

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 253**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

D01D 5/04 (2006.01)

D01F 4/02 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2012 PCT/JP2012/077920**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13065650**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2012 E 12844908 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2774934**

54 Título: **Solución de polipéptido, método de producción de fibra de polipéptido artificial que usa la misma, y método de purificación de polipéptido**

30 Prioridad:

02.11.2011 JP 2011241486

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

06.02.2018

73 Titular/es:

**SPIBER INC. (100.0%)
234-1, Aza Mizukami, Kakuganji, Tsuruoka-shi
Yamagata 997-0052, JP**

72 Inventor/es:

**SUGAHARA JUNICHI;
SEKIYAMA, KAORI;
SATO, RYOTA;
ISHIKAWA, MIZUKI;
MURATA, SHINYA;
SEKIYAMA, KAZUHIDE y
OTOMO, KAZUKO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 653 253 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

Solución de polipéptido, método de producción de fibra de polipéptido artificial que usa la misma, y método de purificación de polipéptido

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una solución de polipéptido en la que un polipéptido se disuelve en un disolvente en particular, y un método para producir una fibra de polipéptido artificial y un método para purificar un polipéptido usando la misma.

10

Antecedentes de la técnica

Las fibras de seda de araña son fibras que presentan resistencia y capacidad de estiramiento, y se sabe que tienen una dureza más elevada que los aceros de alta tracción, fibras de Nylon 6 (marca comercial), y similares. Además, presentan una ventaja porque no se usa aceite, material de partida y su lugar se puede usar biomasa. También se han propuesto algunas fibras artificiales de seda de araña. Por ejemplo, Documento de Patente 1 describe una fibra obtenida usando, como solución de hilado, una solución en la que una proteína sintética obtenida a partir de proteínas de seda de araña natural se disuelve en hexafluoroisopropanol (HFIP), y la solución se somete a hilado en estado húmedo.

15
20

Documento de la Técnica Anterior

Documento de Patente

25

Documento de Patente 1: JP 2004-503204 A

Divulgación de la invención

30 Problema a resolver con la invención

Sin embargo, los disolventes convencionales tales como hexafluoroisopropanol (HFIP) que se usa para polipéptidos artificiales obtenidos a partir de proteínas de seda de araña natural son caros, y presentan problemas de seguridad.

35 Para resolver los problemas convencionales descritos anteriormente, la presente invención proporciona una solución de polipéptido cuyo asunto presenta una solubilidad elevada y el propio disolvente tiene un coste reducido, y que tiene un punto de ebullición mayor que el del agua para permitir la disolución a altas temperaturas y presenta una seguridad elevada: y un método para producir una fibra de polipéptido artificial y un método para purificar un polipéptido usando la misma.

40

Medios para resolver el problema

Una solución de polipéptido de la presente invención es una solución de polipéptido en la que un polipéptido obtenido a partir de proteínas de seda de araña natural se disuelve en un disolvente, en la que el polipéptido es una proteína de seda de araña natural o una proteína de seda de araña recombinante y el disolvente contiene al menos uno seleccionado entre los siguientes (i)-(iii):

45

- (i) Dimetil sulfóxido;
- (ii) Dimetil sulfóxido con una sal inorgánica; y
- (iii) N,N-dimetilformamida con una sal inorgánica; y

50

en la que, cuando la solución de polipéptido es de un 100 % en masa, el porcentaje del polipéptido está en un intervalo de un 3 a un 45 % en masa.

55 Un método para producir una fibra de polipéptido artificial de la presente invención es un método para producir una fibra de polipéptido artificial que usa la solución de polipéptido descrita anteriormente, que incluye: usar la solución de polipéptido como una solución de fluido de hilado; y extruir la solución de fluido de hilado de una hilera en un líquido de coagulación en un baño de desolvatación para eliminar un disolvente de la solución de fluido de hilado y formar una fibra para preparar un hilo no estirado, obteniendo de ese modo una fibra de polipéptido artificial.

60

Un método para purificar un polipéptido de la presente invención es un método para purificar un polipéptido que usa la solución de polipéptido descrita anteriormente, que incluye: someter la solución de polipéptido a tratamiento térmico y a partir de ese momento eliminar una sustancia no disuelta en la misma.

Efecto de la invención

La solución de polipéptido de la presente invención es una solución en la que un polipéptido (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado soluto) obtenido a partir de proteínas de seda de araña natural se disuelve en un disolvente. Mediante la adición de al menos una sustancia seleccionada entre (i)-(iii) mencionados anteriormente al disolvente, el soluto puede tener una solubilidad elevada, la solución de polipéptido puede tener un punto de ebullición elevado, que permite la disolución a temperaturas elevadas, y una seguridad elevada, y el coste del propio disolvente se puede reducir. Si el soluto tiene una solubilidad elevada y es soluble a concentración elevada, la productividad de fibras y películas puede aumentar usando la solución de polipéptido como una solución de fluido de hilado. Si es posible la disolución a temperaturas elevadas, la solución de fluido de hilado se puede ajustar de forma eficaz. Además, si el punto de ebullición es más elevado que el del agua, también se puede usar como un disolvente de polimerización para producir una reacción de condensación y deshidratación. Si la seguridad es elevada, la capacidad de trabajo de producción puede aumentar, y además la aplicación puede ser más amplia. Además, la solución de polipéptido presenta capacidad de hilado, y por lo tanto es útil para hilado en estado húmedo, película fundida, etc. Además, los polipéptidos se pueden purificar fácilmente usando la solución de polipéptido.

Breve descripción de las figuras

[FIG. 1] La FIG. 1 ilustra un dispositivo de producción en un ejemplo de la presente invención.
 [FIG. 2] Las FIGS. 2A y 2B ilustran dispositivos de producción en otro ejemplo de la presente invención. La FIG. 2A muestra un dispositivo de hilado y un dispositivo de estiramiento en una primera etapa, y la FIG. 2B muestra un dispositivo de estiramiento en una segunda etapa.
 [FIG. 3] La FIG. 3 ilustra un dispositivo de producción en otro ejemplo de la presente invención.
 [FIG. 4] Las FIGS. 4A y 4B ilustran dispositivos de producción en otro ejemplo de la presente invención. La FIG. 4A muestra un dispositivo de hilado, y la FIG. 4B muestra un dispositivo de estiramiento.
 [FIG. 5] La FIG. 5 es una curva de tensión-desplazamiento (deformación) de una sola fibra de las fibras obtenidas en el Ejemplo 2 de la presente invención.
 [FIG. 6] La FIG. 6 es una curva de tensión-desplazamiento (deformación) de una sola fibra de las fibras obtenidas en el Ejemplo 3 de la presente invención.
 [FIG. 7] La FIG. 7 es una curva de tensión-desplazamiento (deformación) de una sola fibra de las fibras obtenidas en el Ejemplo 4 de la presente invención.
 [FIG. 8] La FIG. 8 es una curva de tensión-desplazamiento (deformación) de una sola fibra de las fibras obtenidas en el Ejemplo 5 de la presente invención.
 [FIG. 9] La FIG. 9 es una curva de tensión-desplazamiento (deformación) de un hilo estirado obtenido en el Ejemplo 6 de la presente invención.
 [FIG. 10] La FIG. 10 es una curva de tensión-desplazamiento (deformación) de una sola fibra de las fibras obtenidas en el Ejemplo 7 de la presente invención.
 [FIG. 11] La FIG. 11 es una curva de tensión-desplazamiento (deformación) de una sola fibra de fibras en un hilo estirado primario obtenido en el Ejemplo 8 de la presente invención.
 [FIG. 12] La FIG. 12 es una curva de tensión-desplazamiento (deformación) de una sola fibra de fibras en un hilo estirado secundario obtenido en el Ejemplo 8 de la presente invención.
 [FIG. 13] La FIG. 13 es una fotografía que muestra un resultado de electroforesis de SDS-PAGE de una proteína obtenida en el Ejemplo 9 de la presente invención.
 [FIG. 14] La FIG. 14 es una fotografía que muestra un resultado de electroforesis de SDS-PAGE de una proteína obtenida en el Ejemplo 10 de la presente invención.

Descripción de la invención

50 1. Disolvente

(1) Selección del Disolvente Polar

Los inventores de la presente invención examinaron qué tipo de disolventes podrían ser adecuados para disolver polipéptidos obtenidos a partir de proteínas de seda de araña natural para obtener una solución de polipéptido, y principalmente disolventes polares seleccionados para realizar experimentos de solubilidad. Como resultado, se encontró que los disolventes que contenían cualquiera de las sustancias descritas en (i)-(iii) mencionados anteriormente presentaban una solubilidad elevada de forma selectiva y permitían la disolución a temperaturas elevadas. Cuando la solución de polipéptido es de un 100 % en masa, la concentración del soluto (solubilidad) es un 3 % en masa (% en p/v) o superior, más preferentemente un 15 % en masa o superior, y además preferentemente un 40 % en masa o superior. Además, la concentración del soluto es un 45 % en masa o inferior. El dimetil sulfoxido (DMSO) tiene un punto de fusión de 18,4 °C y un punto de ebullición de 189 °C. La N,N-dimetilformamida (DMF) tiene un punto de fusión de -61 °C y un punto de ebullición de 153 °C. DMSO y DMF tienen puntos de ebullición mucho más elevados que el del hexafluoroisopropanol (HFIP) y el de la hexafluoroacetona (HFAc) que tienen puntos de ebullición de 59 °C y -26,5 °C, respectivamente, que se han usado en métodos convencionales. Además, en vista del hecho de que DMSO y DMF también se han usado en campos industriales en general para polimerización de

fibras acrílicas y soluciones de hilado de fibras acrílicas, etc., y como disolventes para polimerización de poliimida, son sustancias de bajo coste con una seguridad demostrada.

(2) Promotor de Disolución

La adición de una sal inorgánica a DMSO o DMF es preferente porque aumenta adicionalmente la solubilidad del soluto. La sal inorgánica es preferentemente al menos una seleccionada entre haluros de metal alcalino (por ejemplo, LiCl, LiBr, etc.), haluros de metal alcalinotérreo (por ejemplo, CaCl₂, etc.), nitrato de metal alcalinotérreo (por ejemplo, Ca(NO₃)₂, etc.), y tiocianato (por ejemplo, NaSCN, etc.). Cuando el disolvente es de un 100 % en masa, el porcentaje de la sal inorgánica varía preferentemente de un 0,1 a un 20 % en masa.

(3) Pureza del Disolvente, Aditivo

El disolvente puede contener alcohol y/o agua además de las sustancias que se han descrito anteriormente en (i)-(iii).

Cuando el disolvente es de un 100 % en masa, el porcentaje de las sustancias descritas anteriormente en (i)-(iii) es un 22 % en masa o superior y un 100 % en masa o inferior. El porcentaje restante puede contener alcohol. En la descripción mencionada anteriormente, el "alcohol" es preferentemente un alcohol inferior con un índice de carbonos de 1 a 6, y más preferentemente al menos un tipo seleccionado entre el grupo que consiste en metanol, etanol, y 2-propanol. En el caso de que contenga agua, el porcentaje de las sustancias descritas anteriormente en (i)-(iii) es un 10 % en masa o superior y un 100 % en masa o inferior cuando el disolvente es de un 100 % en masa. El porcentaje restante puede ser agua. El agua y el alcohol se pueden mezclar en conjunto.

2. Polipéptido

En la presente invención, como polipéptido se usa, por ejemplo, un polipéptido obtenido a partir de proteínas de seda de araña natural. El polipéptido se obtiene a partir de proteínas de seda de araña natural, y es una proteína de seda de araña natural o una proteína de seda de araña recombinante tal como un análogo variante, derivado o similar de las proteínas de seda de araña natural. En términos de tenacidad excelente, el polipéptido se obtiene preferentemente a partir de proteínas de seda dragline principal producida en las glándulas ampulares principales de arañas. Los ejemplos de las proteínas de seda dragline principal incluyen las espidroínas MaSp1 y MaSp2 ampulares principales de *Nephila clavipes*, y ADF3 y ADF4 de *Araneus diadematus*, etc. Los ejemplos del polipéptido obtenido a partir de proteínas de seda dragline principal incluyen variantes, análogos, derivados o similares de las proteínas de seda dragline principal. Además, el polipéptido se puede obtener a partir de proteínas de seda flageliforme producida en glándulas flageliformes de arañas. Los ejemplos de las proteínas de seda flageliforme incluyen proteínas de seda flageliforme obtenidas a partir de *Nephila clavipes*, etc.

