de fase sólida cargando el complejo sobre la columna.

En otra realización, los soportes sólidos están en forma de partículas.

El ligando de captura de acuerdo con la invención está unido de forma covalente al soporte sólido. Como se explica anteriormente, el ligando de acuerdo con la presente invención es distinto del ligando utilizado en la cromatografía de afinidad tradicional, en donde el fin del ligando es unirse a la diana. En la presente invención, el ligando debe unirse al PAD. Los ligandos son bien conocidos en la técnica y a continuación se proporcionan ejemplos que pueden aplicarse de acuerdo con la invención. En el contexto de la presente invención, en una realización particular en lugar de un ligando unido a la fase sólida, la fase sólida podría comprender de forma alternativa una afinidad de unión o un sitio de unión para el PAD. Un ejemplo podría ser celulosa como la fase sólida y el CBD (dominio de unión a celulosa) como parte del PAD.

En una realización, el ligando se elige de, pero sin limitación, el grupo que consiste en biotina, acarbosa, esteroides, haptenos, péptidos de epítipo, colorantes e inhibidores enzimáticos. En una realización particular, el ligando es biotina. El ligando puede estar unido al soporte sólido de forma química, como se describe en los ejemplos en donde se ilustra la unión química de la acarbosa y el rojo reactivo 6.

El acoplamiento de los ligandos de afinidad a los soportes afecta fuertemente la especificidad, capacidad y el coste de las columnas de cromatografía de afinidad tradicionales.

El actual estado de la técnica en la tecnología de acoplamiento covalente permite el acoplamiento químico y regio selectivo de los ligandos de unión al soporte, a menudo utilizando espaciadores o conectores para anclar el ligando

a la superficie.

Se debe tener mucho cuidado en evitar utilizar grupos funcionales que estén próximos a un sitio de unión o que desempeñen un papel en la interacción entre el ligando y la molécula diana.

- 5 Si en el ligando no existe un grupo funcional adecuado, se puede realizar una derivatización adicional del ligando para añadir un grupo funcional apropiado. Numerosas referencias describen químicas apropiadas, incluyendo "Bioconjugate Techniques", por Greg T. Hermanson, Academic Press, 2008 y "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking", por Shan S. Wong, CRC Press, 1991.

- 10 Comúnmente se acepta que una elevada concentración de ligando acoplado a menudo tiene efectos adversos sobre la cromatografía de afinidad, también la eficacia de unión del medio puede reducirse debido al impedimento estérico entre los sitios activos. Esto es particularmente pronunciado cuando interactúan moléculas grandes tales como anticuerpos, antígenos y enzimas con ligandos pequeños.

Además, las sustancias diana pueden estar unidas de forma más fuerte a ligandos estrechamente comprimidos, haciendo difícil la elución y además, el grado de unión no específica aumenta a concentraciones de ligando muy elevadas, reduciendo de este modo la selectividad de la columna de afinidad.

- 15 La interacción de la interfaz ligando-superficie es conocida por ser importante para el desempeño del ligando de afinidad. La longitud de los brazos espaciadores entre el ligando y la superficie es crítica. Si es demasiado corto, el brazo es ineficaz y el ligando fracasa en unirse a la diana en la muestra. Si es demasiado largo, las proteínas pueden unirse de forma no específica al brazo espaciador y reducir la selectividad de la separación. A menudo se utilizan brazos hidrófilos de 4-12 átomos de longitud.

- 20 MabSelect™ Media y HiTrap MabSelect™ (GE Healthcare) son ejemplos de columnas de afinidad que utilizan acoplamiento orientado de Proteína A recombinante a la matriz a través de una cisteína C terminal diseñada y un brazo espaciador hidrófilo.

- 25 La presente invención sugiere el uso de un polipéptido de afinidad doble soluble, el cual puede caracterizarse y utilizarse en cualquier concentración apropiada para la concentración de la diana específica. El desafío técnico del acoplamiento de ligandos de unión específica a dianas delicadas a un soporte sólido se sustituye con una preparación más simple de moléculas solubles haciendo posible utilizar el arsenal completo de procedimientos analíticos.

Para la cromatografía de afinidad existen numerosos tipos de material de soporte.

- 30 El tamaño y la uniformidad de las perlas, la distribución de los canales internos y la naturaleza de las superficies se han optimizado todos para producir numerosos tipos de soportes.

En general, un tamaño de partícula más pequeño y una porosidad más grande aseguran una capacidad de unión dinámica aumentada. Por otro lado, se reduce la resistencia a los colapsos mecánicos.

Tanto los materiales de soporte compresibles como los incompresibles necesitan ser lo suficientemente robustos como para subsistir a múltiples ciclos sin cambio de los caudales, lo cual afectará el tiempo de residencia.

- 35 El soporte sólido está en la forma de perlas, geles o granulados. La calidad de compactación del material de soporte sólido en las columnas para la purificación de afinidad tradicional y los caudales durante la operación afectan en gran medida el desempeño.

- 40 Se utiliza equipo especializado para compactar de forma satisfactoria columnas grandes por encima de los 5-10 cm de diámetro. Las columnas de alto rendimiento normalmente se adquieren precompactadas y en tamaños convencionales. En consecuencia, las dimensiones prácticas durante el cambio de escala dependen de la disponibilidad de sistemas de columna para la purificación de la molécula diana particular.

La presente invención sugiere un procedimiento general que utiliza moléculas de PAD diana y una columna genérica.

- 45 Uno de los factores más importantes en la determinación del coste y la calidad de la purificación a gran escala es la estabilidad química y mecánica del adsorbente.

Las columnas de afinidad tradicionales con ligandos de proteína inmovilizados son susceptibles a la degradación adicional debida a, por ejemplo, la oxidación o el crecimiento microbiano.

- 50 Por lo tanto, debido al coste de las columnas de afinidad grandes, se debe tener mucho cuidado en controlar las condiciones de almacenamiento entre los usos. A menudo, la columna se lava y almacena con una solución tamponadora especial que contiene agentes antimicrobianos, alcoholes o similares. Estas soluciones de almacenamiento deben lavarse antes del uso.

Algunos ligandos de afinidad también son sensibles a las proteasas, y la vida útil de la columna se reducirá a menos que se sigan de forma rigurosa procedimientos de limpieza y regeneración especiales. La libertad para diseñar procedimientos de purificación de afinidad eficaces está, por lo tanto, un tanto restringida.

Un sistema de columna de único uso de acuerdo con la invención o un sistema de columna que utilice ligandos sintéticos no tendrá las limitaciones técnicas anteriores.

En una realización de la invención, el soporte sólido está en forma de una matriz de fase sólida. La matriz de fase sólida puede comprender, como estructura de la matriz, cualquier material natural o sintético, orgánico o inorgánico conocido *per se* por ser aplicable en la separación de proteínas y otras biomoléculas en fase sólida, por ejemplo, polisacáridos naturales o sintéticos tales como agar-agar y agarosas; celulosas, éteres de celulosa tales como hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa; almidones; gomas tales como goma guar y goma arábica, goma ghatti, goma de tragacanto, goma de algarroba, goma de xantano; pectinas; mucinas; dextranos; quitinas; quitosanos; alginatos; carragenanos; heparinas; gelatinas; polímeros sintéticos tales como poliamidas tales como poli(acrilamidas y polimetacrilamidas; poliésteres; poliéteres; compuestos vinílicos poliméricos tales como alcoholes polivinílicos y poliestirenos; polialquenos; materiales inorgánicos tales como materiales silíceos tales como dióxido de silicio incluyendo sílice amorfo y cuarzo; sílices; silicatos metálicos, vidrios de poro controlado y cerámicas; óxidos metálicos y sulfuros, o combinaciones de estos materiales naturales o sintéticos, y orgánicos o inorgánicos.

La estructura de la matriz preferentemente se selecciona de agar-agar, agarosas, celulosas, éteres de celulosa tales como hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, poliamidas tales como poli(met)acrilamidas, polivinil alcoholes polivinílicos, sílices y vidrios de poro controlado.

Los materiales de fase sólida como estructuras de matriz especialmente interesantes son, por ejemplo, perlas de agar o agarosa tales como perlas de Sepharosa y Superosa de GE Healthcare, USA, y Biogel A de Biorad, USA; perlas a base de dextrano tales como Sephadex, GE Healthcare; perlas a base de celulosa y membranas tales como celulosa Perloza de Iontosorb, República Checa; perlas de composite tales como Sephacryl y Superdex, GE Healthcare, USA; perlas de polímeros orgánicos sintéticos tales como Fractogel de Tosoh Lifesciences LLC, USA; medios POROS de Applied Biosystems, USA, Bio-Rex, Bio-Gel P y Macro Prep de Biorad, HEMA y Separon de TESSEK y los medios Hyper D y Trisacryl de Pall Corporation, USA, Enzacryl y Azlactona, 3M, USA; perlas de materiales silíceos tales como vidrio de poro controlado, PROSEP, de Millipore, USA, y Spherocil, Pall Corporation, USA; y composites de sílice recubiertos en forma de perlas o membranas tales como ACTI-DISK, ACTI-MOD y CycloSep de Arbor Technologies, USA.

Después, el ligando se une de forma covalente a este material (por ejemplo, biotina o moléculas específicas similares de bajo peso molecular (BPM)). Se pueden seleccionar a partir de libros de texto sobre el tema varias químicas de acoplamiento de moléculas ligando al soporte sólido (Protein Purification, 1998, 2ª ed., eds. Janson, J-C., Rydén, L, Wiley & sons inc. Nueva York). A base de la tarea de purificación particular, se acopla el mejor candidato de derivados de ligando a la mejor opción de soporte sólido, por ejemplo, matriz o partículas de fase sólida. Las propiedades del procedimiento de producción de la matriz sólida de afinidad se analizan a través de pruebas prácticas de laboratorio y piloto.

Los ligandos pueden unirse al material de fase sólida mediante cualquier tipo de enlace covalente conocido *per se* como aplicable a este fin, ya sea mediante una reacción química directa entre el ligando y el material de fase sólida o mediante una activación previa del material de fase sólida o del ligando con un reactivo adecuado conocido *per se* que haga posible unir la estructura de la matriz y el ligando. Los ejemplos de tales reactivos de activación adecuados son epiclorhidrina, epibromohidrina, alil glicidil éter; bis-epóxidos tales como butanodiol diglicidil éter; compuestos alifáticos sustituidos por halógeno tales como dicloropropanol, divinilsulfona; carbonildiimidazol; aldehídos tales como dialdehído glutárico; quinonas; bromuro de cianógeno; peryodatos tales como meta peryodato de sodio; carbodiimidas; clorotriazinas tales como cloruro cianúrico; cloruros de sulfonilo tales como cloruros de tosilo y cloruros de tresilo; N-hidroxi succinimidas; tolueno-4-sulfonatos de 2-fluoro-1-metilpiridinio; oxazolonas; maleimidas; disulfuros de piridilo e hidrazidas. Entre estos, son preferentes los reactivos de activación que dejan un grupo espaciador SP1 distinto de un enlace simple, por ejemplo epiclorhidrina, epibromohidrina, alil glicidil éter; bis-epóxidos; compuestos alifáticos sustituidos con halógeno; divinil sulfona; aldehídos; quinonas; bromuro de cianógeno; cloro-triazinas; oxazolonas; maleimidas; disulfuros de piridilo e hidrazidas.

En una realización, el soporte sólido está en forma de partículas. Las partículas pueden seleccionarse del grupo que comprende microesferas, partículas de látex o perlas. Las partículas pueden fabricarse de, pero sin limitación, el grupo que consiste en, por ejemplo, poliestireno, sílice, naftaleno, polibutylmetacrilato.

El soporte sólido genérico puede producirse a costes comparables con las matrices de intercambio iónico y la proteína de afinidad doble recombinante puede producirse también como una proteína de fusión recombinante, mediante fermentación a bajo coste. Debido al coste reducido de los materiales de los procedimientos aguas abajo nuevos, la tecnología de purificación puede proporcionarse como desechables, los cuales eliminan la necesidad de una limpieza sin desmontar (LSD) cara y de determinadas validaciones. Otra consecuencia de los costes reducidos son las aplicaciones opcionales de volúmenes de columna grandes, que ahorra gastos de mano de obra de fabricación, evita reejecuciones de purificación repetidas y limita el tiempo de las tareas de la planta de procesamiento aguas abajo.

El uso de un soporte sólido genérico que incluye el ligando de captura, y la eficacia de unión y la capacidad potencialmente mejoradas debido a la formación de complejo en solución poseen varias ventajas sobre la cromatografía de afinidad convencional. Estas ventajas se enumeran a continuación.

- 5 • Reacciones de conjugación química, purificaciones y procedimientos de CC de los ligandos de proteína para preparar el material de la columna de afinidad antes de la purificación de afinidad de la molécula diana, que no requieren mucho tiempo y no son caros.
- La matriz genérica es más rentable para la fabricación en comparación con las actuales matrices de afinidad comerciales (por ejemplo, Proteína A). Solo se necesita un tipo de material de columna de captura para todas las purificaciones de afinidad utilizando el principio de polipéptido de afinidad doble. Para fabricar la matriz de fase
- 10 sólida genérica, el ligando de bajo peso molecular, por ejemplo biotina, moléculas colorantes o moléculas de bajo peso molecular (BPM) específicas similares se unen de forma covalente mediante procedimientos de conjugación simples de bajo coste.
- A base de la tecnología conocida, la fermentación preferente de una proteína de fusión de polipéptido de afinidad doble es "simple" y proporciona la conjugación necesaria entre los dominios de unión en el PAD
- 15 • El coste de fabricación de las moléculas de PAD es comparable o más económico que el de las moléculas de proteína A recombinante.
- La proteína de fusión de PAD y la matriz genérica necesarias para los fines de purificación cuestan una fracción de la matriz de afinidad de Proteína A lista para el uso para fines similares.
- 20 • Durante el procedimiento de purificación el PAD transporta e inmoviliza las moléculas diana en la matriz genérica. No hay necesidad de una inmovilización cara o que requiera mucho tiempo del ligando destinado a fabricar una matriz de purificación específica, como se conoce en la cromatografía de afinidad convencional.
- El bajo coste de los componentes en la invención presentada facilita un procedimiento de purificación de afinidad desechable que presenta
 - 25 ○ la eliminación de los procedimientos de LSD
 - la eliminación de los procedimientos de validación
 - el ahorro de tiempo en cuestiones normativas
 - excluir repeticiones de los ciclos de procedimientos aguas abajo
 - limitar las fallas operacionales
 - menores gastos de mano de obra durante el procesamiento
 - 30 ○ tiempo de fabricación más corto
 - limitar el riesgo de contaminación
 - facilidad de uso
 - inversiones de costo de capacidad menores debido a diseños de plantas flexibles
 - mejor economía de los procedimientos aguas abajo
- 35 • Sustitución de los procedimientos de separación de proteínas de múltiples ciclos convencionales por una única etapa que utiliza la tecnología de purificación de afinidad desechable.

En una forma modificada particular de la invención podría preverse que la molécula de PAD puede unirse al soporte sólido de forma covalente. Esto permitiría todavía la posibilidad de que el PAD y a la diana reaccionen en solución. Tal enlace covalente podría, en una realización, formarse mediante escisión de una bencilguanina para-sustituída, lo que da como resultado un enlace de tioéter.

Una realización de esta forma modificada de la invención, por lo tanto, se refiere a un procedimiento para la purificación de una biomolécula diana, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto (i) un polipéptido diana, (ii) un polipéptido de afinidad doble y (iii) un soporte sólido que comprende un ligando de captura, en el que el polipéptido de afinidad doble tiene una constante de disociación en equilibrio, $K_{D,i}$ para la biomolécula diana en el intervalo de 10^{-2} a 10^{-13} M, de forma más particular de 10^{-4} a 10^{-13} M en condiciones convencionales, y en el que la unión del polipéptido de afinidad doble al ligando de captura sobre el soporte sólido se proporciona mediante la escisión de una bencilguanina para-sustituída, lo que da como resultado un enlace de tioéter; y (b) recuperar la biomolécula diana mediante elución.

A continuación se ilustra el principio básico de la tecnología de purificación de afinidad para la purificación de una molécula diana (anticuerpo policlonal).

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación del conector de afinidad doble mediante conjugación química

A base de los valores publicados para las afinidades de unión, se seleccionaron funcionalidades de unión del conector doble que se ajustan tanto a la unión a la matriz de ligando ($K_{D,s} \sim 10^{-9}$ a 10^{-16} M) como a las biomoléculas diana (productos, $K_{D,i} \sim 10^{-2}$ a 10^{-13} M). Para investigar la influencia de la $K_{D,s}$, también se analizaron algunos componentes con valores de $K_{D,s}$ por fuera del intervalo anterior.

Para preparar un conjugado fabricado de Proteína A y una proteína de unión a biotina, por ejemplo Avidina, Estreptavidina o Neutravidina, como una primera etapa las dos proteínas se activaron químicamente de forma

separada y posteriormente se unieron mediante entrecruzamiento en una segunda etapa.

La proteína A no tiene sulfhidrilos (-SH) accesibles en su superficie, por lo que estos se introdujeron mediante reacción con SATA (N-succinimidil S-acetiltioacetato) con los grupos funcionales amino (-NH₂) primarios en la Proteína A. SATA (o SATP) es un reactivo para introducir sulfhidrilos protegidos en proteínas, péptidos y otras moléculas. Son los ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) del ácido S-acetiltioacético y propiónico. Se formó un enlace amida covalente estable a partir de la reacción del éster de NHS con aminas primarias. La amina se hizo reaccionar con el éster de NHS mediante ataque nucleófilo, liberándose N-hidroxisuccinimida como un producto secundario. La desprotección (desacilación) para generar un sulfhidrilo para su uso en el entrecruzamiento y otras aplicaciones se llevó a cabo utilizando hidroxilamina•HCl.

- 5
 - 10
 - 15
- Los grupos maleimida se introdujeron en la Avidina utilizando Sulfo-SMCC. Sulfo-SMCC es un agente de entrecruzamiento heterobifuncional que contiene un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) y un grupo maleimida. Los ésteres de NHS reaccionan con aminas primarias a pH 7-9 para formar enlaces de amida covalentes. SMCC y Sulfo-SMCC a menudo se utilizan para preparar conjugados de proteína-proteína en un esquema de reacción de dos etapas. En primer lugar, la proteína que contiene aminas se hizo reaccionar con un exceso varias veces molar del agente de entrecruzamiento, seguido de la eliminación del reactivo en exceso (que no reaccionó) mediante desalado o diálisis; para finalizar, se añade la molécula que contiene sulfhidrilos para que reaccione con los grupos maleimida ya unidos a la primera proteína.

Los conjugados preparados mediante entrecruzamiento se obtuvieron mediante la reacción de las maleimidas con los grupos sulfhidrilo a pH 6,5-7,5k, para formar enlaces de tioéter estables.

- 20
- Una alternativa al procedimiento anterior es utilizar Neutravidina activada por Maleimida disponible de forma comercial, en lugar de la Avidina activada. La Proteína Maleimide Activated NeutrAvidin™ es para preparar de forma directa conjugados de Proteína NeutrAvidin™ (PNA) con proteínas, péptidos y otras moléculas que contienen un grupo sulfhidrilo libre (-SH).

Preparación de polipéptido de afinidad doble (PAD) mediante entrecruzamiento químico

- 25
- Procedimiento para entrecruzamiento de forma química de Proteína A y ya sea Avidina o Neutravidina en un conjugado con las propiedades de un conector de PAD necesarias.

Materiales

- 30
 - 35
- SATA (N-Succinimidil S-Acetiltioacetato), (Pierce, n.º 26102)
Columna de desalado D-Salt™ Excellulose™, 5 ml (Pierce n.º 20449)
Hidroxilamina•HCl (Pierce, n.º 26103), DMSO (dimetilsulfóxido, Pierce, n.º 20688), Sulfo-SMCC: (sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato) (Pierce, 22322), Proteína A (GE Healthcare, 17-0872-50), Avidina (Kem-En-Tec, 4020H), neutravidina activada por maleimida (Pierce, n.º 31007), PD-10 de Sephadex G-25M (GE; 17-0851-01), HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR (intervalo de PM 1.000-100.000) (GE, 17-1194-01)
Aficuerpo Anti IgG (Affibody, 10.0623.01.0050)
Ditiotretitol ([3483-12-3], Sigma-Aldrich D0632)

Tampones:

Tampón de Reacción de PBS: 200-500 ml de PBS: fosfato 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2

Solución de Desacetilación: hidroxilamina 0,5 M, EDTA 25 mM en PBS, pH 7,2

Solución de PBS-EDTA: 200-500 ml de PBS: fosfato 0,1 M, NaCl 0,15 M, EDTA 5 mM, pH 7,2.

- 40
- La solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2; u otros tampón sin amina ni sulfhidrilos a pH 6,5-7,5, añadiendo EDTA hasta 1-5 mM) ayuda a quelar metales divalentes, reduciendo de este modo la formación de disulfuros en la proteína que contiene sulfhidrilos.

Procedimiento para la modificación de sulfhidrilos de la proteína A

A. Reacción de la proteína A con SATA (o SATP)

- 45
- Inmediatamente antes de la reacción, se disolvieron 6,4 mg de SATA en 0,5 ml de DMSO (lo que dio como resultado una solución de -55 mM).