Los ejemplos del polipéptido obtenido a partir de proteínas de seda dragline principal incluyen un polipéptido que contiene dos o más unidades de una secuencia de aminoácidos representada con la fórmula 1: REP1-REP2 (1), preferentemente un polipéptido que contiene cinco o más unidades de la misma, y más preferentemente un polipéptido que contiene diez o más unidades de la misma. Como alternativa, el polipéptido obtenido a partir de proteínas de seda dragline principal puede ser un polipéptido que contenga unidades de la secuencia de aminoácidos representada con la fórmula 1: REP1-REP2 (1) y que tiene, en un extremo C-terminal, una la secuencia de aminoácidos representada con cualquiera de las SEQ ID NOS: 1 a 3 o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de un 90 % o superior con la secuencia de aminoácidos representada con cualquiera de las SEQ ID NOS: 1 a 3. En el polipéptido obtenido a partir de proteínas de seda dragline principal, las unidades de la secuencia de aminoácidos representada con la fórmula 1: REP1-REP2 (1) pueden ser las mismas o pueden ser diferentes entre sí. En el caso de producir una proteína recombinante usando un microbio tal como *Escherichia coli* como un hospedador, el peso molecular del polipéptido obtenido a partir de proteínas de seda dragline principal es preferentemente 500 kDa o inferior, más preferentemente 300 kDa o inferior, y además preferentemente 200 kDa o inferior, en términos de productividad.

En la fórmula (1), el REP1 indica polialanina. En el REP1, el número de restos de alanina colocados en sucesión es preferentemente 2 o más, más preferentemente 3 o más, además preferentemente 4 o más, y de forma particularmente preferente 5 o más. Además, en el REP1, el número de restos de alanina colocados en sucesión es preferentemente 20 o menos, más preferentemente 16 o menos, además preferentemente 12 o menos, y de forma particularmente preferente 10 o menos. En la fórmula (1), el REP2 es una secuencia de aminoácidos formada por 10 a 200 restos de aminoácidos. El número total de restos de glicina, serina, glutamina y alanina contenidos en la secuencia de aminoácidos es un 40 % o más, preferentemente un 60 % o más, y más preferentemente un 70 % o más con respecto al número total de restos de aminoácidos contenidos en la misma.

En la seda dragline principal, el REP1 corresponde a una región cristalina en una fibra en la que se forma una lámina β, y el REP2 corresponde a una región amorfa en una ciudad en la que la mayoría de las partes carecen de configuraciones regulares y que tiene más flexibilidad. Además, el [REP1-REP2] corresponde a una región de

repetición (secuencia repetitiva) formada por la región cristalina y la región amorfa, que es una secuencia característica de proteínas de seda dragline.

Una secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 1 es idéntica a una secuencia de aminoácidos que está formada por 50 restos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de ADF3 en el extremo C-terminal (N.º de Registro en NCBI: AAC47010, GI: 1263287). Una secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 2 es idéntica a una secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 1 de la que se han retirado 20 restos del extremo C-terminal. Una secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 3 es idéntica a una secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 1 de la que se han retirado 29 restos del extremo C-terminal.

Un ejemplo del polipéptido de contiene las unidades de la secuencia de aminoácidos representada con la fórmula 1: REP1-REP2 (1) y que tiene, en el extremo C-terminal, una secuencia de aminoácidos representada con cualquiera de las SEQ ID NOS: 1 a 3 o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de un 90 % o más con la secuencia de aminoácidos representada con cualquiera de las SEQ ID NOS: 1 a 3 es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 8. El polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 8 se obtiene mediante la siguiente mutación: en una secuencia de aminoácidos de ADF3 (N.º de Registro en NCBI: AAC47010, GI: 1263287) a cuyo extremo N-terminal se le ha añadido una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) formada por un codón de inicio, 10 etiquetas de His y un sitio de reconocimiento de Proteasa HRV3C (Proteasa 3C de rinovirus Humano), las regiones repetitivas 1ª a 13ª aproximadamente se han duplicado y la traducción termina en el 1154º resto del aminoácido. En el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 8, la secuencia en el extremo C-terminal es idéntica a la secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 3.

Además, el polipéptido que contiene las unidades de la secuencia de aminoácidos representada con la fórmula 1: REP1-REP2 (1) y que tiene, en el extremo C-terminal, una secuencia de aminoácidos representada con cualquiera de las SEQ ID NOS: 1 a 3 o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de un 90 % o más con la secuencia de aminoácidos representada con cualquiera de las SEQ ID NOS: 1 a 3 puede ser una proteína que tenga una secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 8 en la que uno o una pluralidad de aminoácidos se han sustituido, sometido a delección, insertado y/o añadido y que tiene una región repetitiva formada por una región cristalina y una región amorfa. En la presente invención, "uno o una pluralidad de" se refiere a 1 a 40, 1 a 35, 1 a 30, 1 a 25, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, o 1 o unos pocos, por ejemplo. Además, en la presente invención, "uno o unos pocos" se refiere a 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2, o 1.

Además, un ejemplo del polipéptido que contiene dos o más unidades de la secuencia de aminoácidos representada con la fórmula 1: REP1-REP2 (1) es una proteína recombinante obtenida a partir de ADF4 que tiene una secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 15. La secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 15 es una secuencia de aminoácidos obtenida por adición de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) formada por un codón de inicio, 10 etiquetas de His y un sitio de reconocimiento de Proteasa HRV3C (Proteasa 3C de rinovirus Humano), al extremo N-terminal de una secuencia de aminoácidos parcial de ADF4 obtenida a partir de la base de datos de NCBI (N.º de Registro en NCBI: AAC47011, GI: 1263289). Además, el polipéptido que contiene dos o más unidades de la secuencia de aminoácidos representada con la fórmula 1: REP1-REP2 (1) puede ser un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 15 en la que uno o una pluralidad de aminoácidos se han sustituido, sometido a delección, insertado y/o añadido y que tiene una región repetitiva formada por una región cristalina y una región amorfa. Además, un ejemplo del polipéptido que contiene dos o más unidades de la secuencia de aminoácidos representada con la fórmula 1: REP1-REP2 (1) es una proteína recombinante obtenida a partir de MaSp2 que tiene una secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 17. La secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 17 es una secuencia de aminoácidos obtenida por adición de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) formada por un codón de inicio, 10 etiquetas de His y un sitio de reconocimiento de Proteasa HRV3C (Proteasa 3C de rinovirus Humano), al extremo N-terminal de una secuencia parcial de MaSp2 obtenida a partir de la base de datos de la página web NCBI (N.º de Registro en NCBI: AAT75313, GI: 50363147). Además, el polipéptido que contiene dos o más unidades de la secuencia de aminoácidos representada con la fórmula 1: REP1-REP2 (1) puede ser un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 17 en la que uno o una pluralidad de aminoácidos se han sustituido, sometido a delección, insertado y/o añadido y que tiene una región repetitiva formada por una región cristalina y una región amorfa.

Los ejemplos del polipéptido obtenido a partir de proteínas de seda flageliforme incluyen un polipéptido que contiene 10 o más unidades de una secuencia de aminoácidos representada con la fórmula 2: REP3 (2), preferentemente un polipéptido que contiene 20 o más unidades de los mismos, y más preferentemente un polipéptido que contiene 30 o más unidades de los mismos. En el caso de producir una proteína recombinante usando un microbio tal como *Escherichia coli* como un hospedador, el peso molecular del polipéptido obtenido a partir de proteínas de seda flageliforme es preferentemente 500 kDa o inferior, más preferentemente 300 kDa o inferior, y además preferentemente 200 kDa o inferior, en términos de productividad.

En la fórmula (2), el REP 3 indica una secuencia de aminoácidos formada por Gly-Pro-Gly-Gly-X, en la que X indica un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Ala, Ser, Tyr y Val.

Una característica principal de la seda de araña es que la seda flageliforme no tiene una región cristalina, pero tiene una región repetitiva formada por una región amorfa. Dado que la seda dragline principal y similares tienen una región repetitiva formada por una región cristalina y una región amorfa, se espera que ambas tengan tensión y capacidad de estiramiento elevados. Al mismo tiempo, al igual que la seda flageliforme, aunque la tensión es inferior a la de la seda dragline principal, la capacidad de estiramiento es elevada. Se considera que la razón para que esto se produzca es que la mayor parte de la seda flageliforme está formada por regiones amorfas.

Un ejemplo del polipéptido que contiene 10 o más las unidades de la secuencia de aminoácidos representada con la fórmula 2: REP3 (2) es una proteína recombinante obtenida a partir de proteínas de seda flageliforme que tiene una secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 19. La secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 19 es una secuencia de aminoácidos obtenida por combinación de una secuencia parcial de proteína de seda flageliforme de *Nephila clavipes* obtenida a partir de la base de datos de NCBI (N.º de Registro en NCBI: AAF36090, GI: 7106224), de forma específica, una secuencia de aminoácidos de la misma desde el 1220º resto al 1659º resto desde el extremo N-terminal que corresponde a secciones y motivos repetitivos (denominados secuencia PR1), con una secuencia parcial de proteína de seda flageliforme de *Nephila clavipes* obtenida a partir de la base de datos de NCBI (N.º de Registro en NCBI: AAC38847, GI: 2833649), de forma específica, una secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de la misma desde el 816º resto al 907º resto del extremo C-terminal, y a partir de ese momento añadiendo la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) formada por un codón de inicio, 10 etiquetas de His y un sitio de reconocimiento de Proteasa HRV3C, al extremo N-terminal de la secuencia combinada. Además, el polipéptido que contiene 10 o más las unidades de la secuencia de aminoácidos representada con la fórmula 2: REP3 (2) puede ser un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos representada con la SEQ ID NO: 19 en la que uno o una pluralidad de aminoácidos se han sustituido, sometido a delección, insertado y/o añadido y que tenga una región repetitiva formada por una región amorfa.

El polipéptido se puede producir usando un hospedador que se ha transformado mediante un vector de expresión que contiene un gen que codifica un polipéptido. Un método para producir un gen no está limitado en particular, y se puede producir mediante amplificación de un gen que codifica una proteína de seda de araña natural de una célula obtenida a partir de arañas mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), etc., y clonándolo, o se puede sintetizar de forma química. Además, un método para sintetizar un gen por vía química no está limitado en particular, y se puede sintetizar como sigue a continuación, por ejemplo: basándose en información de secuencias de aminoácidos de proteínas de seda de araña natural obtenidas a partir de la base de datos de la página web de NCBI, etc., oligonucleótidos que se han sintetizado de forma automática con AKTA oligopilot plus 10/100 (GE Healthcare Japan Corporation) se unen mediante PCR, etc. En este momento, para facilitar la purificación y observación de la proteína, es posible sintetizar un gen que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente en el extremo N-terminal del cual se ha añadido una secuencia de aminoácidos formada por un codón de inicio y 10 etiquetas de His.

Los ejemplos del vector de expresión incluyen un plásmido, un fago, un virus, y similares que pueden expresar proteína basándose en una secuencia de ADN. El vector de expresión de tipo plásmido no está limitado en particular siempre y cuando permita la expresión de un gen diana en una célula hospedadora y que se pueda amplificar por sí mismo. Por ejemplo, en el caso del uso de la cepa Rosetta de *Escherichia coli* (DE3) como hospedador, se puede usar un vector plásmido pET22b(+), un vector plásmido pCold, y similares. Entre estos, en términos de productividad de proteína, es preferente usar el vector plásmido pET22b(+). Los ejemplos del hospedador incluyen células animales, células vegetales, microbios, etc.

El polipéptido usado en la presente invención es preferentemente un polipéptido obtenido a partir de ADF3, que es una de dos proteínas de seda dragline principales de *Araneus diadematus*. Este polipéptido tiene las ventajas de tener básicamente una resistencia-elongación y dureza elevadas y que se puede sintetizar fácilmente.

3. Solución de Polipéptido

(1) Preparación de Solución de Polipéptido

La solución de polipéptido se prepara por adición de un disolvente al polipéptido descrito anteriormente. El disolvente contiene cualquiera de las sustancias descritas anteriormente en (i)-(iii). Como alternativa, el disolvente contiene, además de cualquiera de las sustancias descritas anteriormente en (i)-(iii), agua y/o alcohol. La solución de polipéptido se puede usar como una solución de fluido de hilado. La solución de fluido de hilado es útil para hilado en estado húmedo, una solución de película fundida, etc. La solución de fluido de hilado se produce ajustando la viscosidad de la solución de polipéptido para su hilado. Por ejemplo, la viscosidad de la solución de polipéptido se ajusta de 10^{-1} a 10 Pa.s (Pascal por segundo) para obtener la solución de fluido de hilado. La viscosidad de la solución de polipéptido se puede ajustar, por ejemplo, ajustando la concentración del polipéptido en la solución. La viscosidad de la solución de polipéptido se mide, por ejemplo, usando el "Viscosímetro EMS" (nombre de producto)

fabricado por Kyoto Electronics Manufacturing Co., Ltd. Obsérvese que la solución de polipéptido de la presente invención puede contener componentes inevitables, tales como impurezas contenidas en el polipéptido.

(2) Polimerización de Polipéptido usando Solución de Polipéptido

El punto de ebullición de la solución de fluido de hilado de la presente invención es más elevado que el del agua, y por lo tanto es adecuado para producir una reacción de condensación y deshidratación en la misma. Por ejemplo, antes de usar la solución para hilado en estado húmedo, película fundida, y similares, la polimerización de los polipéptidos disueltos en la solución de polipéptido a través de condensación y deshidratación aumenta la longitud de los polipéptidos, aumentando de ese modo la resistencia y la dureza de las fibras y películas que se van a obtener. La adición del disolvente que contiene cualquiera de las sustancias descritas anteriormente en (i)-(iii) para el polipéptido descrita anteriormente y el calentamiento de la solución a 100 °C o una temperatura más elevada produce la condensación y deshidratación entre polipéptidos, dando como resultado la polimerización de los polipéptidos. En este momento, mediante la inducción de la reacción en las condiciones de reflujo, deformación reducida, condiciones de vacío, etc., la eficacia de la polimerización puede aumentar. Además, la eficacia de la polimerización puede aumentar radicalmente usando un catalizador de condensación y deshidratación conocido en combinación. Cuando los polipéptido se polimerizan a través de la reacción de condensación y deshidratación usando la solución de polipéptido, de forma deseable una cadena y padre polipéptido se amplía mediante condensación y deshidratación entre un grupo NH₂ de un terminal molecular polipeptídico y un grupo COOH de otro terminal molecular polipeptídico. Por lo tanto, las cadenas laterales de un polipéptido a usar contienen preferentemente unos pocos grupos funcionales (grupo NH₂, grupo COOH, grupo OH, grupo SH) si fuera posible, y lo más preferentemente no contienen grupo funcional. El número de estos grupos funcionales se puede ajustar mediante el ajuste del porcentaje de aminoácidos a usar. La solución de polipéptido que se ha sometido a la reacción de polimerización descrita anteriormente se puede usar directamente, o se puede diluir de forma apropiada mediante la adición de las sustancias descritas anteriormente en (i)-(iii), alcohol etílico, alcohol metílico, agua, o similares, para hilado en estado húmedo, producción de película fundida, etc.

4. Hilado - Estiramiento en Estado Húmedo

(1) Hilado en Estado Húmedo

El hilado en estado húmedo se adopta para hilado. Con este método, el disolvente que disuelve un polímero se elimina de una solución de fluido de hilado (también se denomina desolvatación o coagulación), mediante lo cual se forman fibras y se obtiene un hilo no estirado. Un líquido de coagulación para su uso para hilado en estado húmedo no está limitado en particular siempre y cuando permita la desolvatación. Preferentemente, el líquido de coagulación para eliminar un disolvente y formar fibras es un alcohol inferior con un índice de carbonos de 1 a 5, tal como metanol, etanol y 2-propanol, o acetona. De forma adecuada se puede añadir agua. La temperatura del líquido de coagulación es preferentemente 5-30 °C. Este intervalo estabiliza el hilado. Mediante la extrusión de la solución de hilado de una hilera descrita anteriormente en el líquido de coagulación en un baño de desolvatación, se obtiene un hilo no estirado. En el caso de usar una bomba de jeringa con una boquilla de 0,1-0,6 mm de diámetro, la velocidad de extrusiones preferentemente 0,2-6,0 ml/h para un orificio. Una velocidad de extrusión más preferente es 1,4-4,0 ml/h para un orificio. Este intervalo estabiliza el hilado. Es preferente que la longitud del baño de desolvatación (baño de líquido de coagulación) sea de 200-500 mm, la velocidad de entrada del hilo no estirado es 1-14 m/min, y el tiempo de permanencia es 0,01-0,15 min. Una velocidad de entrada del hilo no estirado más preferente es 1-3 m/min. Estos intervalos permiten una desolvatación eficaz. El estiramiento (estiramiento previo) se puede realizar en el líquido de coagulación. Sin embargo, teniendo en cuenta la evaporación de un alcohol inferior, es preferente mantener el líquido de coagulación a baja temperatura para que los hilos entren en un estado no estirado.

(2) Estiramiento

El estiramiento se puede realizar en una etapa o en dos o más etapas (estiramiento en múltiples etapas). Dado que es menos probable que las moléculas de los polipéptidos obtenidos a partir de proteínas de seda de araña natural se puedan orientar, el estiramiento en múltiples etapas se realiza con el fin de orientar las moléculas en etapas y aumentar la proporción de estiramiento total. En consecuencia, se pueden obtener fibras con una dureza elevada.

Las FIGS. 1 y 2 son ejemplos del estiramiento en múltiples etapas. La FIG. 1 muestra un proceso continuo de hilado y estiramiento. Un dispositivo de hilado-estiramiento 10 incluye una extrusora 1, un dispositivo de producción de hilo no estirado 2, un dispositivo de estiramiento con calor húmedo 3, y un dispositivo de estiramiento con calor seco 4. Una solución de hilado 6 se almacena en un tanque de almacenamiento 7 y se extruye de una hilera 9 con una bomba de engranaje 8. En una escala de laboratorio, una solución de hilado se puede llenar en un cilindro y se extruye desde una boquilla usando una bomba de jeringa. La solución de hilado extruída se suministra directamente o a través de un espacio libre 19 en un líquido de coagulación 11 en un baño de líquido de coagulación 20, para eliminar un disolvente. A partir de ese momento, un hilo no estirado obtenido se suministra en agua caliente 12 en un baño de estiramiento 21 y se somete a una primera etapa de estiramiento. La proporción de estiramiento depende de la proporción de velocidad entre un rodillo de prensa de suministro 13 y un rodillo de prensa de entrada 14. A continuación, el hilo se suministra a un dispositivo de estiramiento con calor seco 17 y se somete a la segunda etapa

de estiramiento dentro de una guía 22, de modo que se prepara un rollo de hilo 5. La proporción de estiramiento depende de la proporción de velocidad entre un rodillo de prensa de suministro 15 y un rodillo de prensa de entrada 16. 18a a 18f son guías de hilo.

5 Las FIGS. 2A y 2B son un ejemplo del estiramiento en dos etapas. La FIG. 2A muestra un dispositivo de hilado 30 y un dispositivo de estiramiento en una primera etapa 40, y la FIG. 2B muestra un dispositivo de estiramiento en una segunda etapa 50. En cada dispositivo, único se puede enrollar, o se puede almacenar en un contenedor sin ser enrollado. En el dispositivo de hilado 30, una solución de hilado 32 está contenida en una microjeringa 31 y se mueve en una dirección indicada por una flecha P usando una bomba de jeringa, a través de la cual la solución de hilado 32 se extruye desde una boquilla 33 y se suministra en un líquido de coagulación 35 en un baño de líquido de coagulación 34. Por lo tanto, se prepara un hilo no estirado 36. Posteriormente, en el dispositivo de estiramiento en una primera etapa 40, el hilo no estirado 36 se suministra en agua caliente 38 en un baño de estiramiento 37 y se somete a una primera etapa de estiramiento, a través de la cual se prepara un rollo de hilo 39 del hilo estirado de la primera etapa. La proporción de estiramiento depende de la proporción de velocidad entre un rodillo de prensa de suministro 41 y un rodillo de prensa de entrada 42. A continuación, el hilo estirado en la primera etapa se desenrolla del rollo de hilo 39, se suministra a un dispositivo de estiramiento con calor seco 43, y se somete a la segunda etapa de estiramiento dentro de una guía 47. La proporción de estiramiento depende de la proporción de velocidad entre un rodillo de prensa de suministro 45 y un rodillo de prensa de entrada 46. A continuación, el hilo estirado se enrolla en forma de un rollo de hilo 44.

20 Las FIGS. 3 y 4 son ejemplos del estiramiento en una etapa. La FIG. 3 muestra un proceso continuo de hilado y estiramiento. Un dispositivo de hilado-estiramiento 60 incluye una extrusora 61, un dispositivo de producción de hilo no estirado 62, y un dispositivo de estiramiento con calor seco 63. Una solución de hilado 66 se almacena en un tanque de almacenamiento 67 y se extruye de una hilera 69 con una bomba de engranaje 68. En una escala de laboratorio, una solución de hilado se puede llenar en un cilindro y se extruye desde una boquilla usando una bomba de jeringa. La solución de hilado extruída se suministra directamente o a través de un espacio libre 73 en un líquido de coagulación 71 en un baño de líquido de coagulación 72, para eliminar un disolvente. A continuación, un hilo no estirado obtenido se suministra en un dispositivo de estiramiento con calor seco 77 y se estira dentro de una guía 78, de modo que se prepara un rollo de hilo 64. La proporción de estiramiento depende de la proporción de velocidad entre un rodillo de prensa de suministro 75 y un rodillo de prensa de entrada 76. 74a a 74f son guías de hilo.

35 Las FIGS. 4A y 4B ilustran un caso en el que el hilado y el estiramiento se separan. La FIG. 4A muestra un dispositivo de hilado 80, y la FIG. 4B muestra un dispositivo de estiramiento 90. En cada dispositivo, un hilo se puede enrollar, o se puede almacenar en un contenedor sin ser enrollado. En el dispositivo de hilado 80, una solución de hilado 82 está contenida en una microjeringa 81, se mueve en una dirección indicada por una flecha P usando una bomba de jeringa, se extruye desde una boquilla 83, y se suministra en un líquido de coagulación 85 en un baño de líquido de coagulación 84. Por lo tanto, se prepara un rollo de hilo 86 del hilo no estirado. Posteriormente, en el dispositivo de estiramiento 90, el hilo no estirado se desenrolla del rollo de hilo 86, se suministra a un dispositivo de estiramiento con calor seco 89, y se estira dentro de una guía 91. La proporción de estiramiento depende de la proporción de velocidad entre un rodillo de prensa de suministro 87 y un rodillo de prensa de entrada 88. A continuación, el hilo estirado se enrolla en forma de un rollo de hilo 92. Por lo tanto, se obtiene un hilo estirado.