Después, se combinó 1,0 ml de solución de Proteína A (2,6 mg/ml) con 10 µl de solución de SATA. El contenido se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

- 50
- El nivel de incorporación de sulfhidrilos puede modificarse utilizando distintas proporciones molares de SATA con respecto a la proteína. La reacción predeterminada utiliza Proteína A 60 nmol y SATA 550 nmol, una proporción molar de 9:1 de SATA con respecto a la proteína. La cantidad de SATA en la reacción puede aumentarse o disminuirse añadiendo más o menos de 10 µl de solución de SATA por ml de Solución de Proteína.

B. Desalado para purificar proteína A acetilada a partir de los reactivos en exceso y de los productos secundarios

Se equilibró una columna de desalado con dos volúmenes de columna de tampón de reacción. Utilizar al menos una columna de desalado de 5 ml por cada 1 ml de volumen de reacción a procesar.

- 5 Se aplicó a la columna 1,01 ml de mezcla de reacción. La recogida de fracciones de 1 ml se inició de forma inmediata. Después de que la mezcla de reacción hubo entrado de forma completa en el lecho de columna y de que se hubo recolectado la primera fracción, se añadieron a la columna al menos 10 ml de tampón de reacción y la recogida se continuó como fracciones de 1 ml separadas a medida que emergían de la columna.

- 10 La fracción (o fracciones) que contenía la Proteína A se identificó como la que tenían un pico de absorbancia a 280 nm. Con una columna de desalado de 5 ml, las fracciones 2 y 3 contenían la mayoría de la proteína, mientras que el exceso de SATA salió en las siguientes fracciones. Las fracciones que contenían la Proteína A modificada se agruparon.

La Proteína A modificada se puede almacenar de forma indefinida para la posterior desacetilación y generación de grupos sulfhidrilos (Sección C).

C. Desacetilación de Proteína A modificada con SATA para generar grupos sulfhidrilo

- 15 Se combinó 1,0 ml de Proteína A modificada con SATA (acetilada) con 100 µl de Solución de Desacetilación. El contenido se mezcló y se incubó 2 horas a temperatura ambiente.

Se utilizó una columna de desalado para purificar la proteína modificada con sulfhidrilos a partir de la hidroxilamina en la Solución de Desacetilación.

- 20 El desalado se realizó en Tampón de Reacción que contenía EDTA 10 mM, para minimizar la formación de enlaces disulfuro, utilizando el mismo procedimiento que en la Sección B. Las fracciones que contenían la Proteína A modificada se agruparon. La concentración de proteína debía ser de - 1,3 mg/ml. Para minimizar la formación de disulfuros la Sección D se realizó de forma inmediata.

Antes o después del desalado, la proteína puede ensayarse para el contenido de sulfhidrilos utilizando el Reactivo de Ellman (Pierce, n.º 23460 (kit para la detección de grupos sulfhidrilo)).

- 25 **D. Conjugación de la proteína A modificada con SATA a Avidina o Neutravidina activada por maleimida.**

Este procedimiento utiliza aproximadamente cantidades equimolares de Proteína A activada con respecto a Avidina o Neutravidina

Ejemplo 1a. Procedimiento para la modificación de Avidina con maleimida y preparación de la molécula de PAD [Proteína A-Avidina]

- 30 En general, un exceso molar de 10 a 50 veces de agente de entrecruzamiento por encima de la cantidad de proteína que contiene aminos da como resultado una activación con maleimida suficiente para permitir que varias proteínas que contienen sulfhidrilos se conjuguen con cada proteína que contiene aminos.

- 35 Las soluciones de proteína más diluidas requieren un exceso molar en veces del reactivo mayor para conseguir el mismo nivel de activación. Para determinar los niveles de activación óptimos y las proporciones de conjugación finales para la aplicación pretendida es necesaria la prueba empírica.

Protocolo

Para mejores resultados, asegurarse de que la Proteína A-SH se prepara como se describe anteriormente y esté lista para combinarse con la Avidina activada con maleimida en la etapa 5.

- 40 Se prepararon 32 mg de Avidina en 5 ml de tampón PBS y se prepararon 4,36 mg de sulfo-SMCC en 1 ml de tampón PBS/EDTA. Después, se transfirieron 500 µl de la solución de activación a la solución de Avidina. La mezcla se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de agente de entrecruzamiento utilizando una columna de desalado equilibrada con Tampón PBS-EDTA.

- 45 La proteína A-SH y la avidina activada con maleimida desalada se combinaron y se mezclaron en una proporción molar que correspondía a aproximadamente 1:1. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante una noche.

En general, no perjudica permitir que la reacción transcurra durante varias horas o durante una noche, aunque habitualmente la reacción se completará en aproximadamente 30 minutos. Para detener la reacción de conjugación antes de la finalización, añadir tampón que contiene cisteína reducida en una concentración varias veces mayor que la de los sulfhidrilos de la Proteína A-SH.

Ejemplo 1 b. Preparación de la molécula de PAD [Proteína A-Neutravidina]

Para mejores resultados, asegurarse de que la Proteína A-SH se prepara como se describe anteriormente y esté lista para combinar con la Avidina activada con maleimida.

La Neutravidina activada con maleimida (Pierce, n.º 31007) está disponible de forma comercial para la preparación de forma directa de conjugados de Proteína NeutrAvidin™ (PNA) con proteínas, péptidos y otras moléculas que contienen un grupo sulfhidrilo (-SH) libre. La Proteína NeutrAvidin™ es un derivado de avidina modificado con varias características clave que proporcionan una proteína de unión a biotina con propiedades de unión no específica excepcionalmente baja. La Proteína NeutrAvidin™ no contiene hidratos de carbono, llevando la actividad de unión a lectina a niveles no detectables. De forma adicional, el punto isoeléctrico de la PNA es $6,3 \pm 0,3$, lo cual es mucho más bajo que el de la Avidina nativa y no tan ácido como el de la estreptavidina.

Protocolo

Se añadió 1,0 ml de agua ultra pura para suspender 5 mg de Neutravidina liofilizada.

La proteína A-SH y la Neutravidina activada con maleimida se combinaron y se mezclaron en una proporción molar que corresponde a 1:1. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante una noche.

En general, no perjudica permitir que la reacción transcurra durante varias horas o durante una noche, aunque habitualmente la reacción estará completa en el tiempo especificado. Para detener la reacción de conjugación antes de la finalización, añadir tampón que contiene cisteína reducida en una concentración varias veces mayor que la de los sulfhidrilos de la Proteína A-SH.

Ejemplo 1c. Preparación de la molécula de PAD [Aficuerpo (IgG) - Avidina]Protocolo

La avidina (10 mg) se activó con sulfo-SMCC como se describe en el Ejemplo 1a.

Los dímeros de disulfuro de Aficuerpo anti IgG se redujeron a monómeros:

el aficuerpo anti IgG (5 mg) se disuelve en tampón PBS (5 ml) y 3,8 ml de esta solución se transfieren a un vial que contiene 12,3 mg de ditioneitol (DTT), proporcionando una solución de DTT de concentración final 20 mM. Esta mezcla se agita a TA durante 2 h.

Después de esto, se elimina el DTT en exceso separando de la mezcla de reacción en dos porciones, pasando cada porción a través de una columna PD-10 (volumen de lecho 8 ml). Las columnas se han equilibrado con 25 ml de tampón PBS antes del uso. El Aficuerpo Anti IgG monomérico se eluye de las columnas en 2 x 9-10 fracciones, conteniendo cada una 1 ml.

Midiendo la A_{280} de las fracciones, la proteína se localizó en 2 fracciones de cada columna. Estas fracciones se agruparon y se mezclaron con la solución de avidina activada con maleimida desalada (20 ml) en una proporción molar que corresponde a aproximadamente 1:1 (avidina calculada como monómero; PM = 17.000), y se dejó transcurrir el acoplamiento durante una noche a temperatura ambiente, con agitación suave de la mezcla de acoplamiento.

El siguiente día, se concentraron 1500 µl de la mezcla de conjugación en un Amicon Ultra (límite de 3 kDa) hasta un volumen total de 400 µl, los cuales se utilizaron para el análisis por SDS PAGE. Esto mostró que toda la avidina había reaccionado y que aún había presente algo de Aficuerpo anti IgG que no había reaccionado.

La mezcla de conjugación se congeló hasta la purificación mediante CET.

El protocolo anterior puede utilizarse para la preparación de todos los derivados de polipéptidos de afinidad doble de Aficuerpo-Avidina.

Ejemplo 1 d. Preparación de la molécula de PAD [Aficuerpo (Insulina) - Avidina]

La avidina (9 mg) se activó con sulfo-SMCC como se describe en el Ejemplo 1a.

Los dímeros de disulfuro de Aficuerpo anti insulina (His₆-Z000810-Cys; *PBS00014*) se redujeron a monómeros como se describe en el Ejemplo 1 c.

Las fracciones de las columnas PD-10 agrupadas se mezclaron con la solución de avidina activada con maleimida desalada (16,1 ml) en una proporción molar que corresponde a aproximadamente 1:1 y se dejó proceder el acoplamiento durante una noche a temperatura ambiente, con agitación suave de la mezcla de acoplamiento.

El siguiente día, la mezcla de conjugación se analizó por SDS PAGE. Esto mostró que toda la avidina había reaccionado y que aún había presente algo de Aficuerpo anti insulina que no había reaccionado.

La mezcla de conjugación se congeló hasta la purificación mediante CET.

Ejemplo 1e. Preparación de la molécula de PAD [Aficuerpo (Insulina) - Avidina]

La avidina (9 mg) se activó con sulfo-SMCC como se describe en el Ejemplo 1a.

Los dímeros de disulfuro de Aficuerpo anti insulina (Insulina, His₆-Z01139-Cys; *PBS00022*) se redujeron a

monómeros como se describe en el Ejemplo 3c.

Las fracciones de la columna PD-10 agrupadas se mezclaron con la solución de avidina activada con maleimida desalada (16,1 ml), en una proporción molar que corresponde a aproximadamente 1:1 y se dejó transcurrir el acoplamiento durante una noche a temperatura ambiente, con agitación suave de la mezcla de acoplamiento.

- 5 El siguiente día, la mezcla de conjugación se analizó por SDS PAGE. Esto mostró que toda la avidina había reaccionado y que aún había presente algo de Aficuerpo anti Insulina que no había reaccionado. La mezcla de conjugación se congeló hasta la purificación mediante CET.

Ejemplo 2. Construcciones de afinidad doble recombinantes para la expresión en *Aspergillus oryzae*.

10 Cepas

Aspergillus oryzae BECh2 se describe en el documento WO 00/39322, ejemplo 1, que se refiere además a JaL228 descrita en el documento WO 98/12300, ejemplo 1.

JaL1168 se describe en el ejemplo 2g.

JaL1171 se describe en el ejemplo 2g.

- 15 JaL1174 se describe en el ejemplo 2g.

JaL1176 se describe en el ejemplo 2g.

JaL1181 se describe en el ejemplo 2g.

JaL1210 se describe en el ejemplo 2g.

- 20 MT173 es un derivado de MC1000 (Casadaban y Cohen J. Mol. Biol. 138 (1980) 179-207), los cuales son *ara*⁺ y *leuB6*.

Genes

AMG: indica el gen de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* (Boel y col., EMBO Journal 3 (1984) 1581-1585)

- 25 Z: indica el dominio Z de la proteína A de *Staphylococcus aureus* (Nilsson y col., Protein Engineering 1 (1987), 107-113).

Pre-CBD_(C315): indica la señal de la endoglucanasa II (DSM971) de *Meripilus giganteus* (pre) + el dominio de unión a celulosa (CBD) + la región conectora.

CBD(egv): indica la región conectora de la endoglucanasa V de *Humicola insolens* (DSM1800) + el dominio de unión a celulosa.

- 30 VhhRR6(2): indica la región variable de un anticuerpo monocatenario de llama que reacciona frente al hapteno azo-colorante Rojo Reactivo (RR6) (Frenken y col., J. Biotechnology 78 (2000) 11-21).

Plásmidos

p775 se describe en el documento EP 238023.

- 35 pA2C315 está depositado en el DSM (sigla en alemán de Colección Alemana de Microorganismos, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen*) con el n.º de referencia DSM971. El plásmido contiene un clon de ADNc de *Meripilus giganteus* que codifica un gen de la endoglucanasa II.

pCAMG91 se describe en Boel y col. EMBO Journal 3 (1984), 1581-1585.

pJaL790 se describe en el documento WO2005070962, ejemplo 1.

- 40 pJaL1153 se describe en el ejemplo 2c.

pJaL1154 se describe en el ejemplo 2a.

pJaL1158 se describe en el ejemplo 2d.

pJaL1159 se describe en el ejemplo 2a.

pJaL1164 se describe en el ejemplo 2c.

- 45 pJaL1165 se describe en el ejemplo 2d.

pJaL1168 se describe en el ejemplo 2e.

pJaL1169 se describe en el ejemplo 2b.

pJaL1170 se describe en el ejemplo 2f.

pJaL1171 se describe en el ejemplo 2b.

- 50 pMT2786 se describe en el documento WO2006050737 ejemplo 2.

pSX320 se describe en el documento EP 0 531 372.

Cebadores y secuencias de ADN

ADN sintético 1 (SEQ ID NO 1)

ADN sintético 2 (SEQ ID NO 4)

- 55 Secuencia de adaptador 1 (SEQ ID NO 5)

Secuencia de adaptador 2 (SEQ ID NO 6)

cebador 8683 (SEQ ID NO 10)

cebador CBD:Z-NA (SEQ ID NO 11)

cebador Z-NA (SEQ ID NO 12)

- 60 cebador Z-CA (SEQ ID NO 13)

cebador Z-CA: CBD (SEQ ID NO 14) cebador 8654 (SEQ ID NO 15)
 cebador CBD: Z-NB (SEQ ID NO 19)
 cebador Z-NB (SEQ ID NO 20)
 cebador Z-CB (SEQ ID NO: 21)
 cebador Z-NB: CBD (SEQ ID NO 22)

Procedimientos

Los procedimientos generales de PCR, clonación, ligamiento de nucleótidos etc. son bien conocidos para un experto en la materia y pueden encontrarse, por ejemplo, en "Molecular cloning: A laboratory manual", Sambrook y col. (1989), Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. y col. (eds.); "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, (1995); Harwood, C. R., & Cutting, S. M. (eds.); "DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II", D. N. Glover ed. (1985); "Oligonucleotide Synthesis", M.J. Gait ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization", B. D. Hames & S.J. Higgins eds (1985); "A Practical Guide To Molecular Cloning", B. Perbal, (1984).

Amplificación por PCR

Todas las amplificaciones por PCR se realizaron en un volumen de 100 microlitros que contenía 2,5 unidades de polimerasa Taq, 100 ng de pSO2, cada dNTP 250 nM y cada uno de los dos cebadores descritos anteriormente 10 pmol en un tampón de reacción de KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, MgCl₂ 1,5 mM. La amplificación se llevó a cabo en un Cetus DNA Thermal 480 de Perkin-Elmer y consistió en un ciclo de 3 minutos a 94 °C, seguido de 25 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C.

Transformación de *Aspergillus*

La transformación de *Aspergillus* se realizó como se describe en Christensen y col.; Biotechnology 1988 6 1419-1422. En resumen, se creció micelio de *A. oryzae* en un caldo rico en nutrientes. El micelio se separó del caldo mediante filtración. Se añadió al micelio preparación de enzima Novozyme® (Novo Nordisk) en tampón osmóticamente estabilizado tal como MgSO₄ 1,2 M tamponado hasta pH 5,0 con fosfato de sodio. La suspensión se incubó durante 60 minutos a 37 grados C con agitación. El protoplasto se filtró a través de mira-cloth para eliminar los residuos miceliares. El protoplasto se recogió y se lavó dos veces con STC (sorbitol 1,2 M, CaCl₂ 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5). Para finalizar, los protoplastos se resuspendieron en 200-1000 microlitros de STC.

Para la transformación, se añadieron 5 microgramos de ADN a 100 microlitros de una suspensión de protoplastos y, después, se añadieron 200 microlitros de solución de PEG (PEG 4000 al 60 %, CaCl₂ 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5) y la mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los protoplastos se recogieron y se lavaron dos veces con sorbitol 1,2 M. Para finalizar, el protoplasto se resuspendió en 200 microlitros de sorbitol 1,2 M. Los transformantes que contenían un gen niaD intacto se seleccionaron por su capacidad de utilizar nitrato como única fuente de nitrógeno en placas de medio mínimo (Cove D. J. 1966. Biochem., Biophys. Acta 113: 51-56) que contenían sacarosa 1,0 M como fuente de carbono, nitrato de sodio 10 mM como fuente de nitrógeno. Después de 4-5 días de crecimiento a 37 grados C, aparecieron transformantes estables como colonias con crecimiento vigoroso y esporulantes. Los transformantes se purificaron dos veces a través de conidiosporas.

Medios y reactivos

Medio YPM (extracto de levadura 2 g/l, peptona 2 g/l y maltosa al 2 %)

Crecimiento de los transformantes de *Aspergillus*

Se inoculó un matraz agitador que contenía 10 ml de medio YPM con esporas procedentes de los transformantes respectivos, y se incubó a 30 grados C, a 200 rpm durante 4 días.

SDS-page

Los geles de SDS utilizados fueron geles prefabricados Criterion™ XT, de Bis-Tris al 10 %, de BIO-RAD y se corrieron y tiñeron con azul de Coomassie, según recomendaba el fabricante.

Ejemplo 2a

Construcción del casete de expresión de *Aspergillus* pJaL1159 (pre-CBD_(C315)-KR::VhhRR6(R2)::Z::Z)

El plásmido pJaL1154 contiene un ADN sintético de SEQ ID NO 1 en pUC19 que codifica una proteína de fusión compuesta de: señal + dominio de unión a celulosa + conector de C315, los aminoácidos KR, la región variable de un anticuerpo monocatenario de llama generado frente al colorante reactivo RR6 y una repetición del dominio Z de la proteína A (pre-CBD_(C315)-KR::VhhRR6(R2)::Z::Z).

El vector de expresión pJaL1159 se construyó para la transcripción de la proteína de fusión pre-CBD_(C315)-KR::VhhRR6(R2)::Z::Z (SEQ ID NO 2). El plásmido pJaL1154 que portaba la proteína de fusión se digirió con *Bam*HI-*Xho*I. El fragmento de 966 pb se purificó por gel y se ligó en el casete de expresión de *Aspergillus* pMT2786

digerido con *BamHI-XhoI* (un fragmento de 6936 pb). La mezcla de ligamiento se transformó en *E. coli* MT173 utilizando el gen *Leu2* de *Saccharomyces cerevisiae* como marcador de selección para crear el plásmido de expresión pJaL1159. El plásmido amplificado se recuperó utilizando un kit de Miniprep QIAprep® Spin (QIAGEN, Chatsworth, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 5 El plásmido pMT2786 comprende un casete de expresión a base del promotor de la amilasa neutra II de *Aspergillus niger* fusionado con la secuencia líder no traducida de la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* (promotor Na2/tpi) y el terminador de la amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (terminador de AMG), el marcador de selección *amdS* de *Aspergillus nidulans*, que permite el crecimiento en acetamida como fuente de nitrógeno y que tiene el gen *Leu2* de *Saccharomyces cerevisiae* para la selección en *E. coli*.

10

Ejemplo 2b

Construcción del casete de expresión de *Aspergillus* pJaL1171 pre-CBD_(C315)-KR::VhhRR6(R2)::Z.

- 15 Para la construcción de la proteína de fusión pre-CBD_(C315)-KR::VhhRR6(R2)::Z (SEQ ID NO 3), el plásmido pJaL1154 se digirió con *BglII* y el fragmento de 3472 pb se purificó mediante gel y se ligó consigo mismo dando como resultado pJaL1169. El fragmento *BamHI-XhoI* de 795 pb procedente de pJaL1169 se purificó y ligó en el casete de expresión de *Aspergillus* pMT2780 digerido con *BamHI* y *XhoI* (un fragmento de 6936 pb). Para crear el plásmido de expresión pJaL1171, la mezcla de ligamiento se transformó en *E. coli* MT173 utilizando el gen *Leu2* de *Saccharomyces cerevisiae* como marcador de selección. El plásmido amplificado se recuperó utilizando un kit de Miniprep QIAprep® Spin (QIAGEN, Chatsworth, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 2c

Construcción del casete de expresión de *Aspergillus* pJaL1164 AMG_(1-526aa)::Z::Z

El plásmido pJaL1153 contiene un ADN sintético de SEQ ID NO 4 en pUC19 que codifica una proteína de fusión compuesta de: el ADN de AMG de *Aspergillus niger* que codifica los aminoácidos 488 - 526 y una repetición del dominio Z procedente de la proteína A (AMG_(488-526aa)::Z::Z).

- 25 El plásmido pToC100 contiene el AMG de *Aspergillus niger* (Boel y col., EMBO Journal 3 (1984), 1581-1585) regulado mediante el promotor TAKA de p775 y, al mismo tiempo, se introdujo un sitio *BamHI* delante del codón de iniciación de AMG. pToC100 se construyó mediante ligamiento de los siguientes fragmentos: fragmento *BamHI-NcoI* de 4306 pb de p775, un adaptador de SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, *BssHII-PstI* de 860 pb de pCAMG91 y el fragmento *PstI-NcoI* de 1410 pb de pCAMG91.