45 El diámetro de la fibra de polipéptido artificial obtenida en el hilado - estiramiento en estado húmedo varía preferentemente de 5 a 100 μm . Este intervalo permite una producción de fibra estable. El diámetro de la fibra varía más preferentemente de 8 a 50 μm , y además varía preferentemente de 10 a 30 μm . La sección transversal de la fibra de polipéptido artificial obtenida en el hilado - estiramiento en estado húmedo no está limitada a una forma redonda y puede tener varias formas. Por lo tanto, diámetro de la fibra, como se usa en el presente documento, se refiere a un diámetro medio bajo la suposición de que la sección transversal es redonda.

50 5. Película Fundida

La solución de polipéptido de la presente invención se puede formar en una película fundida como una solución de fluido de hilado. Por ejemplo, la solución de fluido de hilado se puede fundir con un grosor determinado previamente en una placa que sea resistente al disolvente en la solución de fluido de hilado tal como una placa de vidrio, y el disolvente se elimina de la película fundida, de modo que se obtiene una película de polipéptido artificial. Para fundir la solución de fluido de hilado con un grosor determinado previamente, la solución se funde con un grosor de varios micrómetros o más usando una plantilla tal como una espátula rascadora y una espátula de cuchillo, y a partir de ese momento el disolvente se elimina secándolo a deformación reducida o sumergiéndolo en un baño de desolvatación. Por lo tanto, se obtiene una película fundida.

6. Reticulación

65 Para la fibra de polipéptido artificial o la película de la presente invención, se pueden formar reticulaciones por vía química entre moléculas de polipéptido. Los ejemplos de grupos funcionales que se pueden usar para la reticulación del polipéptido incluyen grupos amino, grupos carboxilo, grupos tiol, y grupos hidroxilo, aunque no se limitan a los

5 mismos. Un grupo amino de una cadena lateral de lisina contenido en un polipéptido se puede reticular con un grupo carboxilo de una cadena lateral de ácido glutámico o de un ácido aspártico a través de enlaces amida mediante condensación y deshidratación. Las reticulaciones se pueden formar mediante una reacción de condensación y deshidratación calentando al vacío, o con un agente de condensación y deshidratación tal como carbodiimida.

10 Además, se puede usar un agente de reticulación tal como glutaraldehído. Además, una enzima tal como transglutaminasa se puede usar para formar reticulaciones. Como un ejemplo, una reacción de reticulación se puede producir usando un agente de reticulación tal como carbodiimida, glutaraldehído, y resina epoxi polifuncional (Como un ejemplo, "Denacol" (nombre de producto) fabricado por Nagase ChemteX Corporation). La carbodiimida se representa con la fórmula general: $R^1N=C=NR^2$ (en la que R^1 y R^2 indica un grupo inorgánico que contiene un grupo alquilo con un índice de carbonos de 1 a 6, o un grupo cicloalquilo), y compuestos específicos de la misma incluyen clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida, diisopropil carbodiimida (DIC), etc. Entre estos, EDC y DIC son preferentes porque presentan una alta capacidad para formar enlaces amida de cadenas peptídicas y por lo tanto producen reacciones de reticulación fácilmente. Con respecto al tratamiento de reticulación, las reticulaciones se pueden formar mediante la adición de un agente de reticulación a una solución de fluido de hilado, o aplicando un agente de reticulación a hilos estirados y sometiendo los hilos a secado con calor a vacío. El agente de reticulación se puede aplicar a fibras en una forma pura (100 % en masa), o se puede diluir usando un alcohol inferior con un índice de carbonos de 1 a 5, solución tampón o similares, y a partir de ese momento se puede aplicar a fibras a una concentración de un 0,005 % a un 10 % en masa. Con respecto a las condiciones para el tratamiento, la temperatura es preferentemente de 20 °C a 45 °C y el tiempo es de 3 a 42 horas. El tratamiento de reticulación usando el agente de reticulación aumenta la resistencia, dureza, resistencia química, etc., de las fibras artificiales estiradas de polipéptido.

25 7. Método de Purificación de Polipéptido

30 Los polipéptidos se pueden purificar usando la solución de polipéptido descrita anteriormente. Especialmente cuando los polipéptidos son proteínas insolubles, se puede obtener un efecto elevado. En la presente invención, "proteínas insolubles" se refiere a proteínas insolubles en agua, es decir, proteínas con alta hidrofobia de forma específica, la solución de polipéptido se prepara por adición del disolvente que contiene cualquiera de las sustancias mencionadas anteriormente (i)-(iii) al polipéptido obtenido a partir de proteínas de seda de araña natural, disolviendo el polipéptido mediante tratamiento térmico y recogiendo un sobrenadante. Las condiciones para el tratamiento térmico no están limitadas en particular siempre y cuando las proteínas insolubles se puedan disolver pero no se descompongan. Por ejemplo, la temperatura del tratamiento térmico es preferentemente 45 °C o superior, y más preferentemente 50 °C o superior, en términos de solubilidad. Además, en términos de supresión de la descomposición, la temperatura del tratamiento térmico es preferentemente 100 °C o inferior, y más preferentemente 95 °C o inferior. El tiempo de tratamiento térmico es preferentemente de 15 a 300 minutos, y más preferentemente de 30 a 180 minutos, por ejemplo. Además, la recogida de un sobrenadante no está limitada en particular siempre y cuando se pueda separar un precipitado. Para facilitar la manipulación, la separación se realiza preferentemente a través de filtración o centrifugación. La separación a través de filtración se puede realizar usando un papel de filtro, una membrana de filtración, etc., por ejemplo. Las condiciones para la centrifugación no están limitadas en particular, y se puede realizar a 11000 x g durante 5 minutos, por ejemplo.

45 Cuando el polipéptido obtenido a partir de proteínas de seda de araña natural es una proteína de seda de araña recombinante, es preferente lavar la proteína de seda de araña recombinante con un tensioactivo aniónico tal como SDS antes de la adición de un disolvente, en términos de aumentar el grado de purificación. De forma específica, una célula hospedadora que expresa la proteína de seda de araña recombinante se interrumpe para extraer, como precipitado, una fracción de proteína insoluble que contiene la proteína de seda de araña recombinante, y la proteína insoluble extraída que contiene la proteína de seda de araña recombinante se lava con un tensioactivo aniónico.

50 Como se ha descrito anteriormente, dado que la solución de polipéptido en la que el polipéptido obtenido a partir de proteínas de seda de araña natural se disuelve en el disolvente descrito anteriormente se puede usar como una solución de fluido de hilado, no es necesario convertir en polvo mediante liofilización la solución de polipéptido purificado de acuerdo con el método de purificación de polipéptidos mencionado anteriormente, y se puede usar directamente para una solución de fluido de hilado.

55 Ejemplos

60 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con detalles adicionales por medio de ejemplos. Obsérvese que la presente invención no está limitada a los siguientes ejemplos.

(Proteína de Seda de Araña Recombinante)

< Síntesis Genética >

65 (1) Síntesis Genética de ADF3Kai

Una secuencia de aminoácidos parcial de ADF3, que es una de las dos proteínas de seda principal de *Araneus diadematus*, se obtuvo en la base de datos de la página web de NCBI (N.º de Registro en NCBI: AAC47010, GI: 1263287), y la síntesis de un gen que codifica una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) se externalizó a GenScript, Inc. La secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) es una secuencia de aminoácidos obtenida por adición de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) formada por un codón de inicio, 10 etiquetas de His y un sitio de reconocimiento de Proteasa HRV3C (Proteasa 3C de rinovirus Humano), al extremo N-terminal de dicha secuencia de aminoácidos parcial de ADF3. En consecuencia, se obtuvo un vector pUC57 al que se le había introducido un gen de ADF3Kai que tiene una secuencia de bases representada con la SEQ ID NO: 7 (que tiene un sitio Nde I inmediatamente cadena arriba del extremo en la posición 5' terminal del gen y un sitio Xba I inmediatamente cadena abajo del extremo en la posición 5' terminal de la misma). A partir de ese momento, dicho gen se sometió a un tratamiento de restricción enzimática con Nde I y EcoR I, y se recombinó en un vector de expresión pET22b(+).

(2) Síntesis Genética de ADF3Kai-Large

La mitad de la secuencia genética de ADF3Kai en el lado en el extremo 5' (denominada en lo sucesivo en el presente documento secuencia A) se amplificó mediante reacción de PCR usando ADF3Kai como molde, y un cebador promotor T7 (SEQ ID NO: 11) y un cebador Rep Xba I (SEQ ID NO: 12). El fragmento de ADN obtenido de la secuencia A se recombinó en un vector pUC118 que previamente se había sometido a tratamiento de restricción enzimática con Nde I y Xba I usando un Kit de Clonación Mighty (fabricado por TAKARA BIO INC.). De forma análoga, la mitad de la secuencia genética de ADF3Kai en el lado en el extremo 3' (denominada en lo sucesivo en el presente documento secuencia B) se amplificó mediante reacción de PCR usando ADF3Kai como molde, y un cebador Xba I Rep (SEQ ID NO: 14) y un cebador terminador T7 (SEQ ID NO: 13). El fragmento de ADN obtenido de la secuencia B se recombinó en un vector pUC118 que previamente se había sometido a tratamiento de restricción enzimática con Xba I y EcoR I usando el Kit de Clonación Mighty (fabricado por TAKARA BIO INC.). El vector pUC118 en el que se había introducido la secuencia A y el vector pUC118 en el que se había introducido la secuencia B se sometieron al tratamiento de restricción enzimática con Nde I, Xba I y Xba I, EcoR I, respectivamente, y los fragmentos de ADN diana de las secuencias A y B se purificaron mediante corte en gel. Los fragmentos de ADN A, B y el vector pET22b(+) que previamente se había sometido a tratamiento de restricción enzimática con Nde I y EcoR I se sometieron a una reacción de ligación y se transformaron en DH5 α de *Escherichia coli*. Después de confirmar la inserción de los fragmentos de ADN diana mediante una PCR de colonias usando un cebador promotor T7 y un cebador terminador T7, el plásmido se extrajo de una colonia en la que se obtuvo un tamaño de banda diana (3,6 kpb), y toda la secuencia de bases se comprobó mediante una reacción de secuencias que usa un Analizador Genético 3130 x 1 (Applied Biosystems). En consecuencia, se confirmó la construcción de un gen de ADF3Kai-Large representado con la SEQ ID NO: 9. La secuencia de aminoácidos de ADF3Kai-Large es tal como se representa con la SEQ ID NO: 4.

(3) Síntesis Genética de ADF3Kai-Large-NRSH1

Con un vector pET22b(+) en el que se había introducido como molde el gen de ADF3Kai-Large obtenido anteriormente, a través de Mutagénesis Dirigida al Sitio usando un Kit Basal de MutaGénesis PrimeSTAR (Fabricado por TAKARA BIO INC.), un codón GGC correspondiente al 1155º resto de aminoácido, es decir, glicina (Gly), en la secuencia de aminoácidos de ADF3Kai-Large (SEQ ID NO: 4) se mutó en un codón de parada TAA, y un gen de ADF3Kai-Large-NRSH1 representado con la SEQ ID NO: 10 se construyó en el vector pET22b(+). La precisión de la introducción de la mutación se comprobó mediante la reacción de secuencias que usa the Analizador Genético 3130 x 1 (Applied Biosystems). La secuencia de aminoácidos de ADF3Kai-Large-NRSH1 es tal como se representa con la SEQ ID NO: 8.

(4) Síntesis Genética de ADF4Kai

Una secuencia de aminoácidos parcial de ADF4, que es una de las dos proteínas de seda principal de *Araneus diadematus*, se obtuvo en la base de datos de la página web de NCBI (N.º de Registro en NCBI: AAC47011, GI: 1263289), y se sintetizó un gen que codifica una proteína ADF4Kai que tiene una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 15). La secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 15) es una secuencia de aminoácidos obtenida por adición de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) formada por un codón de inicio, 10 etiquetas de His y un sitio de reconocimiento de Proteasa HRV3C, al extremo N-terminal de dicha secuencia de aminoácidos parcial de ADF4. En consecuencia, se obtuvo un vector pUC57 al que se le había introducido un gen de ADF4Kai que tiene una secuencia de bases representada con la SEQ ID NO: 16 (que tiene un sitio Nde I inmediatamente cadena arriba del extremo en la posición 5' terminal del gen y un sitio Xba I inmediatamente cadena abajo del extremo en la posición 5' terminal de la misma). A partir de ese momento, dicho gen se sometió a un tratamiento de restricción enzimática con Nde I y EcoR I, y se recombinó en un vector de expresión pET22b(+). Por lo tanto, se obtuvo un vector pET22b(+) al que se le había introducido el gen ADF4Kai.