- 30 El vector de expresión pJaL1164 se construyó para la transcripción de la proteína de fusión AMG_(1-526aa)::Z::Z (SEQ ID NO 7). Se purificó por gel un fragmento de *BamHI-DraIII* de 1723 pb y un fragmento de *DraIII-XhoI* de 458 pb a partir de los plásmidos pToC100 y pJaL1153, respectivamente, y se ligaron en el casete de expresión de *Aspergillus* pMT2786 digerido con *BamHI-XhoI* (un fragmento de 6936 pb). La mezcla de ligamiento se transformó en *E. coli* MT173 utilizando el gen *Leu2* de *Saccharomyces cerevisiae* como marcador de selección para crear el plásmido de expresión pJaL1164. El plásmido amplificado se recuperó utilizando un kit de Miniprep QIAprep® Spin (QIAGEN, Chatsworth, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante

35

Ejemplo 2d

Construcción del casete de expresión de *Aspergillus* pJaL1165 AMG_(1-526aa)::Z

- 40 Para la construcción de un plásmido de expresión que codifica la proteína de fusión AMG_(1-526aa)::Z (SEQ ID NO 8), el plásmido pJaL1153 se digirió con *BglII*, y el fragmento de 2969 pb se purificó por gel y se ligó consigo mismo dando como resultado pJaL1158. Se purificó un fragmento *BamHI-DraIII* de 1723 pb procedente de pToC100 y un fragmento de 287 pb procedente de pJaL1158, y se ligaron en el casete de expresión de *Aspergillus* pMT2786 digerido con *BamHI* y *XhoI* (un fragmento de 6936 pb). Para crear el plásmido de expresión pJaL1165, la mezcla de ligamiento se transformó en *E. coli* MT173 usando el gen *Leu2* de *Saccharomyces cerevisiae* como marcador de selección. El plásmido amplificado se recuperó utilizando un kit de Miniprep QIAprep® Spin (QIAGEN, Chatsworth, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45

Ejemplo 2e

Construcción del casete de expresión de *Aspergillus* pJaL1168 pre-CBD_(C315)::Z::Z::CBD_(EGV)

- 50 La construcción del plásmido de expresión pJaL1168 que codifica para la proteína de fusión pre-CBD_(C315)::Z::Z::CBD_(EGV) (SEQ ID NO 9) se realizó mediante amplificación por PCR: 1) de la región pre-CBD_(C315) utilizando pA2C315 como molde y la pareja de cebadores 8683/CBD:Z-NA (SEQ ID NO 10 y 11), 2) de la región Z::Z utilizando pJaL1153 como molde y la pareja de cebadores Z-NA/Z-CA (SEQ ID NO 12 y 13) y 3) de la región CBD_(EGV) utilizando pSX320 como molde y la pareja de cebadores Z-CA: CBD/8654 (SEQ ID NO 14 y 15), lo que dio como resultado 3 fragmentos de ADN de 337 pb, 382 pb y 344 pb, respectivamente. Los 3 fragmentos se mezclaron

y utilizaron como molde para la amplificación por PCR de un fragmento de 983 pb con la pareja de cebadores 8653/8654. El fragmento de PCR se digirió con *Bam*HI-*Hind*III y el fragmento de 798 pb se purificó y clonó, ligado en el casete de expresión de *Aspergillus* pJaL790 digerido con *Bam*H I-*Hind*III (un fragmento de 7386 pb). Para crear el plásmido de expresión pJaL1168, la mezcla de ligamiento se transformó en *E. coli* DB6507 utilizando el gen *Ura3* de *Saccharomyces cerevisiae* como marcador de selección. El plásmido amplificado se recuperó utilizando un kit de Miniprep QIAprep® Spin (QIAGEN, Chatsworth, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El plásmido pJaL790 comprendía un casete de expresión a base del promotor de la amilasa neutra II de *Aspergillus niger* fusionado con la secuencia líder no traducida de la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* (promotor Na2/tpi) y el terminador de la amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (terminador de AMG), el marcador de selección *amdS* de *Aspergillus oryzae* que permite el crecimiento en acetamida como fuente de nitrógeno.

Ejemplo 2f

Construcción del casete de expresión de *Aspergillus* pJaL1170 pre-CBD_(C315)-KR::Z::CBD_(C315)::CBD_(EGV)

El plásmido pJaL802 es un plásmido de expresión de *Aspergillus* construido sobre pJaL790, el cual contiene un ADN (SEQ ID NO 16) que codifica la proteína de fusión pre-CBD_(C315)::CBD_(EGV) (SEQ ID NO 17).

La construcción del plásmido de expresión pJaL1170 codifica la proteína de fusión pre-CBD_(C315)-KR::Z::CBD_(C315)::CBD_(EGV) (SEQ ID NO 18) se realizó mediante amplificación por PCR: 1) de la región pre-CBD_(C315)-KR utilizando pA2C315 como molde y la pareja de cebadores 8683/CBD:Z-NB (SEQ ID NO 10 y 19), 2) de la región Z::Z utilizando pJaL1153 como molde y la pareja de cebadores Z-NB/Z-CB (SEQ ID NO 20 y 21) y 3) de la región CBD_(C315)-CBD_(EGV) utilizando pJaL802 como molde y la pareja de cebadores Z-CB:CBD/8654 (SEQ ID NO 22 y 15), lo que dio como resultado 3 fragmentos de ADN de 343 pb, 382 pb y 443 pb, respectivamente. Los 3 fragmentos se mezclaron y utilizaron como molde para la amplificación por PCR de un fragmento de 1088 pb con la pareja de cebadores 8653/8654. El fragmento de PCR se digirió con *Bam*HI-*Hind*III y el fragmento de 894 bp se purificó y se clonó, ligado en el casete de expresión de *Aspergillus* pJaL790 digerido con *Bam*H I-*Hind*III (un fragmento de 7386 pb). Para crear el plásmido de expresión pJaL1170, la mezcla de ligamiento se transformó en *E. coli* DB6507, utilizando el gen *Ura3* de *Saccharomyces cerevisiae* como marcador de selección. El plásmido amplificado se recuperó utilizando un kit de Miniprep QIAprep® Spin (QIAGEN, Chatsworth, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 2g

Expresión del PAD en cepas de *Aspergillus oryzae*

Las cepas BECh2 de *Aspergillus oryzae* se transformaron con los plásmidos de expresión pJaL1159, pJaL1164, pJaL1165, pJaL1168, pJaL1170 y pJaL1171, como se describe en los procedimientos. Se inoculó un matraz agitador que contenía 10 ml de medio YPM (extracto de levadura 2 g/l, peptona 2 g/l y maltosa al 2 %) con esporas procedentes de los transformantes generados y el hospedador BECh2, y se incubó a 30 °C con agitación (200 Rpm) durante 4 días. Los sobrenadantes (10 µl) se analizaron en SDS-page. Los transformantes que producían la proteína deseada a partir de cada uno de los plásmidos pJaL1159, pJaL1164, pJaL1165, pJaL1168, pJaL1170 y pJaL1171 se nombraron como JaL1210, JaL1168, JaL1171, JaL1174, JaL1176 y JaL1181, respectivamente. Los productos del tamaño esperado de cada transformante se confirmaron mediante SDS-page. La secuencia de aminoácidos de cada una de las construcciones producidas en JaL1210 (VhhRR6(R2)::Z::Z), JaL1168 (AMG_(1-526aa)::Z::Z), JaL1171 (AMG_(1-526aa)::Z), JaL1174 (CBD_(C315)::Z::Z::CBD_(EGV)), JaL1176 (Z::Z::CBD_(C315)::CBD_(EGV)) y JaL1181 (VhhRR6(R2)::Z), se muestran en las SEQ ID NO 23, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25, SEQ ID NO 26, SEQ ID NO 27 y SEQ ID NO 28, respectivamente.

Ejemplo 3. Construcciones de afinidad doble recombinantes para la expresión en *Bacillus licheniformis*.

Medios

El agar LB, el medio TY bouillon y el medio de matraz agitador BPX se han descrito todos en la Publicación de Patente WO 94/14968.

Los medios CAL 18-2 (11): extracto de levadura (n.º 0127-17-9 Difco Laboratories, MI, USA) 40 g; sulfato de magnesio (n.º 5886 Merck, Darmstadt, Alemania) 1,3 g; Glucidex 12 (Roquette Feres, Francia) 50 g; dihidrogenofosfato de sodio (n.º 6346 Merck, Darmstadt, Alemania) 20 g; EDF-metales traza (véase la receta a continuación) 6,7 ml; Na₂MoO₄-metales traza (véase la receta a continuación) 6,7 ml; Pluronic PE6100 (BASF, Alemania) 0,1 ml; agua de intercambio iónico, ajustar hasta 1000 ml. Se mezcla todo, se ajusta a volumen, se mide el pH y se ajusta a pH 6,0 usando NaOH. Los medios se esterilizan autoclavando a 121 °C durante 20 min. EDF-metales traza (11): sulfato de manganeso (II) (n.º 5963 Merck, Darmstadt, Alemania) 4,48 g; cloruro de hierro (III) (n.º 3943 Merck, Darmstadt, Alemania) 3,33 g; sulfato de cobre (II) (n.º 2790 Merck, Darmstadt, Alemania) 0,625 g; sulfato de cinc (n.º 8883 Merck, Darmstadt, Alemania) 7,12 g; agua de intercambio iónico, ajustar hasta 1000 ml. se mezcla todo, se ajusta el volumen. La solución se esteriliza por filtración y se mantiene a 4 °C. Na₂MoO₄-metales traza (11): molibdato de sodio (n.º 6521 Merck, Darmstadt, Alemania) 2,0 g; agua de intercambio iónico, ajustar

hasta 1000 ml. Se mezcla todo, se ajusta el volumen. La solución se esteriliza por filtración y se mantiene a 4 °C.

Cepas y organismos donantes

Bacillus subtilis PL1801. Esta cepa es *B. subtilis* DN1885 con los genes *apr* y *npr* interrumpidos (Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B. R., Sjöholm, C. (1990) Cloning of *aldB*, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from *Bacillus brevis*. J. Bacteriol., 172, 4315-4321).

Bacillus subtilis PP289-5. Esta cepa es una cepa donante para la conjugación de plásmidos para *Bacillus licheniformis*, descrito en el documento US5843720

Bacillus licheniformis MDT223 descrita en la patente WO2005/123915

Genes

Z: indica el dominio Z de la proteína A de *Staphylococcus aureus* (Nilsson y col., Protein Engineering 1 (1987) 107-113). El gen Z es un gen sintético ensamblado mediante cebadores (SEQ ID NO 29)

Gen de la estreptavidina: indica el gen que codifica la Estreptavidina de *Streptomyces avidinii*, como describe Argarana (Argarana y col. (1986) Nucleic Acids Res. 14, 1871-1882). El gen que codifica la estreptavidina es un gen sintético (SEQ ID NO 30)

Un gen sintético puede construirse mediante ensamble por PCR de oligonucleótidos solapantes, en diversos procedimientos descritos, por ejemplo, en Stemmer y col., Gene 164, pág. 49-53, 1995; Dillon y Rossen, BioTechniques 9, 298-300, 1990; Prodromou y Pearl, Protein Engineering 5, 827-829, 1992; Chn y col., Journal of American Chemical Society 11, 8799-8800, 1994 y otros. Además, tales genes pueden simplemente comprarse a través de una de las muchas empresas comerciales.

Plásmidos

pSJ6208 es un derivado de pUC de *E. coli* descrito en la SEQ ID NO 31.

pSJ6321 es un derivado de pE194 con un gen marcador de eritromicina. El plásmido también contiene la secuencia estabilizadora cryIIIA, ADN que codifica el péptido señal de *amyL* fusionado a una proteasa, seguido de una secuencia cadena abajo de *amyL* (SEQ ID NO 32).

pMOL2743 se describe en este ejemplo (SEQ ID NO 33)

pMOL2744 se describe en este ejemplo (SEQ ID NO 34)

pMOL2746b se describe en este ejemplo (SEQ ID NO 35)

Construcción de Z::Z::estreptavidina de vector de integración para la expresión en *B. licheniformis*

El gen sintético (SEQ ID NO 29) que codifica el dominio Z::Z se amplificó mediante los cebadores SEQ ID NO 36 y SEQ ID NO 37:

SEQ ID NO 36: TCATTCTGCAGCAGCGGCGGATAACAAATTTAACAAGAACAGCA-GAACGCGTTTTATGAAA

SEQ ID NO 37: AACTAAGCGGCCGCTAGCGACTACACTTTAGGAGCTTGCGCGTCAT-TAAGCT

El fragmento de PCR se digirió con *PstI-EagI* y el fragmento de 368 pb se purificó y ligó en el plásmido pSJ6208 (SEQ ID NO 31) derivado de pUC de *E. coli*, digerido con *PstI-EagI*, proporcionando un fragmento de 3389 pb. La mezcla de ligamiento se transformó en *E. coli* SJ2 (Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, BR, Sjöholm, C. (1990). Cloning of *aldB*, which encodes acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from *Bacillus brevis*). El plásmido que contenía el gen Z::Z subclonado, pMOL2743 (SEQ ID NO 33) se recuperó utilizando un kit de Miniprep QIAprep® Spin (QIAGEN, Chatsworth, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El gen sintético (SEQ ID NO 30) que codificaba la estreptavidina se digirió con *HindIII*, proporcionando un fragmento de 620 pb. El plásmido pMOL2743 se trató con enzima de restricción *HindIII* y se trató con fosfatasa alcalina para evitar el religamiento. Los dos fragmentos se ligaron y transformaron en la *E. coli* SJ2. Las colonias se exploraron para la presencia del gen de estreptavidina y se tomaron los clones en donde el gen de estreptavidina estaba inserto en la orientación correcta, dando origen al plásmido pMOL2744 (SEQ ID NO 34). En este plásmido, los genes que codifican el dominio Z::Z y la Estreptavidina están fusionados de forma traduccional.

El gen híbrido que codifica Z::Z::Estreptavidina se transfirió a un vector de integración diseñado para permitir la integración del casete de expresión de amilasa en el cromosoma de una cepa de *B. licheniformis*, que ya contiene un promotor artificial en tándem integrado en el locus *amyL*, como se describe en el ejemplo 6 del documento WO2005/123915. Esto se logró mediante un ligamiento de tres fragmentos. El primer fragmento es una digestión de restricción con *PstI* - *BglII* de pMOL2744, dando origen a un fragmento de 931 pb. El segundo fragmento es una digestión de restricción con *BglII* - *BamHI* del plásmido pSJ6321 (SEQ ID NO 32), aislando un fragmento de 4288

pb. El tercer fragmento es una digestión BamHI - PstI de pSJ 6321, aislando un fragmento de 1234 pb. Los tres fragmentos se ligaron e introdujeron mediante transformación en PL1801, dando origen a un vector de integración pMOL2746b (SEQ ID NO 35).

Después, este plásmido pMOL2746b se retransformó ya sea mediante competencia, electroporación o conjugación en *Bacillus licheniformis* deficiente en proteasas, y se insertó por integración homóloga doble en el locus amyL utilizando una secuencia cryIIIA ya inserta y la secuencia amyL cadena abajo. La cepa de *Bacillus licheniformis* resultante tiene el promotor artificial en tándem y la secuencia cryIIIA que dirige la expresión de Z::Z::Estreptavidina a partir del locus amyL. Es preferente que el hospedador *Bacillus licheniformis* sea deficiente en proteasas, para permitir la expresión de la proteína híbrida Z::Z::Estreptavidina. Las siguientes proteasas se pueden deletar mediante técnicas convencionales utilizando recombinación homóloga doble: mpr, aprE, nprE, vpr, bpr, epr, wprA e ispA.

El hospedador *Bacillus licheniformis* deficiente en proteasas con el casete de expresión que codifica la proteína PAD híbrida Z::Z::Estreptavidina se fermentó en matraces agitadores de 100 ml con el medio CAL18-2, descrito anteriormente, a 30 °C, 300 rpm durante 2 días. En el día uno y el día dos se toman muestras para evaluar la expresión de PAD en un gel de SDS. Los datos muestran una banda de proteína en el tamaño correcto de 30 KDa.

El fragmento de PCR se digiere con las enzimas de restricción Rsa I y Hind III, y el fragmento de 489 pb resultante se clona en el pStrExp1 de 5327 digerido con las enzimas de restricción Nru I y Hind III, mediante ligamiento de ADN y clonación en *B. subtilis* PL1801.

La secuencia de ADN de la fase de lectura abierta que codifica la proteína de fusión se muestra en la SEQ ID NO: 38 y la secuencia de la proteína en la SEQ ID NO: 39.

Ejemplo 4: Expresión de la construcción del PAD en *Bacillus subtilis*

Los transformantes de *B. Subtilis* PL1801 se crecen en matraces agitadores como se describe en la patente WO 2000/075344 y la proteína de fusión se recupera del sobrenadante. Las propiedades de unión a anticuerpo y de unión a biotina de la proteína de fusión se confirman como se muestra en otros lugares en el presente documento.

Ejemplo 5. Purificación del PAD

5a. PAD sintetizado de forma química purificado mediante cromatografía de exclusión por tamaño

Las mezclas de conjugación del ejemplo 1 se cargaron en una columna de exclusión por tamaño para purificar las moléculas de PAD mediante eliminación de los reactantes. La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó en una columna precompactada Superdex 200 16/60. Se cargó en la columna 1 ml de la solución de reacción de PAD. El flujo de bombeo fue de 1,00 ml/min, el eluyente era NaCl 150 mM, Hepes 50 mM pH 7,0 y se recogieron fracciones de 1 ml. Para eliminar los reactantes las fracciones se agruparon a base de las mediciones de la absorbancia a 280 nm.

Las fracciones recogidas y agrupadas se concentraron 10x utilizando tubos de Ultracentrífuga de Amicon con un LPM de 3.000.

5b. PAD recombinante mediante cromatografía de afinidad de IgG-Sefarosa

Las moléculas de PAD recombinante se purificaron del caldo de fermentación mediante filtración estéril y posterior purificación en columna mediante cromatografía de afinidad de IgG.

La columna de IgG-sefarosa se preparó mediante el siguiente procedimiento, suministrado por el vendedor:

Se lavaron 15 g de Sefarosa 4B activada por CNBr de GE Healthcare durante 15 minutos con 3 l de HCl 1 mM. El medio lavado se añadió a 25 ml de solución de IgG 20 mg/ml de DAKO A/SA (X0903) y 50 ml de NaCl 0,75 M, NaHCO₃ 0,15 M pH 8,3. La mezcla se agitó de forma suave durante 95 min a temperatura ambiente. El exceso de IgG se lavó con 75 ml de NaHCO₃ 0,1 M pH 8,3 que contenía NaCl 0,5 M antes de incubar el medio en Tris/HCl 0,1 M pH 8,0 durante 2 horas. El medio se almacenó en etanol al 20 % hasta su uso.

Procedimiento genérico para la purificación de PAD recombinante

Las moléculas de PAD recombinante de los ejemplos 2 y 3 se purificaron mediante un procedimiento cromatográfico de afinidad genérico que aprovecha el dominio de unión a IgG compartido por todas las construcciones de PAD recombinantes. Las moléculas de PAD se purificaron del caldo de fermentación esterilizado por filtración.

La cromatografía se realizó en una columna XK26/20 compactada con aproximadamente 30 ml de IgG-sefarosa. Los caldos de fermentación se esterilizaron por filtración y se cargaron entre 65 ml y 80 ml, dependiendo del volumen del caldo de fermentación filtrado. El flujo de bombeo fue de 1,50 ml/min durante la carga de la muestra y de 2 ml/min durante el lavado y la elución. El tampón A era NaH₂PO₄ 0,1 M pH 7,2, NaCl 0,15 M y el tampón B: ácido cítrico 0,1 M pH 3,5. La columna se lavó con 15 volúmenes de columna de tampón A después de la carga de la muestra. El

material unido se eluyó con 5 volúmenes de columna de tampón B antes de regenerar la columna con 10 volúmenes de columna de tampón A. Se recogieron fracciones de 10 ml. El eluato que tenía un aumento de la absorbancia a 280 nm se agrupó y el pH se ajustó a 7,2 utilizando Tris 1 M. La concentración de la proteína PAD se calculó a partir de la absorción a 280 nm y los coeficientes de absorción teóricos se calcularon a partir de la secuencia primaria utilizando GPMaw 8.0 (Trends in Biochemical Science, vol. 26, n.º 11, noviembre de 2001, pág. 687-689, "GPMaw - a software tool for analyzing proteins and peptides"; véase también <http://www.gpmaw.com/>). El PM de las proteínas purificadas se determinó mediante SDS-PAGE. Las muestras se almacenaron a -18 °C antes del análisis adicional.

Ejemplo 6. Caracterización de las moléculas de PAD con respecto a la fuerza de unión medida en el instrumento Biacore.

La tecnología comercializada de resonancia de plasmón superficial (RPS) para el control en tiempo real de sucesos de unión biomoleculares se utiliza para medir las afinidades de unión de los candidatos PAD candidatos preparados. El principio general de esta tecnología es que el chip sensor de RPS mide cambios en el índice de refracción y los cambios en el índice de refracción correlacionan con cambios en la masa en la capa acuosa cerca de la superficie del sensor. Cuando las moléculas diana en solución se unen a ligandos inmovilizados en la superficie del sensor, la masa aumenta y cuando se disocian de los ligandos la masa disminuye. Este principio facilita un control en tiempo real continuo de la asociación y la disociación de moléculas que interactúan. La presentación gráfica de la relación proporciona información cuantitativa en tiempo real de la especificidad de unión, de la concentración activa de la molécula en una muestra, de las cinéticas de reacción y de la afinidad.

Para evaluar las afinidades de unión para ambas afinidades de unión presentes en el PAD, ya sea la IgG o el ligando de captura tuvieron que inmovilizarse en el chip sensor. Para IgG se utilizó anti mananasa de conejo y para el ligando el chip se recubrió con estreptavidina y después se inmovilizó el ligando a través de biotina ligada al ligando apropiado.