(5) Síntesis Genética de MaSp2_N

Una secuencia de aminoácidos parcial de la espidroína ampular principal (MaSp2) de *Nephila clavipes* se obtuvo en la base de datos de la página web de NCBI (N.º de Registro en NCBI: AAT75313, GI: 50363147), y se sintetizó un

gen que codifica una proteína MaSp2_N que tiene una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17). La secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17) es una secuencia de aminoácidos obtenida por adición de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) formada por un codón de inicio, 10 etiquetas de His y un sitio de reconocimiento de Proteasa HRV3C, al extremo N-terminal de dicha secuencia de aminoácidos parcial de MaSp2_N. En consecuencia, se obtuvo un vector pUC57 al que se le había introducido un gen MaSp2_N que tiene una secuencia de bases representada con la SEQ ID NO: 18 (que tiene un sitio Nde I inmediatamente cadena arriba del extremo en la posición 5' terminal del gen y un sitio Xba I inmediatamente cadena abajo del extremo en la posición 5' terminal de la misma). A partir de ese momento, dicho gen se sometió a un tratamiento de restricción enzimática con Nde I y EcoR I, y se recombinó en un vector de expresión pET22b(+). Por lo tanto, se obtuvo un vector pET22b(+) al que se le había introducido el gen MaSp2_N.

(6) Síntesis Genética de Flag_92_short2

Una secuencia parcial de proteína de seda flageliforme de *Nephila clavipes* se obtuvo en la base de datos de la página web de NCBI (N.º de Registro en NCBI: AAF36090, GI: 7106224), y se seleccionó la secuencia de aminoácidos del 1220º resto al 1659º resto del extremo N-terminal, que corresponde a secciones y motivos repetitivos (denominada secuencia PR1). Además, una secuencia parcial de proteína de seda flageliforme de *Nephila clavipes* se obtuvo en la base de datos de la página web de NCBI (N.º de Registro en NCBI: AAC38847, GI: 2833649), y se seleccionó la secuencia de aminoácidos en el extremo C-terminal del 816º resto al 907º resto del extremo C-terminal (denominada NR C-terminal). Se sintetizó un gen que codifica una proteína Flag_92_short2 que tiene una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 19). La secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 19) es una secuencia de aminoácidos obtenida por adición de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) formada por un codón de inicio, 10 etiquetas de His y un sitio de reconocimiento de Proteasa HRV3C, al extremo N-terminal de la secuencia combinada de la secuencia PR1 y de la secuencia NR C-terminal. En consecuencia, se obtuvo un vector pUC57 al que se le había introducido un gen Flag_92_short2 que tiene una secuencia de bases representada con la SEQ ID NO: 20 (que tiene un sitio Nde I inmediatamente cadena arriba del extremo en la posición 5' terminal del gen y un sitio Xba I inmediatamente cadena abajo del extremo en la posición 5' terminal de la misma). A partir de ese momento, dicho gen se sometió a un tratamiento de restricción enzimática con Nde I y EcoR I, y se recombinó en un vector de expresión pET22b(+). Por lo tanto, se obtuvo un vector pET22b(+) al que se le había introducido el gen Flag_92_short2.

< Expresión de Proteínas >

Cada uno de, el vector de expresión pET22b(+) que contiene la secuencia genética de ADF3Kai-Large-NRSH1, el vector de expresión pET22b(+) que contiene la secuencia genética de ADF4Kai, el vector de expresión pET22b(+) que contiene la secuencia genética de MaSp2_N, y el vector de expresión pET22b(+) que contiene la secuencia genética de Flag_92_short2, se transformaron en Rosetta de *Escherichia coli* (DE3). La colonia individual obtenida se incubó durante 15 horas en 2 ml de un medio de cultivo LB que contenía ampicilina. A partir de ese momento, se añadieron 1,4 ml de dicha solución de cultivo a 140 ml de un medio de cultivo LB que contenía ampicilina, y se incubó hasta una DO₆₀₀ de 3,5 en las condiciones de 37 °C y 200 rpm. A continuación, la solución de cultivo con la DO₆₀₀ de 3,5 se añadió a 7L de un medio de cultivo 2xYT que contenía ampicilina junto con 140 ml de glucosa al 50 %, y se incubó adicionalmente hasta la DO₆₀₀ de 4,0. A partir de ese momento, se añadió isopropil-β-tiogalactopiranosido (IPTG) a la solución de cultivo obtenida con la DO₆₀₀ de 4,0 de modo que la concentración final llegó a ser 0,5 mM, induciendo de ese modo la expresión de la proteína. Después de un lapso de tiempo de dos horas desde la adición de IPTG, la solución de cultivo se centrifugó y las células bacterianas se recogieron. Cada una de las soluciones de proteína preparadas a partir de las soluciones de cultivo antes de la adición de IPTG y después de la adición de IPTG se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida. En consecuencia, se observaron tamaños de banda diana (ADF3Kai-Large-NRSH1: aproximadamente 101,1 kDa; ADF4Kai: aproximadamente 37,7 kDa; MaSp2_N: aproximadamente 31,7 kDa; y Flag_92_short2: aproximadamente 46,6 kDa) con la adición de IPTG, y se confirmó la expresión de la proteína habían. *Escherichia coli* que expresa la proteína ADF3Kai-Large-NRSH1, *Escherichia coli* que expresa la proteína ADF4Kai, *Escherichia coli* que expresa la proteína MaSp2_N, y *Escherichia coli* que expresa la proteína Flag_92_short2 se almacenaron en un congelador (-20 °C).

(Ejemplo 1)

(1) Proteína Usada

(I) Aproximadamente 4,5 g de células bacterianas de la *Escherichia coli* que expresa la proteína ADF3Kai-Large-NRSH1 y 30 ml de una solución tampón AI (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4) se añadieron a un tubo de centrifugadora (50 ml). Después de dispersar las células bacterianas con una mezcladora ("SI-0286" fabricada por GE, nivel 10), la dispersión se centrifugó (10.000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente) con una centrifugadora ("MX-305" fabricada por TOMY SEIKO Co., Ltd.), y un sobrenadante se descartó.

(II) A un precipitado (células bacterianas) obtenido por la centrifugación, se añadieron 30 ml de la solución tampón AI y 0,3 ml de PMSF 0,1 M (disuelto con isopropanol). Después de dispersar el precipitado durante 3 minutos con la mezcladora descrita anteriormente (nivel 10) fabricada por GE, las células bacterianas se

interrumpieron usando un aparato de interrupción con ultrasonidos ("VCX500" fabricado por Sonics & Materials, Inc.) y se centrifugaron (10.000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente).

(III) A un precipitado obtenido con la centrifugación, se añadieron 30 ml de la solución tampón AI. Después de dispersar el precipitado durante 3 minutos con una mezcladora ("T18 basic ULTRA TURRAX" fabricada por IKA, nivel 2), la dispersión se centrifugó (10.000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente) con la centrifugadora descrita anteriormente fabricada por TOMY SEIKO Co., Ltd., y un sobrenadante se retiró.

(IV) Al tubo de centrifugadora desde el que se descartó el sobrenadante, se añadió una solución tampón I de urea 7,5 M (urea 7,5 M, dihidrogenofosfato sódico 10 mM, NaCl 20 mM, Tris-HCl 1 mM, pH 7,0), y un precipitado se dispersó bien con el aparato de interrupción mediante ultrasonidos (nivel 7) mencionado anteriormente fabricado por SMT. A partir de ese momento, el precipitado se disolvió durante 120 minutos con un agitador (200 rpm, 60 °C) fabricado por TAITEC CORPORATION. La solución de proteína después de la disolución se centrifugó (11.000 x g, 10 minutos, temperatura ambiente) con la centrifugadora descrita anteriormente fabricada por TOMY SEIKO Co., Ltd., y un sobrenadante se dializó con agua usando un tubo de diálisis (tubo de celulosa 36/32 fabricado por Sanko Junyaku Co., Ltd.). La proteína agregada (color blanco) obtenida después de la diálisis se recogió por centrifugación, y el agua se eliminó con un aparato de liofilización, para recoger el polvo liofilizado. El grado de purificación de la proteína diana ADF3Kai-Large-NRSH1 (aproximadamente 101,1 kDa) en el polvo liofilizado obtenido se comprobó analizando imágenes de los resultados de electroforesis en gel de poliacrilamida (tinción con CBB) de dicho polvo de proteína usando Totallab (nonlinear dynamics Ltd.). Como resultado, el grado de purificación de ADF3Kai-Large-NRSH1 era aproximadamente un 85 %.

2. Disolvente

(1) Disolvente polar

Como disolvente, se examinaron principalmente los disolventes polares que se usan para polimerización de fibra acrílica y soluciones de hilado de fibra acrílica, y como disolventes para polimerización de poliimida.

DMA: N,N-dimetilacetamida
 DMF: N,N-dimetilformamida
 DMI: 1,3-dimetil-2-imidazolidinona
 NMP: N-metil-2-pirrolidona
 HFIP: hexafluoroisopropanol
 DMSO: dimetil sulfóxido
 Ácido fórmico
 Carbonato de butileno
 Carbonato de propileno
 γ-butirolactona
 Hexametil fosforamida

(2) Promotor de disolución (sal inorgánica)

Se examinaron las siguientes sales inorgánicas.

Haluros de metal alcalino: LiCl, LiBr
 Haluro de metal alcalinotérreo: CaCl₂
 Nitrato de metal alcalinotérreo: Ca(NO₃)₂
 Tiocianato sódico: NaSCN

< Experimento 1 >

Como se muestra en la Tabla 1, los ensayos de solubilidad se realizaron usando sistemas que añadían sales inorgánicas a disolventes polares. La temperatura se ajustó a 100 °C. La concentración del polipéptido (proteína) obtenido a partir de proteínas de seda de araña natural se estableció en un 4 % en masa. Las evaluaciones de solubilidad que se muestran en la Tabla 1 y en las Tablas posteriores que siguen a continuación se realizaron basándose en los siguientes patrones. En la Tabla 1, el % en masa de la sal inorgánica es la proporción de masa de la sal inorgánica con respecto a la masa total del disolvente polar y la sal inorgánica.

[Patrones de Evaluación de Solubilidad]

A: Disuelto
 B: Mayormente disuelto, pero las sustancias sin disolver permanecen parcialmente
 C: Sin disolver

[Tabla 1]

Disolvente polar	Sal inorgánica (% en masa)	Solubilidad	Solubilidad en caso de usar aditivo (% en masa)		
			EtOH* ¹	MeOH* ¹	Agua ultrapura
DMSO	Sin sal	A	23 A	14 A	90 A
	LiCl 10	A	60 A	52 A	90 A
DMSO	LiBr 10	A	33 A	30 A	90 A
	Ca(NO ₃) ₂ 95,5	A	74 A	78 A	90 A
	CaCl ₂ 13,6	A	57 A	39 A	90 A
	NaSCN 13,6	A	33 A	25 A	90 A
DMF	Sin sal (~150 °C)	C	-* ⁴	-	-
	LiCl 14,4	A	62 A	45 A	90 A
	LiBr 10	A	27 A	21 A	90 A
	Ca(NO ₃) ₂ 77,7	A	72 A	67 A	90 A
	CaCl ₂ 7,1	A	25 A	14 A	90 A
	NaSCN 27,8	A	36 A	35 A	90 A
HFIP* ²	Sin sal	A	47 A	38 A	40 A
DMA	Sin sal	C	-	-	-
	LiCl 11,1	C	-	-	-
NMP	Sin sal	C	-	-	-
	LiCl 10	C	-	-	-
DMI	Sin sal	C	-	-	-
	LiCl 14,2	C	-	-	-
Carbonato de butileno	Sin sal	C	-	-	-
	LiCl 8,7	C	-	-	-
Carbonato de propileno	Sin sal	C	-	-	-
	LiCl 8,3	C	-	-	-
Carbonato de etileno	Sin sal	C	-	-	-
	LiCl 7,7	C	-	-	-
γ-butirolactona	Sin sal	C	-	-	-
	LiCl 8,9	C	-	-	-
Fosforamida de hexamétilo	Sin sal	C	-	-	-
	LiCl 9,7	C	-	-	-
Ácido fórmico* ³	Sin sal	Se descompone	-	-	-
	LiCl 29,1	Se descompone	-	-	-

Disolvente polar	Sal inorgánica (% en masa)	Solubilidad	Solubilidad en caso de usar aditivo (% en masa)		
			EtOH* ¹	MeOH* ¹	Agua ultrapura

(Nota 1) EtOH indica alcohol etílico, y que MeOH indica alcohol metílico.