Para medir la unión a RR6 y acarbosa, se prepararon los siguientes compuestos; acarbosa ligada a biotina y RR6 ligado a biotina.

Preparación de acarbosa ligada a biotina

Se disolvió biotina (5 mg, 26 µmol) en DMF (250 µl) en un tubo de eppendorf de 2 ml y a esto se añadió EDC-HCl (5 mg, 26 µmol). La mezcla se agitó a TA durante 30 min. Se disolvió acarbosa (16,1 mg, 25 µmol) en DMF (250 µl) en un tubo de eppendorf de 2 ml y a esto se añadió gota a gota la solución de biotina activada, mientras se agitaba la mezcla de reacción suavemente. Cuando toda la solución de biotina activada se hubo añadido, se utilizaron 100 µl de DMF para lavar el recipiente de reacción y estos 100 µl también se añadieron a la solución de acarbosa. La mezcla de reacción se dejó agitando durante 2 h a TA. Después de esto, el DMF se eliminó mediante liofilización durante una noche a -5 °C. El producto crudo se almacenó a -18 °C, hasta su uso en los experimentos de Biacore.

Preparación de Rojo Reactivo 6 ligado a biotina

Se disolvió biotina (5 mg, 26 µmol) en DMF (250 µl) en un tubo de eppendorf de 2 ml y a esto se añadió EDC-HCl (5 mg, 26 µmol). La mezcla se agitó a TA durante 30 min. Se disolvió 1,4-diaminobutano (25,1 µl, 25 µmol) en DMF (250 µl) en un tubo de eppendorf de 2 ml, y a esto se añadió gota a gota la solución de biotina activada, mientras la mezcla de reacción se agitaba suavemente. Cuando toda la solución de biotina activada se hubo añadido, se utilizaron 100 µl de DMF para lavar el recipiente de reacción y estos 100 µl también se añadieron a la solución de diaminobutano. La mezcla de reacción se dejó agitando durante 2 h a TA.

El Rojo Reactivo 6 (24,4 mg, 25 µmol) se disolvió en DMF (250 µl) en un tubo eppendorf de 2 ml y a esto se añadió gota a gota la solución de biotin-amida, mientras la mezcla de reacción se agitaba suavemente. Cuando se hubo añadido toda la solución de biotin-amida, se utilizaron 100 µl de DMF para lavar el recipiente de reacción y estos 100 µl también se añadieron a la solución de RR6.

La mezcla de reacción se dejó agitando durante una noche a TA. El DMF se eliminó mediante liofilización durante una noche a -5 °C. El producto crudo se almacenó a -18 °C, hasta su uso en los experimentos de Biacore.

Evaluación de Biacore:

Los PAD candidatos se analizaron para la unión al chip sensor de ligando de captura y al chip sensor de biomolécula diana, respectivamente. Se utilizó un instrumento Biacore 3000.

Para estudiar las interacciones entre el extremo de unión a IgG de la molécula de PAD e IgG por un lado, y la interacción entre el extremo de unión a ligando y el ligando (biotina, acarbosa, rojo reactivo) por el otro, se inmovilizaron IgG y el ligando sobre la superficie sensora de un chip sensor como se describe a continuación.

La inmovilización se produjo mediante acoplamiento covalente directo a la superficie (utilizando el Kit Amine Coupling, BiaCore, GE Health Care) o a través de la captura de la molécula como indicaba el fabricante (BiaCore, GE Health Care). Se cuantificó la cantidad de diana acoplada y se expresó en unidades refractivas (UR).

Las interacciones se controlaron inyectando las muestras (20 µl/min) sobre la superficie de sensor del chip preparada. A menos que se indique otra cosa, la unión se evaluó en tampón de acetato de sodio 10 mM pH 5,0 a temperatura ambiente.

Experimento 1:

- 5 Chip: CM5
 Diana inmovilizada: conejo anti Mananasa (10 µg/ml) en tampón de acetato 10 mM pH 5,0. UR de la Diana: 1250 UR
 UR reales:
 CF1: 1349
 CF2: 1492
 10 CF3: 1338
 CF4: 1331

Muestras:

- CF1: Proteína A, inyectado 1 µg/ml
 CF2: Proteína A - Avidina, inyectado 0,5 µg/ml
 15 CF3: Proteína A - Avidina, inyectado 0,5 µg/ml
 CF4: Aficuerpo (IgG) - Avidina, inyectado 0,6 µg/ml

Resultados:

Proteína A	ka	kd	KA	KD	UR finales
Chi ₂ = 0,06	4,35e5	3,4e-6	1,28e11	7,81 e-12	140

Proteína A-Avidina	ka	kd	KA	KD	UR finales
Chi ₂ = 0,737	6,99e5	1,75e-7	3,99e12	2,5e-13	130

Proteína A-Avidina	ka	kd	KA	KD	UR finales
Chi ₂ = 1,82	1,21e6	5,03e-5	2,41e10	4,15e-11	130

Aficuerpo(IgG)-Avidina	ka	kd	KA	KD	UR finales
Chi ₂ = 0,505	9,56e4	6,41 e-8	1,49e12	6,7e-13	105

Experimento 2:

- Chip: CM5
 Diana inmovilizada: conejo anti Mananasa (10 µg/ml) en tampón acetato 10 mM pH 5,0.
 UR de la Diana: 1250 UR
 25 UR reales:
 CF2: 1697
 CF3: 1665

Muestras:

- CF2: CBD-Z-Z-CBD, inyectado 10 µg/ml
 30 CF3: CBD-Z-Z-CBD, inyectado 10 µg/ml

Resultados:

CBD-Z-Z-CBD	ka	kd	KA	KD	UR finales
Chi ₂ = 2,3	1,46e5	2e-4	7,3e8	1,37e-9	200

CBD-Z-Z-CBD	ka	kd	KA	KD	UR finales
Chi ₂ = 3,78	1,23e5	2,08e-4	5,93e8	1,69e-9	200

Experimento 3:

- Chip: CM5
 35 Diana inmovilizada: conejo anti Mananasa (10 µg/ml) en tampón acetato 10 mM pH 5,0.
 UR de la Diana: 1250 UR

UR reales:

CF3: 1485

CF4: 1760

Muestras:

- 5 CF3: AMG-Z, inyectado 10 µg/ml
CF4: AMG-ZZ, inyectado 10 µg/ml

Resultados:

AMG-Z	ka	kd	KA	KD	UR finales
Chi ₂ = 6,76	2,69e6	1,08e-2	2,49e8	4,02e-9	5

AMG-ZZ	ka	kd	KA	KD	UR finales
Chi ₂ = 2,97	3,46e5	4,1 e-4	8,42e8	1,19e-9	150

Experimento 4:

- 10 Chip: CM5
Diana inmovilizada: conejo anti Mananasa (1 µg/ml) en tampón acetato 10 mM pH 5,0.
UR de la diana: 625 UR
UR reales:
CF1: 683
15 CF2: 731
CF3: 881
CF4: 716

Muestras:

- 20 CF1: Proteína A, inyectado 1 µg/ml
CF2: ZZ-CBD-CBD, inyectado 0,1 µg/ml
CF3: VhhRR6(R2)-Z, inyectado 1 µg/ml
CF4: CBD-Z-Z-CBD, inyectado 1 µg/ml

Resultados:

Proteína A	ka	kd	KA	KD	UR finales
Chi ₂ = 1,22	4,27e5	1,26e-4	3,38e9	2,95e-10	55

ZZ-CBD-CBD	ka	kd	KA	KD	UR finales
Chi ₂ = 0,116	4,6e6	3,3e-4	1,39e10	7,18e-11	70

25

VhhRR6(R2)-Z	ka	kd	KA	KD	UR finales
Chi ₂ = 2,35	3,2e5	1e-3	3,2e8	3,13e-9	70

CBD-Z-Z-CBD	ka	kd	KA	KD	UR finales
Chi ₂ = 1,96	2,65e5	2,97e-4	8,94e8	1,12e-9	50

Experimento 5:

Chip: SA

Inmovilización: ninguna. El Chip se prerrecubre con Estreptavidina.

- 30 Inmovilización de ligando a través de la unión Biotina-Estreptavidina

CF1: Biotina-Acarbosa, 10 µg/ml
CF2: Biotina-Acarbosa, 10 µg/ml
CF3: Biotina-Rojo Reactivo 6, 10 µg/ml

Unión del PAD a través del extremo de unión a ligando de la molécula al ligando.

CF1: AMG-Z-Z, 10 µg/ml

CF2: AMG-Z, 10 µg/ml

CF3: VhhRR6(R2)-Z, 10 µg/ml

5 Resultados:

AMG-Z-Z	ka	kd	KA	KD	UR finales
Chi ₂ = 1,38	6,29e3	2,69e-3	2,34e6	4,27e-7	15

AMG-Z	Ka	Kd	KA	KD	UR finales
Chi ₂ = 2,9	1,02e4	1,8e-3	5,64e6	1,77e-7	20

VhhRR6(R2)-Z	Ka	Kd	KA	KD	UR finales
Chi ₂ = 3,24	1,72e4	3,99e-3	4,31 e6	2,32e-7	15

Experimento 6:

Chip: SA

10 Inmovilización: ninguna. El Chip se prerrecubre con Estreptavidina.

Inmovilización de ligando a través de la unión Biotina-Estreptavidina

CF4: Biotina-Rojo Reactivo 6, 10 µg/ml

Unión del PAD a través del extremo de unión a ligando de la molécula al ligando en presencia de la unión a IgG del dominio Z de la molécula de PAD.

15 CF4: VhhRR6(R2)-Z + IgG 9,3 µg/ml

Resultados:

VhhRR6(R2)-Z + IgG	ka	kd	KA	KD	UR finales
Chi ₂ = 5,3	225	6,18e-3	3,65e4	2,74e-5	5

Tabla 1

PAD	Unión a IgG			Ligando	Unión a ligando		
	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (M)		k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (M)
Avidina-Proteína A	1x10 ⁶	3x10 ⁻⁵	2x10 ⁻¹¹	Biotina ^a	-	-	-
Avidina-Aficuerpo (IgG)	1x10 ³	6x10 ⁻⁸	7x10 ⁻¹³	Biotina	-	-	-
AMG-ZZ	4x10 ⁵	4x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁹	Acarbosa	6x10 ³	3x10 ⁻³	4x10 ⁻⁷
AMG-Z	3x10 ⁶	1x10 ⁻²	4x10 ⁻⁹	Acarbosa	1x10 ⁴	2x10 ⁻³	2x10 ⁻⁷
CBD-ZZ-CBD	2x10 ⁵	2x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁹	Celulosa			
ZZ-CBD-CBD	5x10 ⁶	3x10 ⁻⁴	7x10 ⁻¹¹	Celulosa			
VhhRR6(R2)-Z	3x10 ⁵	1x10 ⁻³	3x10 ⁻⁹	RR6 ^b	2x10 ⁴	4x10 ⁻³	2x10 ⁻⁷
Control de Proteína A	5x10 ⁵	7x10 ⁻⁵	2x10 ⁻¹⁰	-	-	-	-

^aLa unión entre biotina y avidina/estreptavidina no se mide, dado que se sabe que es muy estrecha, y por lo tanto no puede medirse disociación. ^bSi VhhRR6(R2)-Z se mezcla con IgG antes de la carga en el Biacore, la K_D es 10⁻⁵ M, sin embargo, la unión se rompe por completo tan pronto como se detiene la inyección.

20 **Ejemplo 7: Purificación de anticuerpos utilizando la tecnología de purificación de polipéptido de afinidad doble**

A continuación hay una descripción breve sobre un procedimiento aplicable en general a la purificación de inmunoglobulinas:

1. Una fase sólida genérica desechable con una molécula ligando de captura de bajo peso molecular.
2. El polipéptido de afinidad doble PAD (por ejemplo Avidina-Proteína A) reacciona con las IgG (biomolécula

diana) en la solución. Las moléculas de PAD están inmovilizadas sobre la fase sólida (por ejemplo biotina-agarosa) en un complejo junto con la proteína diana (IgG).

3. La columna se lava para eliminar los componentes que no son producto que interfieren.

4. La inmunoglobulina se eluye de la columna utilizando un tampón apropiado a bajo pH.

5 5. Las fracciones que contienen anticuerpos se recogen y se neutraliza el pH.

6. Se puede desechar la matriz genérica que contiene el polipéptido de afinidad doble inmovilizado.

Materiales y procedimientos:

Todos los ingredientes de los tampones eran proanálisis. Las proteínas séricas de conejo y la fracción de IgG de conejo, código X0903 eran de DAKO A/S, Dinamarca. La Biotina Agarosa era de Sigma-Aldrich; B6885-5ML.

10 Los experimentos de purificación se realizaron utilizando un sistema de cromatografía que comprendía un recolector de fracciones (Frac-100), un registrador (Rec-1), una unidad óptica y un UV-1 de control, todos de GE Healthcare. Para todos los experimentos se utilizó una Econo-columna ID de 1,0 cm de BioRad con un adaptador de flujo. El tampón de equilibrado y de dilución fue fosfato 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH = 7,2 (PBS). El tampón de elución fue citrato 0,1 M, pH = 3,5 o como alternativa glicina 0,1 M, pH = 2,8.

15 El procesamiento de los datos fue a base de la medición de la Abs a 280 nm utilizando un Gene Quant II de Pharmacia y el coeficiente de extinción para IgG de conejo (1 g/l) de 1,35.

Análisis de la purificación de IgG

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

Ejemplo 7a - Recuperación de IgG de conejo con PAD libre proteína [A - Neutravidina]

20 Se dejó asentar el sorbente (Biotina Agarosa, 5 ml) en la columna durante 10 min. La columna se compactó a un flujo de 1,46 ml/min. La columna se equilibró con 7,5 volúmenes de columna (VC) de PBS. La solución de PAD (Proteína A - Neutravidina) (4,5 ml del ejemplo 1b) se mezcló con 100 µl de solución madre de IgG de conejo (20 g/l) y se incubó durante 5 minutos en un agitador magnético. La solución de reacción se cargó en la columna y se lavó con 7,5 VC de PBS para eliminar el exceso de proteína diana. La IgG se recuperó mediante elución con 3 VC de tampón glicina 0,1 M (pH 2,8). Se recogieron fracciones de 5 ml y se analizaron para el contenido de IgG mediante la Abs a 280. Para los resultados véase la Tabla 2.

Ejemplo 7b - Recuperación de IgG de conejo con PAD inmovilizado [Proteína A - Neutravidina]

El material de gel del ejemplo 7a con PAD inmovilizada [Proteína A - Neutravidina] se regeneró con 7,5 VC de PBS antes del análisis de las capacidades de purificación por afinidad convencional.

30 Los inventores cargaron en la columna 2 mg de IgG en 4,6 ml de solución de PBS. Tras la carga de la muestra, la columna se lavó con 7,5 VC de PBS para eliminar el exceso de proteína. Después, la columna se eluyó con 3 VC de tampón glicina 0,1 M (pH 2,8) para recuperar la IgG. Se recogieron fracciones de 5 ml y se analizaron para el contenido de IgG mediante Abs a 280 y SDS-PAGE. Para los resultados véase la Tabla 2.

Tabla 2.

	Flujo de paso	Recuperado
Ejemplo 1b - PAD libre	74 %	26 %
Ejemplo 1b - PAD inmovilizado	86 %	14 %

35 Como se ve en la Tabla 2, los inventores obtuvieron aproximadamente el doble de capacidad de unión (el 26 % frente al 14 %) cuando el PAD y la IgG se hacen reaccionar en solución antes de la carga en la columna en comparación con la cromatografía de afinidad convencional aplicando PAD inmovilizado.

Ejemplo 7c Purificación de IgG de conejo a partir de suero con PAD libre [Proteína A - Neutravidina]

40 Los inventores estudiaron la purificación de IgG de suero de conejo para mostrar la especificidad de la tecnología de purificación de PAD.

Se dejó asentar aproximadamente 1 ml de sorbente (Biotina Agarosa) en la columna durante 10 min. La columna se compactó a un flujo de 1,46 ml/min. La columna se equilibró con 7,5 volúmenes de columna (VC) de PBS. Se mezclaron 4,5 ml de solución de PAD (Proteína A - Neutravidina) (del ejemplo 1b) con 115 µl de suero de conejo y se incubó durante 5 minutos en un agitador magnético. La solución de reacción se cargó en la columna después de

un lavado con 7,5 VC de PBS para eliminar el exceso de proteína diana. La IgG se recuperó mediante elución con 3 VC de tampón glicina. Se recogieron fracciones de 2,5 ml y se analizaron para el contenido de IgG mediante la Abs 280 y SDS-PAGE. Para los resultados véase la Tabla 3.

Ejemplo 7d Purificación de IgG de conejo a partir de suero con PAD inmovilizado [proteína A - Neutravidina]

- 5 El gel del ejemplo 1 c con PAD inmovilizado [Proteína A - Neutravidina] se regeneró con 7,5 VC de PBS antes del análisis de las capacidades de purificación por afinidad convencional.

Los inventores cargaron en la columna solución de suero de conejo (115 µl de suero de conejo en 4,5 ml de PBS). Tras la carga de la muestra, la columna se lavó con 7,5 VC de PBS para eliminar el exceso de proteína. Después, la columna se eluyó con 3 VC de tampón glicina 0,1 M (pH 2,8) para recuperar la IgG diana. El gel se regeneró con 7,5 VC de PBS antes del siguiente ciclo de purificación de afinidad. Se recogieron fracciones de 2,5 ml y se analizaron para el contenido de IgG mediante la Abs 280 y SDS-PAGE. Para los resultados véase la Tabla 3.

Tabla 3

	IgG recuperada (mg) a partir de suero
Ejemplo 1b - PAD libre	0,31
Ejemplo 1b - PAD inmovilizado	0,18

- 15 Como se ve en la Tabla 3, los inventores obtuvieron aproximadamente el doble de capacidad de unión (0,31 mg frente a 0,18 mg de IgG), cuando el PAD se hizo reaccionar con suero de conejo en solución antes de poner en contacto con la columna de biotina-agarosa, en comparación con la cromatografía de afinidad convencional aplicando PAD inmovilizado.

El SDS-PAGE mostró que solo se obtuvieron del suero moléculas de IgG, lo que muestra que la tecnología de purificación por PAD es específica.

- 20 Los inventores repitieron el análisis utilizando los otros conjugados de PAD (Proteína A-Avidina) y realizaron pruebas similares a las anteriores pero incluyendo un análisis de la filtración de PAD de la columna mediante análisis de unión repetidos para el PAD inmovilizado.

Ejemplo 7e - Recuperación de IgG de conejo con PAD libre [proteína A - Avidina]

- 25 Se dejó asentar el sorbente (Biotina Agarosa, 1 ml) en la columna durante 10 min. La columna se compactó a un flujo de 1,46 ml/min. La columna se equilibró con 7,5 volúmenes de columna (VC) de PBS. Se mezclaron 2 ml de solución de PAD (Proteína A - Avidina) (procedente del ejemplo 3a) con 160 µl de solución madre de IgG de conejo (20 g/l), y se incubó durante 5 minutos en un agitador magnético. La solución de reacción (~2 VC) se cargó en la columna después de un lavado con 7,5 VC de PBS para eliminar el exceso de proteína diana. La IgG se recuperó mediante elución con 3 VC de citrato 0,1 M, pH = 3,5. Se recogieron fracciones de 2,5 ml y se analizaron para el contenido de IgG mediante la Abs 280. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Recuperación de IgG de Conejo de PAD libre frente a reutilizaciones de la tecnología de PAD inmovilizado (conjugado Proteína A - Avidina)

	PAD libre	1. reutilización de PAD inmovilizado	2. reutilización de PAD inmovilizado	3. reutilización de PAD inmovilizado	4. reutilización de PAD inmovilizado
IgG recuperada (mg)	1,20	0,30	0,40	0,40	0,30

Ejemplo 7f - Recuperación de IgG de conejo con PAD inmovilizado [Proteína A - Avidina]

- 35 El gel procedente del ejemplo 7e con PAD inmovilizado [Proteína A-Avidina] se regeneró con 7,5 VC de PBS antes del análisis de las capacidades de purificación de afinidad convencional. Se diluyó la solución madre de IgG de conejo (20 g/l) hasta una concentración de 1,5 mg/ml con PBS. En cada ejecución, se cargaron en la columna 3,2 mg de IgG (en 2,16 ml). Tras la carga de la muestra (~2 VC), la columna se lavó con 7,5 VC de PBS para eliminar el exceso de proteína. Después, la columna se eluyó con 3 VC de tampón de elución (citrato 0,1 M, pH = 3,5) para recuperar la IgG diana. El gel se regeneró con 7,5 VC de PBS de antes del siguiente ciclo de purificación de afinidad. Se recogieron fracciones de 2,5 ml y se analizaron para el contenido de IgG mediante Abs 280.

Cuando el PAD se hace reaccionar con 3,2 mg de IgG en solución antes del contacto con la Biotina-Agarosa, los inventores recuperaron 1,2 mg de IgG en comparación con los 0,35 mg de IgG que se recuperaron en promedio en cuatro ciclos repetidos con PAD inmovilizado.

- 45 Por lo tanto, los resultados anteriores ilustran el efecto ventajoso del uso de un PAD de acuerdo con la invención en

comparación con la cromatografía convencional.

Ejemplo 8 Recuperación de IgG utilizando cromatografía de afinidad doble

Las moléculas de PAD purificadas de los ejemplos 5a y 5b se evaluaron en un ensayo de purificación genérico.

5 Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente utilizando un sistema explorador Äkta. Se compactaron 0,6 ml de material de fase sólida a un flujo de 1,2 ml/min en una columna de vidrio vacía (6,6 x 100 mm), equipada con un adaptador de flujo ajustable (Omnifit). La columna se compactó en fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH = 7,2 (PBS) y antes del uso se dejó equilibrar con 10 volúmenes de columna de PBS seguido de 3 volúmenes de columna de citrato 0,1 M, pH = 3,5 y, para finalizar, 10 volúmenes de columna de PBS.

10 Se analizaron ZZ-CBD-CDB y CBD-ZZ-CBD utilizando una columna compactada con celulosa. Se resuspendieron 1,2 g de Avicel (Merck n.º de producto 1.02331) en 8 ml de PBS en un tubo de ensayo y se dejó asentar la suspensión durante 30 minutos. Posteriormente, las partículas finas se decantaron antes de compactar la columna.

AMG-Z y AMG-ZZ se evaluaron utilizando una columna compactada con Acarbosa-agarosa. Se transfirieron a la columna aproximadamente 0,6 ml de la Acarbosa-agarosa del Ejemplo 9 y se dejó asentar durante 10 minutos antes de compactar la columna.

15 VhhRR6(R2)-Z se analizó utilizando una columna compactada con RR6-agarosa. Se transfirieron a la columna aproximadamente 0,6 ml de Rojo Reactivo-Agarosa del Ejemplo 9, y se dejó asentar durante 10 minutos antes de compactar la columna.

20 Avidina-Proteína A, Avidina-Aficuerpo y ZZ-Estreptavidina se evaluaron utilizando una columna compactada con Biotina-agarosa. Se transfirieron a la columna aproximadamente 0,6 ml de Biotina-agarosa (Sigma B6885) y se dejó que asentar durante 10 minutos antes de compactar la columna.

25 La columna compactada se hizo funcionar a un caudal de 0,6 ml/min. El tampón A fue fosfato de sodio 0,1 M pH 7,2, NaCl 0,15 M y el tampón B fue ácido cítrico 0,1 M pH 3,5. Inicialmente, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón A antes de inyectar la muestra de 0,6 ml. La columna se lavó con 7,5 volúmenes de columna de tampón A y la proteína diana unida se eluyó con 5 volúmenes de columna de tampón B. Para finalizar, la columna se regeneró con 10 volúmenes de columna de tampón A. La detección fue a 280 nm. Los datos se evaluaron mediante la determinación de la altura del pico observado durante la elución.

30 El PAD purificado (8 nmoles) se mezcló con IgG (código X0903, DAKO A/S, 8 nmoles) y se añadieron 660 µl de agua. La mezcla de reacción se incubó en un agitador magnético durante 10 minutos antes de inyectarla en la columna. La solución de proteína diana se preparó como una solución de IgG 2 mg/ml en agua. En todos los experimentos se llevó a cabo la siguiente secuencia de inyecciones: agua; proteína diana (7,1 nmoles); proteína diana y mezcla de reacción de PAD; y finalmente 10 veces inyecciones posteriores de proteína diana (7,1 nmoles).

35 La columna empleada para la evaluación de la molécula de PAD de Proteína A-Avidina se utilizó posteriormente para evaluar el efecto del cambio de carga de la proteína diana variando el volumen de inyección. Se hicieron cuatro inyecciones (0,6; 0,45; 0,3; 0,15) ml de la misma solución de IgG (12 µM). Los resultados mostraron que la altura del pico observado durante la elución fue casi constante, mientras que la altura del pico observado en el flujo de paso disminuyó de forma notoria a medida que la carga de la columna se reducía (Tabla 5). Estos resultados están en conformidad con la naturaleza de la cromatografía de afinidad y demuestran que la estrategia aplicada para la evaluación de los datos utilizando la altura del pico observado durante la elución es válida.

Tabla 5 Alturas de los picos determinadas a partir de las inyecciones de distintos volúmenes de IgG

Volumen de inyección	Altura del pico del flujo de paso	Altura del pico del eluato
ml	mUA	mUA
0,6	154	126
0,45	116	124
0,3	61	120
0,15	14	109

40 La unión no específica de la proteína diana a la columna se evaluó inyectando agua y posteriormente la proteína diana, antes de introducir la molécula de PAD en el material de columna. Las alturas de los picos observadas de las inyecciones de agua y de IgG fueron comparables en todos los experimentos realizados. Esto demuestra que el pico observado durante la elución no se ve afectado por el potencial de unión no específica de la proteína diana a la columna. Por lo tanto, el pico observado durante la elución es una medida de la cantidad recuperada de proteína diana a partir del PAD inmovilizado de forma no covalente.

45 La capacidad de las moléculas de PAD para recuperar la proteína diana se analizó comparando los cromatogramas

obtenidos de la inyección de agua, de proteína diana y de la mezcla de reacción proteína diana/PAD. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Solo dos moléculas de PAD no tuvieron la capacidad de recuperar la proteína diana. 1) VhhRR6(R2)-Z no recuperó IgG, lo que puede explicarse por los resultados a partir del análisis de Biacore que muestran que la unión entre PAD y el ligando se rompe de forma completa tan pronto como se detiene la inyección (nota al pie de la Tabla 1). Esto indica que la molécula de PAD se libera rápidamente de la fase sólida y, por lo tanto, no es adecuada para la cromatografía de afinidad. 2) El PAD ZZ-estreptavidina no recuperó IgG, lo que probablemente se explica por un bloqueo de los sitios de unión a biotina debido a la reacción con biotina endógena presente en el caldo de fermentación. Por lo tanto, es probable que esta preparación de ZZ-estreptavidina no se una a la fase sólida.

Tabla 6 Capacidad de las moléculas de PAD para recuperar la proteína diana

PAD	Material de columna	Unión y elución de la proteína diana
AMG-ZZ	Acarbosa-agarosa	+
AMG-Z	Acarbosa-agarosa	+
ZZ-CBD-CBD	Celulosa	+
CBD-ZZ-CBD	Celulosa	+
VhhRR6(R2)-Z	Rojo reactivo-agarosa	-
ZZ-estreptavidina	Biotina-agarosa	-
Aficuerpo(IgG)-avidina	Biotina-agarosa	+
Proteína A-avidina	Biotina-agarosa	+

Se evaluó la filtración de PAD a partir de la columna mediante 10 inyecciones consecutivas de la proteína diana después de la inyección inicial de la mezcla de reacción de PAD/proteína diana. Se determinaron las alturas de los picos observados durante la elución y se calcularon las respuestas relativas con respecto a la primera inyección de IgG. Las respuestas relativas se representaron en función del número de inyecciones y la disminución relativa de la altura de los picos se calculó por regresión lineal. Los resultados de las distintas combinaciones de PAD - ligando se muestran en la Tabla 7, junto con las constantes de disociación.

Tabla 7 Constantes de disociación y filtración relativa

PAD	$K_{D,t}$ M	$K_{D,s}$ M	$K_{D,t}/K_{D,s}$	Disminución rel. %/iny	r^2
AMG-ZZ	1×10^{-9}	4×10^{-7}	3×10^{-3}	-1,1	0,8
AMG-Z	4×10^{-9}	2×10^{-7}	2×10^{-2}	-1,7	1,0
ZZ-CBD-CBD ^a	7×10^{-11}	10^{-6}	7×10^{-5}	-1,7	1,0
CBD-ZZ-CBD ^a	1×10^{-9}	10^{-6}	1×10^{-3}	-1,7	0,9
Aficuerpo(IgG)-avidina ^b	7×10^{-13}	10^{-15}	7×10^2	-0,2	0,3 ^c
Proteína A-avidina ^b	2×10^{-11}	10^{-15}	2×10^4	-0,7	0,9

^aLa constante de disociación (K_D) de la unión de los CBD a la celulosa en general se considera que es $\approx 10^{-6}$ M (Linder y col, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 60, n.º 5, Dic. 5, 1998). ^bLa constante de disociación (K_D) de la unión de la avidina a la biotina se sabe bien que es de 10^{-15} M (Green, N. (1963). Biochem J, 89, 585-591). ^cEl coeficiente de correlación refleja que la filtración calculada se determina principalmente mediante un único punto. La filtración relativa es del -0,05 % con $r^2 = 0,0$ si este punto se elimina.

Los resultados en la Tabla 7 muestran esquemas de purificación de la misma molécula diana (IgG) utilizando diversas composiciones de moléculas de PAD. Se concluye que las moléculas de PAD más eficaces en la cromatografía de afinidad son aquellas con la unión más estrecha al ligando en la matriz, es decir, las que tienen un $K_{D,t}/K_{D,s}$ relativo $> 10^0 = 1$.

De forma específica, la fuerte unión a la columna proporcionada por los enlaces avidina-biotina evita la filtración de las moléculas de PAD unidas.

Ejemplo 9. Preparación de las resinas funcionalizadas

Materiales

Resina: Mini-Leak-Low (que carga 2-5 mM, Kem-En-Tec).
 Ligandos: 1,4-diaminobutano ([110-60-1], Sigma-Aldrich, D13208), Rojo Reactivo 6 (rojo cereza n.º 14, Grateful Dyes inc.), Acarbosa ([56180-94-0] Sigma-Aldrich, A8980).
 Tampón de acoplamiento: K_2HPO_4 0,5 M - pH 8,5
 Tampón de lavado: K_2HPO_4 0,5 M - pH 7,0
 Tampón de bloqueo: etanolamina en agua Milli-Q 0,1 M

Preparación de una resina de RR6-agarosa

La resina (10 ml, suspendida) se lavó 2 X con agua destilada y el agua se eliminó por filtración. Se disolvió 1,4-diaminobutano (2,0 ml) en tampón de acoplamiento (20 ml) y la resina se añadió de forma lenta mediante agitación suave. Se dejó la resina agitando durante una noche a TA, tras lo cual se lavó con tampón de acoplamiento y se secó por aspiración.

El Rojo Reactivo 6 (15,9 g) se disolvió en tampón de acoplamiento (50 ml) y a esta solución se añadió la resina amino-funcionalizada de forma lenta con agitación. Otra vez, la resina se dejó agitando durante una noche a TA. Después del lavado con agua y con tampón de lavado, la resina se transfirió a tampón de bloqueo (20 ml) y se agitó durante 2 h. Para finalizar, la resina se lavó en agua hasta que el filtrado fue incoloro, y la resina roja se resuspendió en etanol al 30 % en agua Milli-Q.

Preparación de una resina de acarbosa-agarosa

Se lavó la resina (10 ml, suspendida) 2 X con agua destilada y el agua se eliminó por filtración. Se disolvió acarbosa (500 mg) en tampón de acoplamiento (20 ml) y la resina se añadió de forma lenta con agitación suave. Se dejó agitando la resina durante una noche a TA, tras lo cual se lavó con agua y con tampón de lavado.

La resina se transfirió a tampón de bloqueo (20 ml) y se agitó durante 2 h. Para finalizar, la resina se lavó en agua y la resina resultante se suspendió en etanol al 30 % en agua Milli-Q.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S Kyhse Andersen, Jan

<120> Polipéptidos de afinidad doble para purificación

<130> 11297.204-WO

<160> 39

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 972

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia codificante de proteína de fusión

<400> 1

ES 2 613 029 T3

```

ggatccacca tgaaggcgat cctctctctc gctgccgcgc tcttgagcgc cgcgcccgcg      60
ttctcgaccg cagtctgggg ccagtgcggt ggcacggct tctccggcga caccacgtgc      120
accgcttcca cctgcgtgaa ggtcaacgac tactactcgc agtgccagcc tggcgcgtcc      180
gcacccacgt caaccgcctc cgcgcccgcc ccgtccgcgt gccctttggt gaagcgtcag      240
gtgcagttgc aggaatcggg tggaggactc gtgcaggcag gtggctcgct ccggttgctg      300
tgtgcagcct cgggcagggc gacatcggga catggccatt acggtatggg atggttccgc      360
caggtgcctg gaaaggaacg agaattcgtc gcagccatcc ggtgggtccgg caaagagacc      420
tgggtacaaag attcgggtgaa aggacggttc accatctcca gggataacgc gaaaactact      480
gtctacctcc agatgaactc gctcaagccc gaggatacgg cagtgtatta ctgtgccgca      540
aggcctgtcc gagtggacga catctcgctc cccgtggggt tcgattactg gggacagggc      600
acgcaggtga cggctctctc cgataacaaa ttcaacaagg aacagcagaa cgcgttctac      660
gagatcttgc acctcccaa cctcaacgag gaacagagga acggtttcat tcagtcgctc      720
aaggacgacc cctcccagtc cgccaacctc ttggcagaag ccaagaagtt gaacgatgca      780
caggcaccga aagacaacaa gttcaacaaa gagcagcaga acgccttcta tgagatcttg      840
catctccga acttgaacga ggagcagcgg aacggcttca tccagtcctt gaaagatgat      900
ccctcgcagt cggccaacct cctcgcagaa gcgaagaagc tcaacgacgc gcaggcacct      960
aagtgactcg ag                                          972

```

<210> 2
 <211> 318
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión

<400> 2

Met Lys Ala Ile Leu Ser Leu Ala Ala Ala Leu Leu Ser Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Ala Phe Ser Thr Ala Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Phe Ser
 20 25 30
 Gly Asp Thr Thr Cys Thr Ala Ser Thr Cys Val Lys Val Asn Asp Tyr
 35 40 45
 Tyr Ser Gln Cys Gln Pro Gly Ala Ser Ala Pro Thr Ser Thr Ala Ser
 50 55 60
 Ala Pro Gly Pro Ser Ala Cys Pro Leu Val Lys Arg Gln Val Gln Leu
 65 70 75 80
 Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 85 90 95
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ala Thr Ser Gly His Gly His Tyr Gly
 100 105 110
 Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
 115 120 125
 Ala Ile Arg Trp Ser Gly Lys Glu Thr Trp Tyr Lys Asp Ser Val Lys
 130 135 140
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Val Tyr Leu
 145 150 155 160
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 165 170 175
 Ala Arg Pro Val Arg Val Asp Asp Ile Ser Leu Pro Val Gly Phe Asp
 180 185 190
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Asp Asn Lys Phe
 195 200 205
 Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn
 210 215 220
 Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp
 225 230 235 240
 Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
 245 250 255
 Ala Gln Ala Pro Lys Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
 260 265 270
 Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn
 275 280 285

Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu
 290 295 300

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 305 310 315

<210> 3

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión

<400> 3

ES 2 613 029 T3

Met Lys Ala Ile Leu Ser Leu Ala Ala Ala Leu Leu Ser Ala Ala Pro
1 5 10 15

Ala Phe Ser Thr Ala Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Phe Ser
20 25 30

Gly Asp Thr Thr Cys Thr Ala Ser Thr Cys Val Lys Val Asn Asp Tyr
35 40 45

Tyr Ser Gln Cys Gln Pro Gly Ala Ser Ala Pro Thr Ser Thr Ala Ser
50 55 60

Ala Pro Gly Pro Ser Ala Cys Pro Leu Val Lys Arg Gln Val Gln Leu
65 70 75 80

Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu
85 90 95

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ala Thr Ser Gly His Gly His Tyr Gly
100 105 110

Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
115 120 125

Ala Ile Arg Trp Ser Gly Lys Glu Thr Trp Tyr Lys Asp Ser Val Lys
130 135 140

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Val Tyr Leu
145 150 155 160

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
165 170 175

Ala Arg Pro Val Arg Val Asp Asp Ile Ser Leu Pro Val Gly Phe Asp
180 185 190

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Asp Asn Lys Phe
195 200 205

Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn
210 215 220

Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp
225 230 235 240

Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
245 250 255

Ala Gln Ala Pro Lys
260

<210> 4

	<211> 469	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia codificante de proteína de fusión	
	<400> 4	
	cacctcgtgg ccgagtatcg tggctactgg cggcaccact acgacggcta cccccactgg	60
	atcaggcagc gtgacctcga ccagcaagac caccgcgact gctagcaaga ccagcaccga	120
	taacaaattc aacaaggaac agcagaacgc gttctacgag atcttgcacc tccccaacct	180
	caacgaggaa cagaggaacg gtttcattca gtcgctcaag gacgaccctt cccagtccgc	240
	caacctcttg gcagaagcca agaagttgaa cgatgcacag gcaccgaaag acaacaagtt	300
	caacaaagag cagcagaacg ctttctatga gatcttgcac ctcccgaact tgaacgagga	360
	gcagcggaaac ggcttcatcc agtccttgaa agatgatccc tcgcagtcgg ccaacctcct	420
10	cgcagaagcg aagaagctca acgacgcgca ggcacctaag tgactcgag	469
	<210> 5	
	<211> 77	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de adaptador	
20	<400> 5	
	cgcgcttgga aatcacattt gccaaccttg tgcagacgag gccgctcagg gcgagtagag	60
	atcggaacga catggtg	77
25	<210> 6	
	<211> 77	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> Secuencia de adaptador	
	<400> 6	
	gatccaccat gtcgttccga tctctactcg ccttgagcgg cctcgtctgc acagggttgg	60
	caaatgtgat ttccaag	77
35	<210> 7	
	<211> 639	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Proteína de fusión	
45	<400> 7	

Met Ser Phe Arg Ser Leu Leu Ala Leu Ser Gly Leu Val Cys Thr Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Val Ile Ser Lys Arg Ala Thr Leu Asp Ser Trp Leu Ser
 20 25 30
 Asn Glu Ala Thr Val Ala Arg Thr Ala Ile Leu Asn Asn Ile Gly Ala
 35 40 45
 Asp Gly Ala Trp Val Ser Gly Ala Asp Ser Gly Ile Val Val Ala Ser
 50 55 60
 Pro Ser Thr Asp Asn Pro Asp Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Gly
 65 70 75 80
 Leu Val Leu Lys Thr Leu Val Asp Leu Phe Arg Asn Gly Asp Thr Ser
 85 90 95
 Leu Leu Ser Thr Ile Glu Asn Tyr Ile Ser Ala Gln Ala Ile Val Gln
 100 105 110
 Gly Ile Ser Asn Pro Ser Gly Asp Leu Ser Ser Gly Ala Gly Leu Gly
 115 120 125
 Glu Pro Lys Phe Asn Val Asp Glu Thr Ala Tyr Thr Gly Ser Trp Gly
 130 135 140
 Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile Gly
 145 150 155 160
 Phe Gly Gln Trp Leu Leu Asp Asn Gly Tyr Thr Ser Thr Ala Thr Asp
 165 170 175
 Ile Val Trp Pro Leu Val Arg Asn Asp Leu Ser Tyr Val Ala Gln Tyr
 180 185 190
 Trp Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Leu Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser Ser
 195 200 205
 Phe Phe Thr Ile Ala Val Gln His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser Ala
 210 215 220

Phe Ala Thr Ala Val Gly Ser Ser Cys Ser Trp Cys Asp Ser Gln Ala
 225 230 235 240
 Pro Glu Ile Leu Cys Tyr Leu Gln Ser Phe Trp Thr Gly Ser Phe Ile
 245 250 255
 Leu Ala Asn Phe Asp Ser Ser Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr Leu
 260 265 270
 Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp Ser
 275 280 285
 Thr Phe Gln Pro Cys Ser Pro Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Glu Val
 290 295 300
 Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr Thr Leu Asn Asp Gly Leu Ser Asp
 305 310 315 320
 Ser Glu Ala Val Ala Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Thr Tyr Tyr Asn
 325 330 335
 Gly Asn Pro Trp Phe Leu Cys Thr Leu Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr
 340 345 350
 Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp Lys Gln Gly Ser Leu Glu Val Thr Asp
 355 360 365
 Val Ser Leu Asp Phe Phe Lys Ala Leu Tyr Ser Asp Ala Ala Thr Gly
 370 375 380
 Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ser Ser Ile Val Asp Ala Val
 385 390 395 400
 Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe Val Ser Ile Val Glu Thr His Ala Ala
 405 410 415
 Ser Asn Gly Ser Met Ser Glu Gln Tyr Asp Lys Ser Asp Gly Glu Gln
 420 425 430
 Leu Ser Ala Arg Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr Ala
 435 440 445
 Asn Asn Arg Arg Asn Ser Val Val Pro Ala Ser Trp Gly Glu Thr Ser
 450 455 460
 Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr Cys Ala Ala Thr Ser Ala Ile Gly Thr
 465 470 475 480
 Tyr Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Trp Pro Ser Ile Val Ala Thr Gly
 485 490 495
 Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr Ser

500 505 - 510
 Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala Ser Lys Thr Ser Thr Asp Asn Lys
 515 520 525
 Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
 530 535 540
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 545 550 555 560
 Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 565 570 575
 Asp Ala Gln Ala Pro Lys Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn
 580 585 590
 Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg
 595 600 605
 Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn
 610 615 620
 Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 625 630 635

<210> 8
 <211> 583
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión

<400> 8

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

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

370 375 380

Gly Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ser Ser Ile Val Asp Ala
385 390 395 400

Val Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe Val Ser Ile Val Glu Thr His Ala
405 410 415

Ala Ser Asn Gly Ser Met Ser Glu Gln Tyr Asp Lys Ser Asp Gly Glu
420 425 430

Gln Leu Ser Ala Arg Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr
435 440 445

Ala Asn Asn Arg Arg Asn Ser Val Val Pro Ala Ser Trp Gly Glu Thr
450 455 460

Ser Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr Cys Ala Ala Thr Ser Ala Ile Gly
465 470 475 480

Thr Tyr Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Trp Pro Ser Ile Val Ala Thr
485 490 495

Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr
500 505 510

Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala Ser Lys Thr Ser Thr Asp Asn
515 520 525

Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu
530 535 540

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys
545 550 555 560

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
565 570 575

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
580

<210> 9
<211> 259
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Proteína de fusión