(Nota 2) Dado que HFIP tiene un punto de ebullición bajo, la disolución se realizó a 37 °C. Además, no se pudo disolver nada de sal (LiCl) en HFIP.

(Nota 3) La descomposición de proteína por el ácido fórmico se confirmó con un espectro de masas.

(Nota 4) En la Tabla 1, [-] significa que no se realizó experimento.

Tal como es evidente a partir de la Tabla 1, se encontró que los disolventes que contienen cualquiera de (i)-(iii) mencionados anteriormente eran superiores de forma selectiva.

- 5 (i) Dimetil sulfóxido: DMSO
 (ii) Dimetil sulfóxido: DMSO con una sal inorgánica
 (iii) N,N-dimetilformamida: DMF con una sal inorgánica

10 Además, también se encontró que los sistemas que añaden cualquiera de alcohol etílico, alcohol metílico y agua ultrapura a las sustancias (i)-(iii) mencionadas anteriormente tienen una solubilidad elevada.

15 A continuación, la capacidad de hilado se examinó con respecto a los disolventes que se habían clasificado como A en los patrones de evaluación de solubilidad en la Tabla 1. El hilado en estado húmedo se adoptó para los ensayos de capacidad de hilado. Si los hilos tanto estirados como no estirados se podían producir en las siguientes condiciones fue un criterio para juzgar la capacidad de hilado: en el proceso de hilado que se muestra en la FIG. 4A, la solución de hilado se cargó en un cilindro y se extruyó desde una boquilla de 0,3 mm de diámetro a una velocidad de 2,0 ml/h usando una bomba de jeringa, y a partir de ese momento el disolvente se extrajo en un 100 % en masa de líquido de coagulación de metanol. La longitud del baño de líquido de coagulación era 250 mm, y la velocidad de entrada era 2,1 m/min. En consecuencia, todos los disolventes que se habían clasificado como A en los patrones de
 20 evaluación de solubilidad en la Tabla 1 presentaban capacidad de hilado.

< Experimento 2 >

25 Se realizó un experimento para aumentar la concentración del polipéptido (proteína) obtenido a partir de proteínas de seda de araña natural. Se comprobó si las proteínas a concentraciones de un 40 % en masa, un 45 % en masa y un 50 % en masa se podrían disolver en disolventes a 100 °C. La Tabla 2 muestra los resultados. De forma adicional, las soluciones disueltas de DMF (concentración de LiCl: 14,4 % en masa) y DMSO (concentración de LiCl: 10 % en masa) eran estables e incluso si disminuían a temperatura ambiente (25 °C), y mantenían el estado disuelto.

30

[Tabla 2]

Concentración de proteína (% en masa)	Sin adición de LiCl			Con adición de LiCl			Concentración de LiCl (% en masa)
	40	45	50	40	45	50	
Ácido fórmico	Se descompone* ¹	-* ³	-	Se descompone* ¹	-	-	29,1
DMF	-	-	-	A	A	B	14,4
DMSO	-	-	-	A	B	B	10
HFIP* ²	B	B	B	-	-	-	0,2 o inferior

(Nota 1) La descomposición de proteína con ácido fórmico se confirmó con un espectro de masas.

(Nota 2) Dado que HFIP tiene un punto de ebullición bajo, la disolución se realizó a 37 °C.

(Nota 3) En la Tabla 2, [-] significa que no se realizó experimento.

35 A partir de la Tabla 2, se encontró que la adición de la sal inorgánica a DMSO permitía que la proteína se disolviera de forma suficiente y favorable hasta un 40 % en masa (el límite de solubilidad era un 43 % en masa), y la adición de la sal a DMF permitía que la proteína se disolviera de forma suficiente y favorable hasta un 45 % en masa (el límite de solubilidad era un 48 % en masa).

< Experimento 3 >

A continuación, la proteína se disolvió a 100 °C usando DMSO, y la temperatura se mantuvo a 100 °C o la temperatura de la solución de polipéptido se redujo a temperaturas bajas y se mantuvo durante tres horas para observar su estabilidad. La Tabla 3 muestra los resultados.

5

[Tabla 3]

Concentración de LiCl (% en masa)	Concentración de proteína (% en masa)	Temperatura (°C)			
		25	50	80	100
0	20	Gel	Gel	A	A
	25	Gel	Gel	A	A
0,9	20	Gel	B	A	A
2,7	20	Gel	A	A	A
3,6	20	A	A	A	A
	30	Gel	B	B	A
	45	Gel	B	B	A
4,5	20	A	A	A	A
5,4	20	A	A	A	A
10	20	A	A	A	A
	30	A	A	A	A
	40	A	A	A	A

A partir de la Tabla 3, se confirmó que, si la concentración de LiCl es un 10 % en masa, la solubilidad es estable en temperaturas prácticas que varían de 25 a 100 °C cuando la concentración de proteína es un 40 % en masa o inferior.

10

(Ejemplo 2)

15 (1) Solución de Hilado (Solución de Fluido de Hilado)

La proteína usada en el Ejemplo 1 se usó para producir una solución de hilado (solución de fluido de hilado). En primer lugar, un polvo liofilizado (proteína) se añadió a DMSO (100 °C) que contenía un 10 % en masa de LiCl de modo que la concentración del polvo liofilizado se convirtió en un 20 % en masa. Después de 6 horas de disolución usando un aparato de rotación, los polvos y las burbujas se eliminaron. La viscosidad de la solución de proteína era de 1 Pa.s (Pascuales por segundo). Por lo tanto, la solución de hilado (solución de fluido de hilado) se preparó.

20

(2) Procesos de Hilado - Estiramiento

El método que se muestra en la FIG. 2A se adoptó como los procesos de hilado y estiramiento. La solución de hilado se cargó en un cilindro y se extruyó desde una boquilla 0,3 mm de diámetro a una velocidad de 2,0 ml/h usando una bomba de jeringa, y a partir de ese momento el disolvente se extrajo en un 100 % en masa de líquido de coagulación de metanol, para producir un hilo no estirado. La longitud del baño de líquido de coagulación era 250 mm, y la velocidad de entrada era 2,1 m/min. A continuación, como estiramiento, el hilo no estirado se estiró hasta 4,5 veces en agua caliente a 50 °C. La velocidad de entrada era 9,35 m/min.

25

30

(3) Medición de Propiedades Físicas

El diámetro de la fibra se midió usando un microscopio óptico.

35

(a) Ensayo de tracción

La resistencia, el módulo elástico inicial (obtenido basándose en la medición de inclinaciones de 20 puntos: las inclinaciones se midieron a 20 puntos con un intervalo de 50 mseg y la inclinación máxima se definió como el módulo

elástico inicial), y la elongación de la fibra se midió usando un probador de tracción (probador de tablero pequeño EZ-S fabricado por Shimadzu Corporation) a una temperatura ambiente de 25 °C y una humedad relativa de un 60 %, y se calculó la dureza. La muestra se unió a un molde de cartón, la distancia entre las pinzas era de 20 mm, y la velocidad de tracción era de 10 mm/min. La capacidad de la celda de carga era 1 N, y la pieza era de tipo clip. El valor de medido fue un promedio de cinco muestras (n = 5). La fórmula para calcular la dureza fue la que sigue a continuación:

$$\text{Dureza} = [E/(r^2 \times \pi \times L) \times 1000] \text{ (unidad: MJ/m}^3\text{)},$$

10 en la que

- E Energía de fractura (unidad: J)
- r Radio de la fibra (unidad: mm)
- π Pi
- 15 L Distancia entre pinzas en la medición del ensayo de tracción.

La Tabla 4 resume diversas propiedades físicas de las fibras. Además, la FIG. 5 muestra la curva de tensión-desplazamiento (deformación) de la fibra obtenida.

20 (Ejemplo 3)

La solución de hilado idéntica a la del Ejemplo 2 se cargó en un cilindro y se extruyó desde una boquilla 0,3 mm de diámetro a una velocidad de 1,4 ml/h usando una bomba de jeringa, y a partir de ese momento el disolvente se extrajo en un 100 % en masa de líquido de coagulación de metanol, para producir un hilo no estirado. La longitud del baño de líquido de coagulación era 250 mm, y la velocidad de entrada era 2,2 m/min. A continuación, como estiramiento, el hilo no estirado se estiró hasta 3,5 veces en agua caliente a 50 °C. La velocidad de entrada era 7,7 m/min. A partir de ese momento, el hilo se estiró hasta a 1,25 veces mediante estiramiento con calor seco a 160 °C. El método que se muestra en las FIGS. 2A y 2B se adoptó como los procesos de hilado y estiramiento.

30 Se midieron diversas propiedades físicas de la fibra obtenida como se ha descrito anteriormente, y la Tabla 4 resume los resultados. La FIG. 6 muestra la curva de tensión-desplazamiento (deformación) de la fibra obtenida.

[Tabla 4]

	Fuerza máxima del ensayo puntual (mN)	Tensión puntual máxima (MPa)	Módulo elástico inicial (GPa)	Desplazamiento en el punto de ruptura (%)	Diámetro (mm)	Rugosidad (MJ/m ³)
Ej. 2	70,5	213,7	6,2	35,2	0,0205	59,1
Ej. 3	119,1	313,3	9,4	19,9	0,0220	52,6

35 (Ejemplo 4)

La solución de hilado se produjo de la misma manera que en el Ejemplo 2 excepto porque la concentración de proteína era de un 7 % en masa y solamente se usó DMSO como disolvente. Se usó el dispositivo de hilado que se muestra en las FIGS. 2A-2B. Las siguientes son condiciones respectivas del hilado en estado húmedo.

40

(1) Procesos de Extrusión - Coagulación

- Diámetro de la boquilla de extrusión: 0,3 mm
- Velocidad de extrusión: 3,0 ml/h
- 45 Temperatura del líquido de coagulación en el baño: 10 °C

(2) Primera etapa del estiramiento

50 La primera etapa del estiramiento se realizó en agua caliente a 50 °C, a una proporción de estiramiento de 2,5 veces y una velocidad de entrada de 5,5 m/min (55 rpm) durante 3,5 minutos.

(3) Segunda etapa del estiramiento

La segunda etapa del estiramiento se realizó en un horno de calor seco a 190 °C, a una velocidad de alimentación de 20 rpm y una velocidad de entrada de 31 rpm (proporción de estiramiento: 1,55 veces).

(4) Propiedades físicas del hilo estirado obtenido

Las propiedades físicas del hilo estirado obtenido se midieron como se ha descrito anteriormente. Como resultado, el diámetro medio de la fibra individual fue 22,0 µm, la tensión puntual máxima fue 99,2 MPa, el módulo elástico inicial fue 3,5 GPa, el desplazamiento en el punto de ruptura (elongación) fue un 8,7 %, y la dureza fue 6,8 MJ/m³. La FIG. 7 muestra la curva de tensión-desplazamiento (deformación) de la fibra individual de las fibras obtenidas.