<400> 9

ES 2 613 029 T3

Met Lys Ala Ile Leu Ser Leu Ala Ala Ala Leu Leu Ser Ala Ala Pro
1 5 10 15

Ala Phe Ser Thr Ala Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Phe Ser
20 25 30

Gly Asp Thr Thr Cys Thr Ala Ser Thr Cys Val Lys Val Asn Asp Tyr
35 40 45

Tyr Ser Gln Cys Gln Pro Gly Ala Ser Ala Pro Thr Ser Thr Ala Ser
50 55 60

Ala Pro Gly Pro Ser Ala Cys Pro Gly Ser Asp Asn Lys Phe Asn Lys
65 70 75 80

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn
85 90 95

Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
100 105 110

Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln
115 120 125

Ala Pro Lys Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
130 135 140

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe
145 150 155 160

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala
165 170 175

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ser Ser Ser Thr
180 185 190

Ser Ser Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ser
195 200 205

Thr Thr Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr
210 215 220

Ala Glu Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr
225 230 235 240

Thr Cys Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His
245 250 255

Gln Cys Leu

<210> 10
<211> 20

	<212> ADN		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 10		
	gcaagggatg ccatgcttgg	20	
10	<210> 11		
	<211> 38		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 11		
20	cttgtgaat ttgtatccg agccagggca cgcggacg	38	
	<210> 12		
	<211> 38		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 12		
30	cgtccgcgtg ccctggctcg gataacaaat tcaacaag	38	
	<210> 13		
	<211> 42		
	<212> ADN		
35	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
40	<400> 13		
	ggagagctgg tgctgctgga cttaggtgcc tgcgcgtcgt tg	42	
	<210> 14		
	<211> 42		
45	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
50	<400> 14		
	caacgacgcg caggcaccta agtccagcag caccagctct cc	42	
	<210> 15		
55	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
60	<223> Cebador		
	<400> 15		
	catataacca attgccctc	19	
65	<210> 16		
	<211> 372		

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> Secuencia codificante de proteína de fusión

<400> 16

```
atgaaggcga tcctctctct cgctgccgcg ctcttgagcg ccgcgcccgc gttctcgacc      60
gcagtctggg gccagtgcgg tggcatcggc ttctccggcg acaccacgtg caccgcttcc      120
acctgcgtga aggtcaacga ctactactcg cagtgccagc ctggcgcgtc cgcacccacg      180
tcaaccgcct ccgcgcccgc cccgtccgcg tgccctggct cgcagtcgag cccgccagtc      240
cagcctacga ctcccagcgg ctgcactgct gagagggtggg ctcagtgcgg cggcaatggc      300
tggaagcggt gcaccacctg cgctcgctggc agcacttgca cgaagattaa tgactggtac      360
catcagtgcc tg                                     372
```

10 <210> 17
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Proteína de fusión

20 <400> 17

```
Met Lys Ala Ile Leu Ser Leu Ala Ala Ala Leu Leu Ser Ala Ala Pro
 1          5          10          15

Ala Phe Ser Thr Ala Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Phe Ser
          20          25          30

Gly Asp Thr Thr Cys Thr Ala Ser Thr Cys Val Lys Val Asn Asp Tyr
          35          40          45

Tyr Ser Gln Cys Gln Pro Gly Ala Ser Ala Pro Thr Ser Thr Ala Ser
          50          55          60

Ala Pro Gly Pro Ser Ala Cys Pro Gly Ser Gln Ser Ser Pro Pro Val
65          70          75          80

Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu Arg Trp Ala Gln Cys
          85          90          95

Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys Val Ala Gly Ser Thr
          100          105          110

Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys Leu
          115          120
```

25 <210> 18
<211> 294
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión

5

<400> 18

ES 2 613 029 T3

Met Lys Ala Ile Leu Ser Leu Ala Ala Ala Leu Leu Ser Ala Ala Pro
 1 5 10 15
 Ala Phe Ser Thr Ala Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Phe Ser
 20 25 30
 Gly Asp Thr Thr Cys Thr Ala Ser Thr Cys Val Lys Val Asn Asp Tyr
 35 40 45
 Tyr Ser Gln Cys Gln Pro Gly Ala Ser Ala Pro Thr Ser Thr Ala Ser
 50 55 60
 Ala Pro Gly Pro Ser Ala Cys Pro Leu Val Lys Arg Asp Asn Lys Phe
 65 70 75 80
 Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn
 85 90 95
 Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp
 100 105 110
 Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
 115 120 125
 Ala Gln Ala Pro Lys Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
 130 135 140
 Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn
 145 150 155 160
 Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu
 165 170 175
 Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Val
 180 185 190
 Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Phe Ser Gly Asp Thr Thr Cys Thr
 195 200 205
 Ala Ser Thr Cys Val Lys Val Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Gln Pro
 210 215 220
 Gly Ala Ser Ala Pro Thr Ser Thr Ala Ser Ala Pro Gly Pro Ser Ala
 225 230 235 240
 Cys Pro Gly Ser Gln Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser
 245 250 255

Gly Cys Thr Ala Glu Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser
260 265 270

Gly Cys Thr Thr Cys Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp
275 280 285

Trp Tyr His Gln Cys Leu
290

5 <210> 19
<211> 38
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 19
ctgttgaat ttgtatcac gcttcaccaa agggcacg 38

15 <210> 20
<211> 38
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 20
cgtgcccttt ggtgaagcgt gataacaaat tcaacaag 38

25 <210> 21
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 21
ccgcactggc cccagactgc cttaggtgcc tgcgcgtcgt tg 42

35 <210> 22
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Cebador

<400> 22
caacgacgcg caggcaccta aggcagtctg gggccagtgc gg 42

45 <210> 23
<211> 242
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Proteína de fusión

55 <400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ala Thr Ser Gly His
 20 25 30
 Gly His Tyr Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg
 35 40 45
 Glu Phe Val Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Lys Glu Thr Trp Tyr Lys
 50 55 60
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr
 65 70 75 80
 Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Pro Val Arg Val Asp Asp Ile Ser Leu Pro
 100 105 110
 Val Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
 130 135 140
 His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser
 145 150 155 160
 Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys
 165 170 175
 Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu
 180 185 190
 Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu
 195 200 205
 Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln
 210 215 220
 Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
 225 230 235 240
 Pro Lys

<210> 24
 <211> 615
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

<223> Proteína de fusión

<400> 24

Ala Thr Leu Asp Ser Trp Leu Ser Asn Glu Ala Thr Val Ala Arg Thr
 1 5 10 15
 Ala Ile Leu Asn Asn Ile Gly Ala Asp Gly Ala Trp Val Ser Gly Ala
 20 25 30
 Asp Ser Gly Ile Val Val Ala Ser Pro Ser Thr Asp Asn Pro Asp Phe
 35 40 45
 Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Gly Leu Val Leu Lys Thr Leu Val Asp
 50 55 60
 Leu Phe Arg Asn Gly Asp Thr Ser Leu Leu Ser Thr Ile Glu Asn Tyr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ala Gln Ala Ile Val Gln Gly Ile Ser Asn Pro Ser Gly Asp
 85 90 95
 Leu Ser Ser Gly Ala Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asp Glu
 100 105 110
 Thr Ala Tyr Thr Gly Ser Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala
 115 120 125
 Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile Gly Phe Gly Gln Trp Leu Leu Asp Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Thr Ser Thr Ala Thr Asp Ile Val Trp Pro Leu Val Arg Asn
 145 150 155 160
 Asp Leu Ser Tyr Val Ala Gln Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Leu
 165 170 175
 Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile Ala Val Gln His
 180 185 190
 Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser Ala Phe Ala Thr Ala Val Gly Ser Ser
 195 200 205
 Cys Ser Trp Cys Asp Ser Gln Ala Pro Glu Ile Leu Cys Tyr Leu Gln
 210 215 220
 Ser Phe Trp Thr Gly Ser Phe Ile Leu Ala Asn Phe Asp Ser Ser Arg
 225 230 235 240
 Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr Leu Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp
 245 250 255

Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp Ser Thr Phe Gln Pro Cys Ser Pro Arg
 260 265 270
 Ala Leu Ala Asn His Lys Glu Val Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr
 275 280 285
 Thr Leu Asn Asp Gly Leu Ser Asp Ser Glu Ala Val Ala Val Gly Arg
 290 295 300
 Tyr Pro Glu Asp Thr Tyr Tyr Asn Gly Asn Pro Trp Phe Leu Cys Thr
 305 310 315 320
 Leu Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp Lys
 325 330 335
 Gln Gly Ser Leu Glu Val Thr Asp Val Ser Leu Asp Phe Phe Lys Ala
 340 345 350
 Leu Tyr Ser Asp Ala Ala Thr Gly Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Thr
 355 360 365
 Tyr Ser Ser Ile Val Asp Ala Val Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe Val
 370 375 380
 Ser Ile Val Glu Thr His Ala Ala Ser Asn Gly Ser Met Ser Glu Gln
 385 390 395 400
 Tyr Asp Lys Ser Asp Gly Glu Gln Leu Ser Ala Arg Asp Leu Thr Trp
 405 410 415
 Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr Ala Asn Asn Arg Arg Asn Ser Val Val
 420 425 430
 Pro Ala Ser Trp Gly Glu Thr Ser Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr Cys
 435 440 445
 Ala Ala Thr Ser Ala Ile Gly Thr Tyr Ser Ser Val Thr Val Thr Ser
 450 455 460
 Trp Pro Ser Ile Val Ala Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro
 465 470 475 480
 Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala
 485 490 495
 Ser Lys Thr Ser Thr Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
 500 505 510
 Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn
 515 520 525

Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu
530 535 540

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Asp Asn
545 550 555 560

Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu
565 570 575

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys
580 585 590

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
595 600 605

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
610 615

<210> 25
<211> 559
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Proteína de fusión

<400> 25

Ala Thr Leu Asp Ser Trp Leu Ser Asn Glu Ala Thr Val Ala Arg Thr
1 5 10 15

Ala Ile Leu Asn Asn Ile Gly Ala Asp Gly Ala Trp Val Ser Gly Ala
20 25 30

Asp Ser Gly Ile Val Val Ala Ser Pro Ser Thr Asp Asn Pro Asp Tyr
35 40 45

Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Gly Leu Val Leu Lys Thr Leu Val
50 55 60

Asp Leu Phe Arg Asn Gly Asp Thr Ser Leu Leu Ser Thr Ile Glu Asn
65 70 75 80

Tyr Ile Ser Ala Gln Ala Ile Val Gln Gly Ile Ser Asn Pro Ser Gly
85 90 95

Asp Leu Ser Ser Gly Ala Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asp
100 105 110

Glu Thr Ala Tyr Thr Gly Ser Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro
115 120 125

Ala Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile Gly Phe Gly Gln Trp Leu Leu Asp
130 135 140

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

Trp Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr Ala Asn Asn Arg Arg Asn Ser Val
420 425 430

Val Pro Ala Ser Trp Gly Glu Thr Ser Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr
435 440 445

Cys Ala Ala Thr Ser Ala Ile Gly Thr Tyr Ser Ser Val Thr Val Thr
450 455 460

Ser Trp Pro Ser Ile Val Ala Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr
465 470 475 480

Pro Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr
485 490 495

Ala Ser Lys Thr Ser Thr Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn
500 505 510

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg
515 520 525

Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn
530 535 540

Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
545 550 555

<210> 26
<211> 239
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Proteína de fusión

<400> 26

Ala Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Phe Ser Gly Asp Thr Thr
1 5 10 15

Cys Thr Ala Ser Thr Cys Val Lys Val Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys
20 25 30

Gln Pro Gly Ala Ser Ala Pro Thr Ser Thr Ala Ser Ala Pro Gly Pro
35 40 45

Ser Ala Cys Pro Gly Ser Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn
50 55 60

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg
65 70 75 80

Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn
85 90 95

Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Asp
100 105 110

Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
115 120 125

Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
130 135 140

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys
145 150 155 160

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

Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Ser
180 185 190

Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu Arg Trp
195 200 205

Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys Val Ala
210 215 220

Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys Leu
225 230 235

<210> 27
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Proteína de fusión

<400> 27

Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
 1 5 10 15
 His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser
 20 25 30
 Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys
 35 40 45
 Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu
 50 55 60
 Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu
 65 70 75 80
 Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln
 85 90 95
 Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
 100 105 110
 Pro Lys Ala Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Phe Ser Gly Asp
 115 120 125
 Thr Thr Cys Thr Ala Ser Thr Cys Val Lys Val Asn Asp Tyr Tyr Ser
 130 135 140
 Gln Cys Gln Pro Gly Ala Ser Ala Pro Thr Ser Thr Ala Ser Ala Pro
 145 150 155 160
 Gly Pro Ser Ala Cys Pro Gly Ser Gln Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro
 165 170 175
 Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly
 180 185 190
 Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr
 195 200 205
 Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys Leu
 210 215

5 <210> 28
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Proteína de fusión

<400> 28

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ala Thr Ser Gly His
20 25 30
Gly His Tyr Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg
35 40 45
Glu Phe Val Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Lys Glu Thr Trp Tyr Lys
50 55 60
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr
65 70 75 80
Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95
Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Pro Val Arg Val Asp Asp Ile Ser Leu Pro
100 105 110
Val Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
130 135 140
His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser
145 150 155 160
Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys
165 170 175
Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
180 185

<210> 29
<211> 390
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia codificante de domino z::z

<400> 29

ES 2 613 029 T3

```

tcattctgca gcagcggcgg ataacaaatt taacaaagaa cagcagaacg cgttttatga      60
aatcctgcat ctgccgaacc tgaacgaaga acagcgcaac gcgtttatcc agagcctgaa      120
agatgatccg agccagagcg cgaacctgct ggcggaagcg aaaaaactga acgatgcgca      180
ggcgccgaaa gtcgacaaca aatttaataa ggaacaacaa aacgccttct acgaaattct      240
ccatctaccc aatcttaatg aagagcagcg caacgctttt attcaatcgc ttaaggacga      300
tcccagccaa tcggcaaadc ttctggctga agctaaaaag cttaatgacg cgcaagctcc      360
taaagtgtag tcgctagcgg ccgcttagtt                                     390

```

<210> 30
 <211> 626
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de estreptavidina

<400> 30

```

aagcttaatg acgcgcaagc tcctaaagtg gacccgtcaa aagattccaa agcccaggta      60
agtgacagctg aagcaggcat aacgggaaca tgggtacaatc aactgggaag cacgtttatc      120
gtaacagcag gagcggacgg agcgttgaca ggcacatacg aatctgccgt tggaaacgca      180
gaatcgcggtt acacacttac aggtagatac gattcagcac cggctaccga tgggaagcgg      240
actgcattgg gatggagagt ggcttggaag aacaactata gaaatgcgca tagcgccacg      300
acatgggtctg gccaatacgt cggaggagca gaagctagaa tcaatacaca atggacatta      360
acgagcggga ctacagaagc aaatgcctgg aaatcgacgt taagagggtca tgataccttt      420

accaaagtaa agccgtccgc agcatcaatt gatgcagcga agaaagcagg agtgaataac      480
ggtaatcctt tggatgcagt gcaacaatag tcgctagcgg ccgcgtcgac tagaagagca      540
gagaggacgg atttcctgaa ggaaatccgt ttttttattt tgcccgtctt ataaatttcg      600
ttgagatctt gatcatcgat aagctt                                     626

```

<210> 31
 <211> 4084
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> plásmido pSJ6208

<400> 31

tcgcgcggtt	cggtgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	gagacgggtca	60
cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccg	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accatatgcg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgcc	240
attcgccatt	caggctgcgc	aactgttggg	aagggcgatc	ggtgcggggc	tcttcgctat	300
tacgccagct	ggcgaaaggg	ggatgtgctg	caaggcgatt	aagttgggta	acgccagggt	360
tttcccagtc	acgacgttgt	aaaacgacgg	ccagtgaatt	cagatctaaa	gataatatct	420
ttgaattgta	acscctctca	aaagtaagaa	ctacaaaaaa	agaatacggt	atatagaaat	480
atgtttgaac	cttcttcaga	ttacaaatat	attcggacgg	actctacctc	aaatgcttat	540
ctaactatag	aatgacatac	aagcacaacc	ttgaaaattt	gaaaatataa	ctaccaatga	600
acttgttcat	gtgaattatc	gctgtattta	attttctcaa	ttcaatatat	aatatgccaa	660
tacattgtta	caagtagaaa	ttaagacacc	cttgatagcc	ttactatacc	taacatgatg	720
tagtattaaa	tgaatatgta	aatatattta	tgataagaag	cgacttattt	ataatcatta	780
catatttttc	tattggaatg	attaagattc	caatagaata	gtgtataaat	tatttatctt	840
gaaaggaggg	atgcctaaaa	acgaagaaca	ttaaaaacat	atatttgcac	cgtctaattg	900
atttatgaaa	aatcatttta	tcagtttgaa	aattatgtat	tatggccaca	ttgaaagggg	960
aggagaatca	tgaacaaca	aaaacggctt	tacgcccgat	tgctgacgct	gttatttgcg	1020
ctcatcttct	tgctgcctca	ttctgcagca	gcggcgatcg	tcggcggtac	gaaggccagt	1080
acctcgacct	acccgttcgt	ggtcttcctg	actgacagca	ccggtttcca	gttctgcggg	1140
ggcacgctgg	tcaagccgaa	caagggtggtc	acggcgggcg	actgcaccgt	cgggtgagtc	1200
gcggccaaca	tccgcgttgt	cgccggtcgc	gacgacaagc	agagcaccgc	cggcactgtc	1260
tcgaagggtca	gcaagatctg	gatccacccg	agttaccagg	acgccaccaa	gggcagcgac	1320
gtgtcgggtg	tgaccctgtc	gaccagcctg	accagttca	cgccgttgcc	gctggctgcc	1380
accactgaca	ccgcgctgta	caaggagggc	accgccgcga	ccatcctcgg	ctgggggtgac	1440
accaccgagg	gcgggtcggc	ctctcgggtac	ctgctcaagg	cgacagtgcc	gctgaccagc	1500

gacgccacct gcaagaaggc gtacggcgag tacagttcca ccgcgatggt ctgtgccgga	1560
taccgcgagg gtggcacgga cacctgccag ggcgactccg gcgggtccgt cgtcgccggc	1620
aacaagctga tcggcatcac ctcgtggggc cagggctgcy ccgaggccgg ttatccaggc	1680
gtctacaccc gggctgccac ctacagtctg ctgatcacc agcagctcgg ctagtgccta	1740
gcggccgcgt cgactagaag agcagagagg acggatttcc tgaaggaaat ccgttttttt	1800
attttgcccc tcttataaat ttcgttgaga tcttgatcat cgataagctt ggcgtaatca	1860
tgggtcatagc tgtttctctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga	1920
gccggaagca taaagtgtaa agcctggggc gcctaataag tgagctaact cacattaatt	1980
gcgttgctgt cactgcccgc tttccagtgc ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga	2040
atcgccaac gcgcggggag aggcgggttg cgtattgggc gctcttccgc ttcctcgtc	2100
actgactcgc tgcgctcggc cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg	2160
gtaatacggc tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaactatgt agcaaaaggc	2220
cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc	2280
ccccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga	2340
ctataaagat accaggcggt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc	2400
ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcaa	2460
tgctcacgct gtaggtatct cagttcgggt taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg	2520
cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc	2580
aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga	2640
gcgaggatat taggcgggtg tacagagttc ttgaagtggc ggcctaacta cggctacact	2700
agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt	2760
ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtgggttttt tgtttgcaag	2820
cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacggg	2880
tctgacgctc agtggaaacga aaactcacgt taagggattt tgggtcatgag attatcaaaa	2940
aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata	3000
tatgagtaaa cttgggtctga cagttaccaa tgcttaata gtagggcacc tatctcagcg	3060
atctgtctat ttcgttcac catagtgtgc tgactccccg tctgttagat aactacgata	3120
cgggagggct taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg	3180
gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggtcct	3240
gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggagagctag agtaagtagt	3300
tcgccagtta atagtttgcg caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc	3360
tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga	3420
tccccatgt tgtgcaaaaa agcgggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt	3480
aagttggccg cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc	3540
atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa	3600

tagtgtatgc	ggcgaccgag	ttgctcttgc	ccggcggtcaa	tacgggataa	taccgcgcca	3660
catagcagaa	ctttaaaagt	gctcatcatt	ggaaaacgtt	cttcggggcg	aaaactctca	3720
aggatcttac	cgctgttgag	atccagttcg	atgtaaccca	ctcgtgcacc	caactgatct	3780
tcagcatctt	ttactttcac	cagcgtttct	gggtgagcaa	aaacaggaag	gcaaaatgcc	3840
gcaaaaaagg	gaataagggc	gacacggaaa	tggtgaatac	tcatactctt	cctttttcaa	3900
tattattgaa	gcatttatca	gggttattgt	ctcatgagcg	gatacatatt	tgaatgtatt	3960
tagaaaaata	aacaaatagg	ggttccgcgc	acatttcccc	gaaaagtgcc	acctgacgtc	4020
taagaaacca	ttattatcat	gacattaacc	tataaaaata	ggcgtatcac	gaggcccttt	4080
cgtc						4084

<210> 32
 <211> 6691
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia del plásmido pSJ6321