(Ejemplo 5)

La solución de hilado se produjo de la misma manera que en el Ejemplo 2 excepto porque la concentración de proteína era de un 10 % en masa y solamente se usó DMSO como disolvente. En el caso en el que el disolvente no contiene un promotor de disolución tal como una sal inorgánica, una concentración elevada de proteína da como resultado solidificación. Debido a esto, la jeringa 31 que se muestra en la FIG. 2A se calentó a 60 °C usando un calentador y el hilado se realizó a la vez que se evitaba la solidificación de la solución. El dispositivo de hilado que se muestra en las FIGS. 2A-2B se usó para el hilado - estiramiento en estado húmedo. Las siguientes son condiciones respectivas del hilado en estado húmedo.

(1) Procesos de Extrusión - Coagulación

Temperatura del calentador de la jeringa: 60 °C
 Diámetro de la boquilla de extrusión: 0,2 mm
 Velocidad de extrusión: 4,0 ml/h
 Temperatura del líquido de coagulación en el baño: 10 °C

(2) Primera etapa del estiramiento

La primera etapa del estiramiento se realizó en agua caliente a 50 °C, a una proporción de estiramiento de 3,5 veces y una velocidad de entrada de 7,7 m/min (77 rpm) durante 4 minutos.

(3) Segunda etapa del estiramiento

La segunda etapa del estiramiento se realizó en un horno de calor seco a 180 °C, a una velocidad de alimentación de 20 rpm y una velocidad de entrada de 26 rpm (proporción de estiramiento: 1,3 veces).

(4) Propiedades físicas del hilo estirado obtenido

Las propiedades físicas del hilo estirado obtenido se midieron como se ha descrito anteriormente. Como resultado, el diámetro medio de la fibra individual fue 22,0 µm, la tensión puntual máxima fue 285,9 MPa, el módulo elástico inicial fue 7,6 GPa, el desplazamiento en el punto de ruptura (elongación) fue de un 14,8 %, y la dureza fue 35,5 MJ/m³. La FIG. 8 muestra la curva de tensión-desplazamiento (deformación) de la fibra individual de las fibras obtenidas.

(Ejemplo 6)

(1) Proteína Usada

(I) Aproximadamente 4,5 g de células bacterianas de la *Escherichia coli* que expresa la proteína ADF4Kai y 30 ml de una solución tampón AI (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4) se añadieron a un tubo de centrifugadora (50 ml). Después de dispersar las células bacterianas con una mezcladora ("SI-0286" fabricada por GE, nivel 10), la dispersión se centrifugó (10.000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente) con una centrifugadora ("MX-305" fabricada por TOMY SEIKO Co., Ltd.), y un sobrenadante se descartó.

(II) A un precipitado (células bacterianas) obtenido por la centrifugación, se añadieron 30 ml de la solución tampón AI y 0,3 ml de PMSF 0,1 M (disuelto con isopropanol). Después de dispersar el precipitado durante 3 minutos con la mezcladora descrita anteriormente (nivel 10) fabricada por GE, las células bacterianas se interrumpieron usando un aparato de interrupción con ultrasonidos ("VCX500" fabricado por Sonics & Materials, Inc.) y se centrifugaron (10.000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente).

(III) A un precipitado (fracción de proteína insoluble) obtenido por la centrifugación, se añadieron 30 ml de una solución tampón B (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0) que contenía un 3 % en p/v de SDS. Después de dispersar el precipitado durante 3 minutos con una mezcladora ("T18 basic ULTRA TURRAX" fabricada por IKA, nivel 2), la dispersión se agitó durante 60 minutos con un agitador (bioagitador "BR- 43FL" fabricado por TAITEC

CORPORATION, 200 rpm, 37 °C). A partir de ese momento, la dispersión agitada se centrifugó (10.000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente) con la centrifugadora descrita anteriormente fabricada por TOMY SEIKO Co., Ltd., y un sobrenadante se retiró.

(IV) El precipitado a partir del que se había eliminado el sobrenadante se disolvió con DMSO (que contiene LiCl 2 M) a 80 °C, se agitó con un agitador, se centrifugó (11.000 x g, 10 minutos, temperatura ambiente) con la centrifugadora descrita anteriormente fabricada por TOMY SEIKO Co., Ltd., y un sobrenadante se dializó con agua usando un tubo de diálisis (tubo de celulosa 36/32 fabricado por Sanko Junyaku Co., Ltd.). La proteína agregada (color blanco) obtenida después de la diálisis se recogió por centrifugación, y el agua se eliminó con un aparato de liofilización, para recoger el polvo liofilizado. El grado de purificación de la proteína diana ADF4Kai (aproximadamente 37,7 kDa) en el polvo liofilizado obtenido se comprobó analizando imágenes de los resultados de electroforesis en gel de poliacrilamida (tinción con Oriole con la Tinción de Gel Fluorescente Oriole fabricada por Bio-RAD Laboratories, Inc.) de dicho polvo de proteína usando ImageLab (Bio-RAD Laboratories, Inc.). Como resultado, el grado de purificación de ADF4Kai era aproximadamente un 75,5 %.

(2) Solución de Hilado (Solución de fluido de Hilado)

La solución de hilado se produjo usando la proteína ADF4Kai obtenida anteriormente. El polvo liofilizado se añadió a DMSO que se había calentado a 80 °C de modo que la concentración del polvo liofilizado se convirtió en un 10,2 % en masa. Después de 6 horas de disolución usando un aparato de rotación, los polvos y las burbujas se eliminaron. La viscosidad de la solución de proteína fue 1 Pa.s (Pascales por segundo). Esta se usó como la solución de hilado.

(3) Procesos de Hilado - Estiramiento

El hilado en estado húmedo se realizó usando la solución de hilado obtenida anteriormente. El dispositivo de hilado que se muestra en la FIG. 4A se usó para los procesos de extrusión - coagulación. Las siguientes son condiciones respectivas del hilado en estado húmedo.

(I) Procesos de Extrusión - Coagulación

Diámetro de la boquilla de extrusión: 0,3 mm

Velocidad de extrusión: 6,0 ml/h

Temperatura del líquido de coagulación en el baño: 4 °C

Velocidad de entrada: 13,6 m/min

(II) Primera etapa del estiramiento

La primera etapa del estiramiento se realizó en agua caliente a 50 °C, a una proporción de estiramiento de 1,5 veces.

(III) Segunda etapa del estiramiento

La segunda etapa del estiramiento se realizó en un horno de calor seco a 180 °C, a una proporción de estiramiento de 1,3 veces.

(IV) Propiedades físicas del hilo estirado obtenido

Las propiedades físicas del hilo estirado obtenido se midieron como se ha descrito anteriormente. Como resultado, el diámetro medio de la fibra individual fue 83,8 µm, la tensión puntual máxima fue 196,4 MPa, el módulo elástico inicial fue 6,0 GPa, el desplazamiento en el punto de ruptura (elongación) fue un 14,6 %, y la dureza fue 24,6 MJ/m³. La FIG. 9 muestra la curva de tensión-desplazamiento (deformación) de la fibra individual de las fibras obtenidas.

(Ejemplo 7)

(1) Proteína Usada

(I) Aproximadamente 4,5 g de células bacterianas de la *Escherichia coli* que expresa la proteína MaSp2_N y 30 ml de una solución tampón AI (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4) se añadieron a un tubo de centrifugadora (50 ml). Después de dispersar las células bacterianas con una mezcladora ("SI-0286" fabricada por GE, nivel 10), la dispersión se centrifugó (10.000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente) con una centrifugadora ("MX-305" fabricada por TOMY SEIKO Co., Ltd.), y un sobrenadante se descartó.

(II) A un precipitado (células bacterianas) obtenido por la centrifugación, se añadieron 30 ml de la solución tampón AI y 0,3 ml de PMSF 0,1 M (disuelto con isopropanol). Después de dispersar el precipitado durante 3 minutos con la mezcladora descrita anteriormente (nivel 10) fabricada por GE, las células bacterianas se interrumpieron usando un aparato de interrupción con ultrasonidos ("VCX500" fabricado por Sonics & Materials, Inc.) y se centrifugaron (10.000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente).

(III) A un precipitado (fracción de proteína insoluble) obtenido por la centrifugación, se añadieron 30 ml de una solución tampón B (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0) que contenía un 3 % en p/v de SDS. Después de dispersar el precipitado durante 3 minutos con una mezcladora ("T18 basic ULTRA TURRAX" fabricada por IKA, nivel 2), la dispersión se agitó durante 60 minutos con un agitador (bioagitador "BR- 43FL" fabricado por TAITEC CORPORATION, 200 rpm, 37 °C). A partir de ese momento, la dispersión agitada se centrifugó (10.000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente) con la centrifugadora descrita anteriormente fabricada por TOMY SEIKO Co., Ltd., y un sobrenadante se retiró.

(IV) El precipitado, a partir del que se había eliminado el sobrenadante, se disolvió con DMSO (que contiene LiCl 2 M) a 80 °C, se agitó con un agitador, se centrifugó (11.000 x g, 10 minutos, temperatura ambiente) con la centrifugadora descrita anteriormente fabricada por TOMY SEIKO Co., Ltd., y el sobrenadante obtenido se dializó con agua usando un tubo de diálisis (tubo de celulosa 36/32 fabricado por Sanko Junyaku Co., Ltd.). La proteína agregada (color blanco) obtenida después de la diálisis se recogió por centrifugación, y el agua se eliminó con un aparato de liofilización, para recoger el polvo liofilizado. El grado de purificación de la proteína diana MaSp2_N (aproximadamente 31,7 kDa) en el polvo liofilizado obtenido se comprobó analizando imágenes de los resultados de electroforesis en gel de poliacrilamida (tinción con Oriole) de dicho polvo de proteína usando ImageLab (Bio-RAD Laboratories, Inc.). Como resultado, el grado de purificación de MaSp2_N era aproximadamente un 68,1 %.

(2) Solución de Hilado (Solución de fluido de Hilado)

La solución de hilado se produjo usando la proteína MaSp2_N obtenida anteriormente. El polvo liofilizado se añadió a DMSO que se había calentado a 40 °C de modo que la concentración del polvo liofilizado se convirtió en un 18 % en masa. Después de 6 horas de disolución usando un aparato de rotación, los polvos y las burbujas se eliminaron. La viscosidad de la solución de proteína fue 1 Pa.s (Pascales por segundo). Esta se usó como la solución de hilado.

(3) Procesos de Hilado - Estiramiento

El hilado en estado húmedo se realizó usando la solución de hilado obtenida anteriormente. El dispositivo de hilado que se muestra en la FIG. 4A se usó para los procesos de extrusión - coagulación. Las siguientes son condiciones respectivas del hilado en estado húmedo.

(I) Procesos de Extrusión - Coagulación

Diámetro de la boquilla de extrusión: 0,2 mm

Velocidad de extrusión: 2,0 ml/h

Temperatura del líquido de coagulación en el baño: 10 °C

Velocidad de entrada: 2,5 m/min

(II) Primera etapa del estiramiento

La primera etapa del estiramiento se realizó en agua caliente a 50 °C, a una proporción de estiramiento de 2,5 veces.

(III) Segunda etapa del estiramiento

La segunda etapa del estiramiento se realizó en un horno de calor seco a 80 °C, a una proporción de estiramiento de 1,85 veces.

(IV) Propiedades físicas del hilo estirado obtenido

Las propiedades físicas del hilo estirado obtenido se midieron como se ha descrito anteriormente. Como resultado, el diámetro medio de la fibra individual fue 35 µm, la tensión puntual máxima fue 236,7 MPa, el módulo elástico inicial fue 5,7 GPa, el desplazamiento en el punto de ruptura (elongación) fue un 14,9 %, y la dureza fue 26,5 MJ/m³. La FIG. 10 muestra la curva de tensión-desplazamiento (deformación) de la fibra individual de las fibras obtenidas.