<400> 32

gaattcagat	ctaaagataa	tatctttgaa	ttgtaacsc	cctcaaaagt	aagaactaca	60
aaaaaagaat	acgttatata	gaaatatgtt	tgaaccttct	tcagattaca	aatatatctg	120
gacggactct	acctcaaagt	cttatctaac	tatagaatga	catacaagca	caaccttgaa	180
aatttgaaaa	tataactacc	aatgaacttg	ttcatgtgaa	ttatcgctgt	atttaatttt	240
ctcaattcaa	tatataatat	gccaatacat	tggttacaag	agaaattaag	acaccttga	300
tagccttact	atacctaaca	tgatgtagta	ttaaataaat	atgtaaatat	atttatgata	360
agaagcgact	tatttataat	cattacatat	ttttctattg	gaatgattaa	gattccaata	420
gaatagtgtg	taaattattt	atcttgaaag	gagggatgcc	taaaaacgaa	gaacattaaa	480
aacatatatt	tgcaccgtct	aatggattta	tgaaaaatca	ttttatcagt	ttgaaaatta	540
tgtattatgg	ccacattgaa	aggggaggag	aatcatgaaa	caacaaaaac	ggctttacgc	600
ccgattgctg	acgctgttat	ttgcgctcat	cttcttgctg	cctcattctg	cagcagcggc	660
ggccaccgga	gcgctcccc	agtcaccac	cccggaggcc	gacgcggtct	ccatgcagga	720
ggcgtccag	cgcgacctg	acctgacctc	cgccgaggcc	gaggagctgc	tgcccgccca	780
ggacaccgcc	ttcgaggctg	acgaggccgc	ggccgaggcc	gccggggacg	cctacggcgg	840
ctccgtcttc	gacaccgaga	gcctggaact	gaccgtcctg	gtcaccgatg	ccgccgcggt	900
cgaggccgtg	gaggccaccg	gcgccgggac	cgagctggtc	tcctacggca	tcgacggtct	960
cgacgagatc	gtccaggagc	tcaacgccgc	cgacgccgtt	cccgggtgtg	tcggctggta	1020
cccggacgtg	gcgggtgaca	ccgtcgtcct	ggaggctcct	gagggttccg	gagccgacgt	1080
cagcggcctg	ctcgcggacg	ccggcgtgga	cgcctcggcc	gtcggaggtg	ccacgagcga	1140
ccagcccag	ctctacgccg	acatcatcgg	tggtctggcc	tacaccatgg	gcggccgctg	1200

ttcgggtcggc	ttcgcgggcc	ccaacgccgc	cgggtcagccc	gggttcgtca	ccgccgggtca	1260
ctgcggccgc	gtgggcaccc	aggtgaccat	cggcaacggc	aggggcgtct	tcgagcagtc	1320
cgtcttcccc	ggcaacgacg	cggccttcgt	ccgcggtagc	tccaacttca	cgctgaccaa	1380
cctgggtcagc	cgctacaaca	ccggcgggta	cgccacggtc	gccggtcaca	accaggcccc	1440
catcggctcc	tccgtctgcc	gtcccggtc	caccaccggc	tggcactgcg	gcaccatcca	1500
ggcccgcggc	cagtcgggtga	gtacccccga	gggcaccgtc	accaacatga	cccggaccac	1560
cgtgtgcgcc	gagcccgggc	actccggcgg	ctcctacatc	tccggcaccc	aggcccaggg	1620
cgtgacctcc	ggcgggtccg	gcaactgccg	caccggcggg	accaccttct	accaggaggt	1680
cacccccatg	gtgaactcct	ggggcgtccg	tctccggacc	tgaacgcgtg	ctagcggccg	1740
cgtcgactag	aagagcagag	aggacggatt	tcctgaagga	aatccgtttt	tttattttgc	1800
ccgtcttata	aatttcgttg	agatctacgc	gtccatgggc	tagcgcggcc	gcgtcgacag	1860
gcctctttga	ttacatttta	taattaattt	taacaaagtg	tcatcagccc	tcaggaagga	1920
cttgctgaca	gtttgaatcg	cataggttaag	gcggggatga	aatggcaacg	ttatctgatg	1980
tagcaaagaa	agcaaatgtg	tcgaaaatga	cggtatcgcg	ggtgatcaat	catcctgaga	2040
ctgtgacgga	tgaattgaaa	aagcttggtc	attccgcaat	gaaggagctc	aattatatac	2100
cgaactatgc	agcaagagcg	ctcgttcaaa	acagaacaca	ggtcgtcaag	ctgctcatac	2160
tgaagaaaat	ggatacaaca	gaaccttatt	atatgaatct	gttaacggga	atcagccgcg	2220
agctggaccg	tcattcattat	gctttgcagc	ttgtcacaag	gaaatctctc	aatatcggcc	2280
agtgcgacgg	cattattgcg	acgggggttg	gaaaagccga	ttttgaaggg	ctcatcaagg	2340
tttttgaaaa	gcgtgtcgtt	gtattcggga	cgtcgattca	caaaaatagg	cacacgaaaa	2400
acaagtaagg	gatgcagttt	atgcacccct	taacttactt	attaaataat	ttatagctat	2460
tgaagagaga	taagaattgt	tcaaagctaa	tattgtttta	atcgtcaatt	cctgcatgtt	2520
ttaaggaatt	gttaaattga	ttttttgtaa	atattttctt	gtattctttg	ttaaccattt	2580
tcataacgaa	ataattatac	ttttgtttat	ctttgtgtga	tattcttgat	ttttttctac	2640
ttaatctgat	aagtgcgcta	ttcactttag	gtttaggatg	aaaatattct	cttggaacca	2700
tacttaatat	agaaatatca	acttctgcca	ttaaaagtaa	tgccaatgag	cgttttgtat	2760
ttaataatct	tttagcaaac	ccgtattcca	cgattaaata	aatctcatta	gctatactat	2820
caaaaacaat	tttgcggtatt	atatccgtac	ttatgttata	aggatatatta	ccatatattt	2880
tataggattg	gttttttagga	aattttaaact	gcaatatatc	cttgttttaa	acttggaagt	2940
tatcgtgatc	aacaagttta	ttttctgtag	ttttgcataa	tttatggctc	atttcaatgg	3000
cagttacgaa	attacacctc	tttactaatt	caagggtaaa	atggcctttt	cctgagccga	3060
tttcaaagat	attatcatgt	tcatttaatc	ttatatattgt	cattatttta	tctatattat	3120
gttttgaggt	aataaagttt	tgactgtgtt	ttatattttt	ctcgttcatt	ataaccctct	3180
ttaatttggt	tatatgaatt	ttgcttatta	acgattcatt	ataaccactt	attttttggt	3240
tggttgataa	tgaactgtgc	tgattacaaa	aatactaaaa	atgcccatat	tttttcctcc	3300

ttataaaatt agtataatta tagcacgagc tctgataaat atgaacatga tgagtgatcg	3360
ttaaatttat actgcaatcg gatgcgatta ttgaataaaa gatatgagag atttatctaa	3420
tttctttttt cttgtaaaaa aagaaagttc ttaaagggtt tatagttttg gtcgtagagc	3480
acacggttta acgacttaat tacgaagtaa ataagtctag tgtgttagac tttatgaaat	3540
ctatatacgt ttatatatat ttattatccg gaggtgtagc atgtctcatt caattttgag	3600
ggttgccaga gttaaaggat caagtaatac aaacgggata caaagacata atcaaagaga	3660
gaataaaaaac tataataata aagacataaa tcatgaggaa acatataaaa attatgattt	3720
gattaacgca caaaatataa agtataaaga taaaattgat gaaacgattg atgagaatta	3780
ttcagggaaa cgtaaaattc ggtcagatgc aattcgacat gtggacggac tggttacaag	3840
tgataaagat ttctttgatg atttaagcgg agaagaaata gaacgatttt ttaaagatag	3900
cttggagttt ctagaaaatg aatacggtaa ggaaaatatg ctgtatgcga ctgtccatct	3960
ggatgaaaga gtcccacata tgcactttgg ttttgtccct ttaacagagg acgggagatt	4020
gtctgcaaaa gaacagttag gcaacaagaa agactttact caattacaag atagatttaa	4080
tgagtatgtg aatgagaaa gttatgaact tgaaagaggc acgtccaaag aggttacaga	4140
acgagaacat aaagcgatgg atcagtacaa gaaagatact gtatttcata aacaggaact	4200
gcaagaagtt aaggatgagt tacagaaggc aaataagcag ttacagagtg gaatagagca	4260
tatgaggtct acgaaaccct ttgattatga aaatgagcgt acaggtttgt tctctggacg	4320
tgaagagact ggtagaaaaga tattaactgc tgatgaattt gaacgcctgc aagaaacaat	4380
ctcttctgca gaacggattg ttgatgatta cgaaaatatt aagagcacag actattacac	4440
agaaaatcaa gaattaaaaa aacgtagaga gagtttgaaa gaagtagtga atacatggaa	4500
agaggggtat cagcaaaaaa gttaaagaggt taataaatta aagcgagaga atgatagttt	4560
gaatgagcag ttgaatgtat cagagaaatt tcaagctagt acagtgactt tatatcgtgc	4620
tgcgagggcg aatttccctg ggtttgagaa agggtttaat aggccttaaag agaaattctt	4680
taatgattcc aaatttgagc gtgtgggaca gtttatggat gttgtacagg ataatgtcca	4740
gaaggctgat agaaagcgtg agaaacagcg tacagacgat ttagagatgt agaggactt	4800
ttatgccgag aaaacttttt gcgtgtgaca gtccttaaaa tatacttaga gcgtaagcga	4860
aagtagtagc gacagctatt aactttcggg ttcaaagctc taggattttt aatggacgca	4920
gcgcatcaca cgcaaaaagg aaattggaat aaatgcgaaa tttgagatgt taattaaaga	4980
cctttttgag gtcttttttt cttagatttt tgggggttatt taggggagaa aacatagggg	5040
ggtactacga cctccccctt aggtgtccat tgtccattgt ccaaacaat aaataaatat	5100
tgggttttta atgttaaaag gttgtttttt atgttaaagt gaaaaaaca gatgttggga	5160
ggtacagtga tggttgtaga tagaaaagaa gagaaaaaag ttgctgttac tttagactt	5220
acaacagaag aaaatgagat attaaataga atcaaagaaa aatataatat tagcaaatca	5280
gatgcaaccg gtatttctaataaaaaaatat gcaaaggagg aatacgggtgc attttaaaca	5340

```

aaaaaagata gacagcactg gcatgctgcc tatctatgac taaattttgt taagtgtatt 5400
agcaccgtta ttatatcatg agcgaaaatg taataaaaga aactgaaaac aagaaaaatt 5460
caagaggacg taattggaca tttgttttat atccagaatc agcaaaagcc gagtgggttag 5520
agtattttaa agagttacac attcaatttg tagtgtctcc attacatgat agggatactg 5580
atacagaagg taggatgaaa aaagagcatt atcatattct agtgatgtat gagggttaata 5640
aatcttatga acagataaaa ataattacag aagaattgaa tgcgactatt ccgcagattg 5700
caggaagtgt gaaaggctct gtgagatata tgcttcacat ggacgatcct aataaattta 5760
aatatcaaaa agaagatatg atagtttatg gcggtgtaga tgttgatgaa ttattaaaga 5820
aaacaacaac agatagatat aaattaatta aagaaatgat tgagtttatt gatgaacaag 5880
gaatcgtaga atttaagagt ttaatggatt atgcaatgaa gtttaaatat gatgattggt 5940
tcccgccttt atgtgataac tcggcgtatg ttattcaaga atatataaaa tcaaactcgg 6000
ataaatctga ccgatagatt ttgaatttag gtgtcacaag acactctttt ttgcgaccag 6060
cgaaaactgg ttttaagccga ctgcgcaaaa gacataatcg actctagagg atccccgggt 6120
accgagctct gccttttagt ccagctgatt tcactttttg cattctacaa actgcataac 6180
tcatatgtaa atcgctcctt tttaggtggc acaaagtga ggcattttcg ctctttccgg 6240
caaccacttc caagtaaagt ataacacact atactttata ttcataaagt gtgtgctctg 6300
cgaggctgtc ggcagtgccg accaaaacca taaaaccttt aagacctttc ttttttttac 6360
gagaaaaaag aaacaaaaaa acctgccctc tgccacctca gcaaaggggg gttttgctct 6420
cgtgctcggt taaaaatcag caaggacag gtagtatttt ttgagaagat cactcaaaaa 6480
atctccacct ttaaacctt gccaatTTTT attttgccg ttttgcttag cttaccgaaa 6540
gccagactca gcaagaataa aatttttatt gtctttcggt tttctagtgt aacggacaaa 6600
accactcaaa ataaaaaaga tacaagagag gtctctcgta tcttttattc agcaatcgcg 6660
cccgattgct gaacagatta ataatgagct c 6691

```

<210> 33
 <211> 3757
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia del plásmido pMOL2743

<400> 33

ES 2 613 029 T3

tcgcgcgttt	cggatgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccc	gagacgggtca	60
cagcttgtct	gtaagcggat	gccggggagca	gacaagcccc	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accatatgcg	gtgtgaaata	cgcacacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcagggcgc	240
attcgccatt	caggctgcgc	aactgttggg	aagggcgatc	ggtgcgggcc	tcttcgctat	300
tacgccagct	ggcgaaagg	ggatgtgctg	caaggcgatt	aagttgggta	acgccagggt	360
ttcccagtc	acgacgttgt	aaaacgacgg	ccagtgaatt	cagatctaaa	gataatatct	420

ttgaattgta	acscctc	aaagtaagaa	ctacaaaaaa	agaatacggt	atatagaaat	480
atgtttgaac	cttcttcaga	ttacaaatat	attcggacgg	actctacctc	aaatgcttat	540
ctaactatag	aatgacatac	aagcacaacc	ttgaaaattt	gaaaatataa	ctaccaatga	600
acttggtcat	gtgaattatc	gctgtattta	attttctcaa	ttcaatatat	aatatgccaa	660
tacattgtta	caagtagaaa	ttaagacacc	cttgatagcc	ttactatacc	taacatgatg	720
tagtattaaa	tgaatatgta	aatatattta	tgataagaag	cgacttattt	ataatcatta	780
catatttttc	tattggaatg	attaagattc	caatagaata	gtgtataaat	tatttatctt	840
gaaaggagg	atgcctaaaa	acgaagaaca	ttaaaaacat	atatttgcac	cgtctaattg	900
atttatgaaa	aatcatttta	tcagtttgaa	aattatgtat	tatggccaca	ttgaaagggg	960
aggagaatca	tgaaacaaca	aaaacggctt	tacgcccgat	tgctgacgct	gttatttgcg	1020
ctcatcttct	tgctgcctca	ttctgcagca	gcggcggata	acaaatttaa	caaagaacag	1080
cagaacgcgt	tttatgaaat	cctgcatctg	ccgaacctga	acgaagaaca	gcgcaacgcg	1140
tttatccaga	gcctgaaaga	tgatccgagc	cagagcgca	acctgctggc	ggaagcgaaa	1200
aaactgaacg	atgcgcaggc	gccgaaagtc	gacaacaaat	ttaataagga	acaacaaaac	1260
gccttctacg	aaattctcca	tctacccaat	cttaatgaag	agcagcgcaa	cgcttttatt	1320
caatcgctta	aggacgatcc	cagccaatcg	gcaaactctc	tggctgaagc	taaaaagctt	1380
aatgacgcgc	aagctcctaa	agtgtagtcg	ctagcggccg	cgctcgactag	aagagcagag	1440
aggacggatt	tcctgaagga	aatccgtttt	tttattttgc	ccgtcttata	aatttcgttg	1500
agatcttgat	catcgataag	cttggcgtaa	tcattggtcat	agctgtttcc	tgtgtgaaat	1560
tgttatccgc	tcacaattcc	acacaacata	cgagccggaa	gcataaagt	taaagcctgg	1620
ggtgccta	gagtgaagta	actcacatta	attgcgttgc	gctcactgcc	cgctttccag	1680
tcgggaaacc	tgctgtgcca	gctgcattaa	tgaatcggcc	aacgcgcggg	gagaggcggt	1740
ttgcgtattg	ggcgctcttc	cgcttcctcg	ctcactgact	cgctgcgctc	ggtcgttcgg	1800
ctgcggcgag	cggtatcagc	tcactcaaag	gcggtaatac	ggttatccac	agaatcagg	1860
gataacgcag	gaaagaacat	gtgagcaaaa	ggccagcaaa	aggccaggaa	ccgtaaaaag	1920
gccgcgttgc	tggcgttttt	ccataggctc	cgccccctg	acgagcatca	caaaaatcga	1980
cgctcaagtc	agagggtggc	aaacccgaca	ggactataaa	gataaccagg	gtttccccct	2040
ggaagctccc	tcgtgcgctc	tcctgttccg	accctgccgc	ttaccggata	cctgtccgcc	2100
tttctccctt	cgggaagcgt	ggcgctttct	caatgctcac	gctgtaggta	tctcagttcg	2160
gtgtaggtcg	ttcgctccaa	gctgggctgt	gtgcacgaac	ccccgttca	gcccgaaccg	2220
tgcgcttat	ccggtaacta	tcgtcttgag	tccaacccgg	taagacacga	cttatcgcca	2280
ctggcagcag	ccactggtaa	caggattagc	agagcgaggt	atgtaggcgg	tgctacagag	2340
ttcttgaagt	ggtaggcctaa	ctacggctac	actagaagga	cagtatttgg	tatctgcgct	2400
ctgctgaagc	cagttacctt	cggaaaaaga	gttggtagct	cttgatccgg	caaacaaacc	2460

accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcāga ttacgcgcag aaaaaaagga 2520
tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa cgaaaaactca 2580
cgtaagggga ttttggatcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat 2640
taaaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac 2700
caatgcttaa tcagtgagggc acctatctca gcgatctgtc tatttcggtc atccatagtt 2760
gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagc gcttaccatc tggccccagt 2820
gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag 2880
ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct 2940
attaattggt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt 3000
gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc 3060
tccgggtccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccc tggtgtgcaa aaaagcggtt 3120
agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg 3180
gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg 3240
actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct 3300
tgcccgcggt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaa agtgctcatc 3360
attgaaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt 3420
tcgatgtaac ccaactcgtc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt 3480
tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg 3540
aaatgttgaa tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat 3600
tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg 3660
cgcacatttc ccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta 3720
acctataaaa ataggcgtat cagaggccc tttcgtc 3757

<210> 34
<211> 4234
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia del plásmido pMOL2744

<400> 34

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccc gagacgggtca 60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccc tcagggcgcg tcagcgggtg 120
ttggcgggtg tcggggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
accatattgc gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aaggcgatc ggtgcgggccc tcttcgctat 300
tacgccagct ggcgaaaggg ggaatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cagatctaaa gataatatct 420
ttgaattgta acscctcctca aaagtaagaa ctacaaaaaa agaatacgtt atatagaaat 480

atgtttgaac	cttcttcaga	ttacaaatat	attcggacgg	actctacctc	aatgcttat	540
ctaactatag	aatgacatac	aagcacaacc	ttgaaaattt	gaaaatataa	ctaccaatga	600
acttgttcat	gtgaattatc	gctgtattta	attttctcaa	ttcaatatat	aatatgccaa	660
tacattgtta	caagtagaaa	ttaagacacc	cttgatagcc	ttactatacc	taacatgatg	720
tagtattaaa	tgaatatgta	aatatattta	tgataagaag	cgacttattt	ataatcatta	780
catatttttc	tattggaatg	attaagattc	caatagaata	gtgtataaat	tatttatctt	840
gaaaggaggg	atgcctaaaa	acgaagaaca	ttaaaaacat	atatttgcac	cgtctaattg	900
atttatgaaa	aatcatttta	tcagtttgaa	aattatgtat	tatggccaca	ttgaaagggg	960
aggagaatca	tgaacaaca	aaaacggctt	tacgcccgat	tgctgacgct	gttatttgcg	1020
ctcatcttct	tgctgcctca	ttctgcagca	gcggcggata	acaaatttaa	caaagaacag	1080
cagaacgcgt	tttatgaaat	cctgcatctg	ccgaacctga	acgaagaaca	gcgcaacgcg	1140
tttatccaga	gcctgaaaaga	tgatccgagc	cagagcgcga	acctgctggc	ggaagcgaaa	1200
aaactgaacg	atgcgcaggc	gccgaaagtc	gacaacaaat	ttaataagga	acaacaaaac	1260
gccttctacg	aaattctcca	tctacccaat	cttaatgaag	agcagcgcaa	cgctttttatt	1320
caatcgctta	aggacgatcc	cagccaatcg	gcaaattctc	tggtgaagc	taaaaagctt	1380
aatgacgcgc	aagctcctaa	agtggacccg	tcaaaagatt	ccaaagccca	ggtaagtgca	1440
gctgaagcag	gcataacggg	aacatggtac	aatcaactgg	gaagcacggt	tatcgtaaca	1500
gcaggagcgg	acggagcggt	gacaggcaca	tacgaatctg	ccgttggaag	cgcagaatcg	1560
cgttacacac	ttacaggtag	atacgattca	gcaccggcta	ccgatggaag	cggaactgca	1620
ttgggatgga	gagtggcttg	gaaaaacaac	tatagaaatg	cgcatagcgc	cacgacatgg	1680
tctggccaat	acgtcggagg	agcagaagct	agaatcaata	cacaatggac	attaacgagc	1740
gggactacag	aagcaaatgc	ctggaaatcg	acgttaagag	gtcatgatac	ctttacccaa	1800
gtaaagccgt	ccgcagcatc	aattgatgca	gcgaagaaag	caggagtga	taacggtaat	1860
cctttggatg	cagtgaaca	atagtcgcta	gcggccgcgt	cgactagaag	agcagagagg	1920
acggatttcc	tgaaggaaat	ccgttttttt	attttgcccc	tcttataaat	ttcgttgaga	1980
tcttgatcat	cgataagctt	ggcgtaatca	tggtcatagc	tgtttcctgt	gtgaaattgt	2040
tatccgctca	caattccaca	caacatacga	gccggaagca	taaagtgtaa	agcctggggg	2100
gcctaattgag	tgagctaact	cacattaatt	gcgttgcgct	cactgcccgc	ttccagtcg	2160
ggaaacctgt	cgtgccagct	gcattaatga	atcggccaac	gcgcggggag	aggcggtttg	2220
cgtattgggc	gctcttccgc	ttcctcgctc	actgactcgc	tgcgctcggt	cgttcggctg	2280
cggcgagcgg	tatcagctca	ctcaaaggcg	gtaatacggg	tatccacaga	atcaggggat	2340
aacgcaggaa	agaacatgtg	agcaaaaggc	cagcaaaagg	ccaggaaccg	taaaaaggcc	2400
gcgttgctgg	cgtttttcca	taggctccgc	ccccctgacg	agcatcacia	aaatcgacgc	2460
tcaagtcaga	ggtggcgaaa	cccgcacagga	ctataaagat	accaggcggt	tccccctgga	2520

```

agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgccta cgggatacct gtccgccttt 2580
ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcaa tgctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg 2640
taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc 2700
gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccgggtaa gacacgactt atcgccactg 2760
gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtgc tacagagttc 2820
ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg 2880
ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc 2940
gctggtagcg gtgggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct 3000
caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt 3060
taagggattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa 3120
aatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga cagttaccaa 3180
tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac catagttgcc 3240
tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggaggggt taccatctgg cccagtgct 3300
gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca 3360
gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt 3420
aattgttgcc ggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt 3480
gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc 3540
ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcgggttagc 3600
tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt 3660
atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact 3720
ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc 3780
ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt 3840
ggaaaacggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg 3900
atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct 3960
gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa 4020
tggtgaatac tcatactctt cttttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt 4080
ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc 4140
acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc 4200
tataaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtc 4234

```

<210> 35
 <211> 6453
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia del plásmido pMOL2746b

<400> 35

gaattcagat ctaaagataa tatctttgaa ttgtaacsc cctcaaaagt aagaactaca	60
aaaaaagaat acgttatata gaaatatgtt tgaaccttct tcagattaca aatatattcg	120
gacggactct acctcaaag cttatctaac tatagaatga catacaagca caaccttgaa	180
aatttgaaaa tataactacc aatgaacttg ttcattgtga ttatcgctgt atttaatttt	240
ctcaattcaa tatataatat gccaatacat tggtacaagt agaaattaag acacccttga	300
tagccttact atacctaaca tgatgtagta ttaaataaat atgtaaatat atttatgata	360
agaagcgact tatttataat cattacatat ttttctattg gaatgattaa gattccaata	420
gaatagtgtg taaattattt atcttgaaag gagggatgcc taaaaacgaa gaacattaaa	480
aacatatatt tgcaccgtct aatggattta tgaaaaatca ttttatcagt ttgaaaatta	540
tgtattatgg ccacattgaa aggggaggag aatcatgaaa caacaaaaac ggctttacgc	600
ccgattgctg acgctgttat ttgcgctcat cttcttgctg cctcattctg cagcagcggc	660
ggataacaaa tttaacaaag aacagcagaa cgcgttttat gaaatcctgc atctgccgaa	720
cctgaacgaa gaacagcgca acgcgtttat ccagagcctg aaagatgatc cgagccagag	780
cgcgaaacctg ctggcggaag cgaaaaaact gaacgatgag caggcgccga aagtcgacaa	840
caaatttaat aaggaacaac aaaacgcctt ctacgaaatt ctccatctac ccaatcttaa	900
tgaagagcag cgcaacgctt ttattcaatc gcttaaggac gatcccagcc aatcggcaaa	960
tcttctggct gaagctaaaa agcttaatga cgcgcaagct cctaaagtgg acccgctcaa	1020
agattccaaa gccaggttaa gtgcagctga agcaggcata acgggaacat ggtacaatca	1080
actgggaagc acgtttatcg taacagcagg agcggacgga gcgttgacag gcacatacga	1140
atctgccgtt ggaaacgcag aatcgcgtta cacacttaca ggtagatacg attcagcacc	1200
ggctaccgat ggaagcggaa ctgcattggg atggagagtg gcttgaaaaa acaactatag	1260
aaatgcgcat agcggccagc catggtctgg ccaatacgtc ggaggagcag aagctagaat	1320
caatacaciaa tggacattaa cgagcgggac tacagaagca aatgcctgga aatcgacgtt	1380
aagaggtcat gataccttta ccaaagtaaa gccgtccgca gcatcaattg atgcagcgaa	1440
gaaagcagga gtgaataacg gtaatccttt ggatgcagtg caacaatagt cgctagcggc	1500
cgcgctgact agaagagcag agaggacgga tttcctgaag gaaatccgtt tttttatttt	1560
gcccgtctta taaatttcgt tgagatctac gcgtccatgg gctagcgcgg ccgcgtcgac	1620
aggcctcttt gattacattt tataattaat tttaacaaag tgtcatcagc cctcaggaag	1680
gacttgctga cagtttgaat cgcataggta aggcggggat gaaatggcaa cgttatctga	1740
tgtagcaaag aaagcaaag tgctgaaaat gacgggtatc cggggtgatca atcatcctga	1800
gactgtgacg gatgaattga aaaagcttgt tcattccgca atgaaggagc tcaattatat	1860
accgaactat gcagcaagag cgctcgttca aaacagaaca caggctcgtc agctgctcat	1920
actggaagaa atggatacaa cagaacctta ttatatgaat ctgttaacgg gaatcagccg	1980
cgagctggac cgtcatcatt atgctttgca gcttgtcaca aggaaatctc tcaatatcgg	2040
ccagtgcgac ggcattattg cgacgggggt gagaaaagcc gattttgaag ggctcatcaa	2100

ggtttttgaa aagcgtgtcg ttgtattcgg gacgtcgatt cacaaaaata ggcacacgaa	2160
aaacaagtaa gggatgcagt ttatgcattc cttacttac ttattaaata atttatagct	2220
attgaaaaga gataagaatt gttcaaagct aatattgttt aaatcgtcaa ttcctgcatg	2280
ttttaaggaa ttgttaaatt gattttttgt aaatatattc ttgtattcct tgtaaccca	2340
tttcataacg aaataattat acttttgttt atctttgtgt gatattcttg attttttct	2400
acttaactcg ataagtgagc tattcacttt aggttttaga tgaaaatatt ctcttggaac	2460
catacttaat atagaaatat caacttctgc cattaaaagt aatgccaatg agcgttttgt	2520
atttaataat ctttttagcaa acccgtattc cacgattaaa taaatctcat tagctatact	2580
atcaaaaaaca attttgcgta ttatatccgt acttatgtta taaggatatat taccatatat	2640
tttataggat tgggtttttag gaaatttaaa ctgcaatata tccttgttta aaacttgga	2700
attatcgtga tcaacaagtt tattttctgt agttttgcat aatttatggt ctatttcaat	2760
ggcagttacg aaattacacc tctttactaa ttcaagggtg aaatggcctt ttcctgagcc	2820
gatttcaaag atattatcat gttcatttaa tcttatattt gtcattattt tatctatatt	2880
atgttttgaa gtaataaagt ttgtactgtg ttttatattt ttctcgttca ttataaccct	2940
ctttaatttg gttatatgaa ttttgcttat taacgattca ttataaccac ttattttttg	3000
tttggttgat aatgaactgt gctgattaca aaaatactaa aaatgcccatt attttttcct	3060
ccttataaaa ttagtataat tatagcacga gctctgataa atatgaacat gatgagtgat	3120
cgtaaattt atactgcaat cggatgcgat tattgaataa aagatatgag agatttatct	3180
aatttctttt ttcttgtaaa aaaagaaagt tcttaaaggt tttatagttt tggctgtaga	3240
gcacacgggt taacgactta attacgaagt aaataagtct agtgtgttag actttatgaa	3300
atctatatac gtttatatat atttattatc cggaggtgta gcatgtctca ttcaattttg	3360
agggttgcca gagttaaagg atcaagtaat acaaacggga tacaagaca taatcaaaga	3420
gagaataaaa actataataa taaagacata aatcatgagg aaacatataa aaattatgat	3480
ttgattaacg cacaaaatat aaagtataaa gataaaattg atgaaacgat tgatgagaat	3540
tattcaggga aacgtaaaat tcggtcagat gcaattcgac atgtggacgg actggttaca	3600
agtataaag atttctttga tgatttaagc ggagaagaaa tagaacgatt ttttaaagat	3660
agcttgagat ttctagaaaa tgaatacggg aaggaaaata tgctgtatgc gactgtccat	3720
ctggatgaaa gagtcccaca tatgcacttt ggttttgtcc cttaacaga ggacgggaga	3780
ttgtctgcaa aagaacagtt aggcaacaag aaagacttta ctcaattaca agatagattt	3840
aatgagtatg tgaatgagaa aggttatgaa cttgaaagag gcacgtccaa agaggttaca	3900
gaacgagaac ataaagcgat ggatcagtac aagaaagata ctgtatttca taaacaggaa	3960
ctgcaagaag ttaaggatga gttacagaag gcaataaagc agttacagag tggaatagag	4020
catatgaggt ctacgaaacc ctttgattat gaaaatgagc gtacaggttt gttctctgga	4080
cgtgaagaga ctggtagaaa gatattaact gctgatgaat ttgaacgcct gcaagaaaca	4140
atctcttctg cagaacggat tgttgatgat tacgaaaata ttaagagcac agactattac	4200

acagaaaatc	aagaattaaa	aaaacgtaga	gagagtttga	aagaagtagt	gaatacatgg	4260
aaagaggggt	atcacgaaaa	aagtaaagag	gttaataaat	taaagcgaga	gaatgatagt	4320
ttgaatgagc	agttgaatgt	atcagagaaa	tttcaagcta	gtacagtgac	tttatatcgt	4380
gctgcgaggg	cgaatttccc	tgggtttgag	aaagggttta	ataggcttaa	agagaaattc	4440
tttaatgatt	ccaaatttga	gcgtgtggga	cagtttatgg	atgttgatca	ggataatgtc	4500
cagaaggctg	atagaaagcg	tgagaaacag	cgtacagacg	atttagagat	gtagaggtag	4560
ttttatgccg	agaaaacttt	ttgcgtgtga	cagtccttaa	aatatactta	gagcgtaagc	4620
gaaagtagta	gcgacagcta	ttaactttcg	gtttcaaagc	tctaggattt	ttaatggacg	4680
cagcgcatca	cacgcaaaaa	ggaaattgga	ataaatgcga	aatttgagat	gttaattaaa	4740
gacctttttg	aggtcttttt	ttcttagatt	tttgggggta	tttaggggag	aaaacatagg	4800
gggggtactac	gacctcccc	ctagggtgtcc	attgtccatt	gtccaaacaa	ataaataaat	4860
attgggtttt	taatgttaaa	aggttggttt	ttatgttaaa	gtgaaaaaaa	cagatgttgg	4920
gaggtacagt	gatggttgta	gatagaaaag	aagagaaaaa	agttgctgtt	actttaagac	4980
ttacaacaga	agaaaatgag	atattaaata	gaatcaaaga	aaaatataat	attagcaaata	5040
cagatgcaac	cgggtattcta	ataaaaaaat	atgcaaagga	ggaatacggg	gcatttttaa	5100
caaaaaaaga	tagacagcac	tggcatgctg	cctatctatg	actaaatttt	gttaagtgtg	5160
ttagcaccgt	tattatatca	tgagcgaaaa	tgtaataaaa	gaaactgaaa	acaagaaaaa	5220
ttcaagagga	cgtaattgga	catttggttt	atatccagaa	tcagcaaaag	ccgagtgggt	5280
agagtattta	aaagagttac	acattcaatt	tgtagtgtct	ccattacatg	ataggggatac	5340
tgatacagaa	ggtaggatga	aaaaagagca	ttatcatatt	ctagtgtatg	atgaggggtaa	5400
taaatcttat	gaacagataa	aaataattac	agaagaattg	aatgcgacta	ttccgcagat	5460
tgaggaagt	gtgaaaggct	ttgtgagata	tatgcttcac	atggacgatac	ctaataaatt	5520
taaatatcaa	aaagaagata	tgatagttaa	tggcggtgta	gatgttgatg	aattattaaa	5580
gaaaacaaca	acagatagat	ataaattaat	taaagaaatg	attgagttta	ttgatgaaca	5640
aggaatcgta	gaatttaaga	gtttaatgga	ttatgcaatg	aagtttaaat	ttgatgattg	5700
gttcccgttt	ttatgtgata	actcggcgta	tgttattcaa	gaatatataa	aatcaaatcg	5760
gtataaatct	gaccgataga	ttttgaattt	aggtgtcaca	agacactctt	ttttcgcacc	5820
agcgaaaact	ggtttaagcc	gactgcgcaa	aagacataat	cgactctaga	ggatccccgg	5880
gtaccgagct	ctgcctttta	gtccagctga	tttcaacttt	tgcattctac	aaactgcata	5940
actcatatgt	aaatcgctcc	tttttaggtg	gcacaaatgt	gaggcatttt	cgctctttcc	6000
ggcaaccact	tccaagtaaa	gtataacaca	ctatacttta	tattcataaa	gtgtgtgtctc	6060
tgcgaggtcg	tcggcagtcg	cgacaaaaac	cataaaacct	ttaagacctt	tctttttttt	6120
acgagaaaaa	agaaacaaaa	aaacctgccc	tctgccacct	cagcaaaggg	gggttttgct	6180
ctcgtgctcg	tttaaaaatc	agcaaggggac	aggtagtatt	ttttgagaag	atcactcaaa	6240

	aaatctccac ctttaaacc ttgccaattt ttattttgtc cgttttgtct agcttaccga	6300
	aagccagact cagcaagaat aaaattttta ttgtctttcg gttttctagt gtaacggaca	6360
	aaaccactca aaataaaaaa gatacaagag aggtctctcg tatcttttat tcagcaatcg	6420
	cgcccgattg ctgaacagat taataatgag ctc	6453
5	<210> 36 <211> 62 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador <400> 36	
	tcattctgca gcagcggcgg ataacaaatt taacaaagaa cagcagaacg cgttttatga	60
	aa	62
15	<210> 37 <211> 52 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador	
25	<400> 37 aactaagcgg ccgctagcga ctacacttta ggagcttgcg cgtcattaag ct	52
30	<210> 38 <211> 1062 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> ORF de la proteína A fusionada a estreptavidina <400> 38	

ES 2 613 029 T3

```

atgaaacaac aaaaacggct ttacgcccga ttgctgacgc tgttatttgc gtcacatcttc      60
ttgctgcctc attctgcagc cgcggcagac cctccaagg actcgaaggc ccaggctctcg      120
gccgccgagg ccggcatcac cggcacctgg tacaaccagc tcggctcgac cttcatcgtg      180
accgcgggcg ccgacggcgc cctgaccgga acctacgagt cggccgctcg caacgccgag      240
agccgctacg tcctgaccgg tcgttacgac agcgcgcccg ccaccgacgg cagcggcacc      300
gccctcgggt ggacgggtggc ctggaagaat aactaccgca acgcccactc cgcgaccacg      360
tggagcggcc agtacgtcgg cggcgccgag gcgaggatca acaccagtg gctgctgacc      420
tccggcacca ccgaggccaa cgcctggaag tccacgctgg tcggccacga caccttcacc      480
aaggtgaagc cgtccgccgc ctccatcgac gcggcgaaga aggccggcgt caacaacggc      540
aaccgcctcg acgccgttca gcagtcgaca ttacttatat ctggtggcgt aacacctgct      600
gcaaatgctg cgcaacacga tgaagctcaa caaatgctt tttatcaagt cttaaataatg      660
cctaacttaa atgctgatca acgcaatggt tttatccaaa gccttaaaga tgatccaagc      720
caaagtgcta acgttttagg tgaagctcaa aaacttaatg actctcaagc tccaaaagct      780

gatgcgcaac aaaataactt caacaaagat caacaaagcg ctttctatga aatcttgaac      840
atgcctaact taaacgaagc gcaacgtaac ggcttcattc aaagtcttaa agacgaccca      900
agccaaagca ctaacgtttt aggtgaagct aaaaaattaa acgaatctca agcaccgaaa      960
gctgataaca atttcaacaa agaacaacaa aatgctttct atgaaatctt gaatatgcct      1020
aacttaaacy aagaacaacy caatggtttc atccaaagct ta      1062

```

<210> 39
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión proteína A estreptavidina
 <400> 39

Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Phe
1 5 10 15

Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ala Ala Asp Pro Ser
20 25 30

Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly Ile Thr Gly
35 40 45

Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala
50 55 60

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

Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp
85 90 95

Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr
100 105 110

Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly
115 120 125

Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr
130 135 140

Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp Thr Phe Thr
145 150 155 160

Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys Lys Ala Gly
165 170 175

Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln Ser Thr Leu Leu
180 185 190

Ile Ser Gly Gly Val Thr Pro Ala Ala Asn Ala Ala Gln His Asp Glu
195 200 205

Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn
210 215 220

Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
225 230 235 240

Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln
245 250 255

Ala Pro Lys Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln
260 265 270

Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln
275 280 285

Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr
290 295 300

Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys
305 310 315 320

Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
325 330 335

Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
340 345 350

Ser Leu

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación de una biomolécula diana, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto (i) una biomolécula diana, (ii) un polipéptido de afinidad doble y (iii) un soporte sólido que comprende un ligando de captura o un sitio de unión a polipéptido de afinidad doble, en el que la proporción entre las constantes de disociación en equilibrio del polipéptido de afinidad doble, $[K_{D,t}/K_{D,s}]$, es al menos 10^0 en condiciones convencionales; y (b) recuperar la biomolécula diana por elución, en el que el polipéptido de afinidad de diana y el polipéptido de afinidad doble se ponen en contacto en solución antes de que la mezcla se ponga en contacto con el soporte sólido que comprende un ligando de captura o sitio de unión a polipéptido de afinidad doble.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el soporte sólido se selecciona del grupo que comprende matrices de fase sólida y partículas.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido de afinidad doble tiene una constante de disociación en equilibrio, $K_{D,t}$ para la biomolécula diana en el intervalo de 10^{-2} a 10^{-13} M, de forma más particular de 10^{-4} a 10^{-13} M, preferentemente en el intervalo de 10^{-6} a 10^{-13} M y una constante de disociación en equilibrio, $K_{D,s}$ para el ligando de captura en el intervalo de 10^{-9} a 10^{-16} M, preferentemente en el intervalo de 10^{-11} a 10^{-16} M.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proporción entre las constantes de disociación en equilibrio del polipéptido de afinidad doble, $[K_{D,t}/K_{D,s}]$, es al menos 10^1 , de forma más particular al menos 10^2 , de forma más particular 10^3 e incluso de forma más particular al menos 10^4 .
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la elución de la diana se logra cambiando bien el pH, la fuerza iónica o el contenido de iones caotrópicos en solución, o cualquier combinación de los mismos.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido de afinidad doble es un polipéptido de fusión, seleccionado preferentemente del grupo que consiste en proteína A, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, fragmentos de proteína A, dominios de unión a IgG obtenidos de proteína A, lipocalinas, lectinas.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la parte de unión a ligando del polipéptido de afinidad doble se selecciona del grupo que consiste en avidina, estreptavidina, neutravidina, receptor de esteroides, anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, lipocalinas, lectinas, amiloglucosidasa, dominios de unión a celulosa.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos de llama y camello.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el polipéptido de fusión se fabrica mediante la fusión de al menos un dominio de unión a IgG de la proteína A o dominio de unión a IgG obtenido de la proteína A y al menos un dominio de unión a biotina de la avidina, estreptavidina o neutravidina.
10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ligando se selecciona del grupo que consiste en biotina, acarbosa, esteroides, hapteno, péptidos de epítipo, colorantes e inhibidores enzimáticos.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el ligando de captura unido al soporte sólido es biotina y la biomolécula diana es IgG.
12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el soporte sólido es una matriz de fase sólida, seleccionada preferentemente del grupo que consiste en agar-agar, agarosas, celulosas, éteres de celulosa, carboximetilcelulosa, poliamidas, alcoholes polivinílicos, sílices y vidrios de poro controlado.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el polipéptido de fusión se produce como un polipéptido recombinante en una célula hospedadora recombinante.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el polipéptido de fusión y la biomolécula diana se expresan en el mismo tipo de célula hospedadora.
15. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-14, en el que la célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en células bacterianas, células fúngicas, células de mamífero, células vegetales y células de insecto.
16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido de afinidad doble se fusiona de forma química.
17. Un procedimiento de purificación de una biomolécula diana, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto (i) un polipéptido diana, (ii) un polipéptido de afinidad doble y (iii) un soporte sólido que comprende un ligando de

- 5 captura, en el que el polipéptido de afinidad doble tiene una constante de disociación en equilibrio, $K_{D,t}$ para la biomolécula diana en el intervalo de 10^{-2} a 10^{-13} M, preferentemente de 10^{-4} a 10^{-13} M, más preferentemente de 10^{-6} a 10^{-13} M en condiciones convencionales, y en el que la unión del polipéptido de afinidad doble al ligando de captura sobre el soporte sólido se proporciona mediante escisión de una bencilguanina para-sustituida, que da como resultado un enlace tioéter; y (b) recuperar la biomolécula diana por elución, en donde el polipéptido diana y el polipéptido de afinidad doble se ponen en contacto en solución antes de que la mezcla se ponga en contacto con el soporte sólido que comprende un ligando de captura.