(Ejemplo 8)

(1) Proteína Usada

(I) Aproximadamente 4,5 g de células bacterianas de la *Escherichia coli* que expresa la proteína Flag_92_short2 protein y 30 ml de una solución tampón AI (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4) se añadieron a un tubo de centrifugadora (50 ml). Después de dispersar las células bacterianas con una mezcladora ("SI-0286" fabricada por GE, nivel 10), la dispersión se centrifugó (10.000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente) con una centrifugadora ("MX-305" fabricada por TOMY SEIKO Co., Ltd.), y un sobrenadante se descartó.

(II) A un precipitado (células bacterianas) obtenido por la centrifugación, se añadieron 30 ml de la solución tampón AI y 0,3 ml de PMSF 0,1 M (disuelto con isopropanol). Después de dispersar el precipitado durante 3 minutos con la mezcladora descrita anteriormente (nivel 10) fabricada por GE, las células bacterianas se interrumpieron usando un aparato de interrupción con ultrasonidos ("VCX500" fabricado por Sonics & Materials, Inc.). La interrupción con ultrasonidos se realizó repitiendo un procesamiento de 20 segundos y una pausa de 5 segundos durante 8 minutos en total.

(III) Las células bacterianas después de la interrupción con ultrasonidos se centrifugaron (11.000 x g, 30 minutos, temperatura ambiente) con una centrifugadora ("MX-305" fabricada por TOMY SEIKO Co., Ltd.).

(IV) A un sobrenadante (fracción de proteína soluble) obtenido con la centrifugación, se añadió Ni sepharose (suspensión de un 50 %, fabricada por GE Healthcare Japan Corporation, número de producto "17-5318-02"). Después de dispersar la mezcla durante 3 minutos con una mezcladora ("T18 basic ULTRA TURRAX" fabricada por IKA, nivel 2), la dispersión se agitó durante 60 minutos con un agitador. A partir de ese momento, la dispersión agitada se centrifugó (500 x g, 5 minutos, temperatura ambiente) con la centrifugadora descrita anteriormente fabricada por TOMY SEIKO Co., Ltd., y un sobrenadante se retiró. El Ni sepharose se cargó en una columna vacía (fabricada por GE Healthcare Japan Corporation, número de producto "17-0435-01") y se lavó

con la solución tampón AI, y a partir de ese momento la proteína Flag_92_short2 se eluyó usando un tampón de elución (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, imidazol 300 mM, pH 7,5).

(V) El eluato obtenido se dializó con agua usando un tubo de diálisis (tubo de celulosa 36/32 fabricado por Sanko Junyaku Co., Ltd.). La humedad del líquido obtenido después de diálisis se retiró usando un aparato de liofilización, para recoger el polvo liofilizado. El grado de purificación de la proteína diana Flag_92_short2 (aproximadamente 46,6 kDa) en el polvo liofilizado obtenido se comprobó analizando imágenes de los resultados de electroforesis en gel de poliacrilamida (tinción con Oriole) de dicho polvo de proteína usando ImageLab (Bio-RAD Laboratories, Inc.). Como resultado, el grado de purificación de Flag_92_short2 era aproximadamente un 69,1 %.

(2) Solución de Hilado (Solución de fluido de Hilado)

La solución de hilado se produjo usando la proteína Flag_92_short2 obtenida anteriormente. El polvo liofilizado se añadió a DMSO que se había calentado a 45 °C de modo que la concentración del polvo liofilizado se convirtió en un 23 % en masa. Después de 6 horas de disolución usando un aparato de rotación, los polvos y las burbujas se eliminaron. La viscosidad de la solución de proteína fue 1 Pa.s (Pascales por segundo). Esta se usó como la solución de hilado.

(3) Procesos de Hilado - Estiramiento

El hilado en estado húmedo se realizó usando la solución de hilado obtenida anteriormente. El dispositivo de hilado que se muestra en la FIG. 4A se usó para los procesos de extrusión - coagulación. Las siguientes son condiciones respectivas del hilado en estado húmedo.

(I) Procesos de Extrusión - Coagulación

- Diámetro de la boquilla de extrusión: 0,2 mm
- Velocidad de extrusión: 1,0 ml/h
- Temperatura del líquido de coagulación en el baño: 10 °C
- Velocidad de entrada: 1,65 m/min

(II) Primera etapa del estiramiento

La primera etapa del estiramiento se realizó en aire a temperatura ambiente a una proporción de estiramiento de 1,5 veces. La fibra obtenida en esta etapa se denomina hilo estirado primario.

(III) Segunda etapa del estiramiento

La segunda etapa del estiramiento se realizó en un horno de calor seco a 160 °C a una proporción de estiramiento de 1,34 veces. La fibra obtenida en esta etapa se denomina hilo estirado secundario.

(IV) Propiedades físicas de los hilos estirados obtenidos

Las propiedades físicas del hilo estirado primario y del hilo estirado secundario obtenidos se midieron como se ha descrito anteriormente. La Tabla 5 que sigue a continuación muestra los resultados. Además, las FIGS. 11 y 12 muestran las curvas de tensión-desplazamiento (deformación) de la fibra individual de las fibras del hilo estirado primario y el hilo estirado secundario obtenidas, respectivamente.

[Tabla 5]

	Tensión puntual máxima (MPa)	Módulo elástico inicial (GPa)	Desplazamiento en el punto de ruptura (%)	Diámetro (µm)	Rugosidad (MJ/m ³)
Hilo estirado primario	48,9	2,3	75,9	68,7	26,7
Hilo estirado secundario	67,6	0,02	14,6	52,0	0,2

(Ejemplo 9)

< Extracción de Proteína >

(1) Aproximadamente 4,5 g de células bacterianas de la *Escherichia coli* que expresa la proteína ADF3Kai-Large-NRSH1 y 30 ml de una solución tampón AI (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4) se añadieron a un tubo de centrifugadora (50 ml). Después de dispersar las células bacterianas con una mezcladora ("SI-0286" fabricada por GE, nivel 10), la dispersión se centrifugó (10.000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente) con una centrifugadora ("MX-305" fabricada por TOMY SEIKO Co., Ltd.), y un sobrenadante se descartó.

(2) A un precipitado (células bacterianas) obtenido por la centrifugación, se añadieron 30 ml de la solución tampón AI y 0,3 ml de PMSF 0,1 M (disuelto con isopropanol). Después de dispersar el precipitado durante 3 minutos con la mezcladora descrita anteriormente (nivel 10) fabricada por GE, las células bacterianas se interrumpieron usando un aparato de interrupción con ultrasonidos ("VCX500" fabricado por Sonics & Materials,

Inc.) y se centrifugaron (10.000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente). Después de descartar un sobrenadante, este se dejó durante aproximadamente 10 minutos en agua enfriada con hielo para disminuir la temperatura. La misma interrupción y centrifugación de células bacterianas se repitió de nuevo.

5 < Lavado de Proteína >

10 A un precipitado (fracción de proteína insoluble) obtenido por la centrifugación, se añadieron 30 ml de una solución tampón B (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0) que contenía un 3 % en p/v de SDS. Después de dispersar bien el precipitado con el aparato de interrupción con ultrasonidos descrito anteriormente (nivel 7) fabricado por SMT, la dispersión se agitó durante 60 minutos con un agitador (fabricado por TAITEC CORPORATION, 200 rpm, 37 °C). A partir de ese momento, la dispersión agitada se centrifugó (10.000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente) con la centrifugadora descrita anteriormente fabricada por TOMY SEIKO Co., Ltd., un sobrenadante se descartó, de modo que se obtuvieron gránulos de lavado con SDS (precipitado).

15 < Purificación de Proteína >

20 Los gránulos de lavado con SDS se suspendieron en cada disolvente mostrado en la Tabla 6 que sigue a continuación de modo que la concentración de los gránulos de lavado con SDS se convirtió en 100 mg/ml, y la suspensión se sometió a tratamiento térmico a 80 °C durante una hora. A partir de ese momento, la suspensión después del tratamiento térmico se centrifugó (11000 x g, 5 minutos) con la centrifugadora descrita anteriormente fabricada por TOMY SEIKO Co., Ltd., y un sobrenadante se recogió. La concentración de la proteína en el sobrenadante se midió con un método BCA. De forma adicional, para la medición de la proteína con el método BCA, (nombre comercial), se usó el Kit de Ensayo de Proteína BCA fabricado por TA_K_AR_A_BIO INC..

25 (Ejemplo 10)

La proteína ADF4Kai se purificó de la misma manera que en el Ejemplo 9, excepto porque se usó la *Escherichia coli* que expresa la proteína ADF4Kai en lugar de la *Escherichia coli* que expresa la proteína ADF3Kai-Large-NRSH1.

30 Las proteínas obtenidas en los Ejemplos 9-10 se sometieron a electroforesis de SDS-PAGE. Sus bandas se comprobaron mediante tinción con Oriole, y las imágenes se analizaron usando un software de análisis Image Lab (Bio-RAD Laboratories, Inc.), para calcular la pureza (grado de purificación) de las proteínas diana. La tabla 6 que sigue a continuación muestra los resultados. De forma adicional, la FIG. 13 muestra el resultado de la electroforesis de SDS-PAGE de la proteína (incluyendo ADF3Kai-Large-NRSH1) obtenida en el Ejemplo 9, y la FIG. 14 muestra el resultado de la electroforesis de SDS-PAGE de la proteína (incluyendo ADF4Kai) obtenida en el Ejemplo 10. Además, la Tabla 6 que sigue a continuación muestran los valores relativos basándose en la pureza de la proteína en el caso del uso de una solución tampón de urea 7,5 M (pH 9,0) como disolvente.

[Tabla 6]

Proteína	ADF3Kai-Large-NRSH1		ADF4Kai	
	Grado de purificación (%)	Índice de pureza	Grado de purificación (%)	Índice de pureza
Solución tampón de urea 7,5 M (pH 9,0)	35,18	1	32,67	1
DMSO (que contiene LiCl 1 M)	44,39	1,26	60,02	1,84
DMSO (que contiene LiCl 2 M)	42,85	1,22	75,55	2,31
DMSO (que contiene LiCl 3 M)	51,53	1,46	76,38	2,34

40 La FIG. 13 muestra los resultados de la electroforesis (SDS-PAGE) usando las soluciones de polipéptido en las que la proteína ADF3Kai-Large-NRSH1 se disolvió en diversos disolventes, y la FIG. 14 muestra los resultados de la electroforesis (SDS-PAGE) usando las soluciones de polipéptido en las que la proteína ADF4Kai se disolvió en diversos disolventes. En las FIGS. 13 y 14, una calle M indica un marcador de peso molecular, y las calles 1-4 indican respectivamente muestras de proteína protein usando una solución tampón de urea 7,5 M (pH 9,0), DMSO (que contiene 1 M LiCl), DMSO (que contiene LiCl 2 M), y DMSO (que contiene LiCl 3 M) como disolventes. Tal como es evidente a partir de las FIGS. 13 y 14, el caso del uso de DMSO con una sal inorgánica como disolvente contenía proteínas menos ínfulas y aumentaba sus su solubilidad en comparación con el caso del uso de la solución tampón de urea 7,5 M (pH 9,0) como disolvente. Además, el grado de purificación mejoraba con un aumento de la concentración de la sal inorgánica en el disolvente.

Aplicabilidad Industrial

5 La solución de polipéptido de la presente invención se puede usar como una solución de hilado y para purificación de polipéptidos. Además, las fibras de polipéptido artificial producidas usando la solución de polipéptido de la presente invención como una solución de hilado se pueden usar de forma adecuada como fibras de refuerzo de resina y metal, materiales compuestos, y para moldeado mediante inyección, etc. Los usos se pueden aplicar a miembros del dispositivo de transporte tales como vehículos, fibras de refuerzo de neumáticos, etc. Además, las fibras de polipéptido artificial de la presente invención se pueden aplicar la hebras quirúrgicas, mascarillas, filtros, materiales para cobertura de heridas, láminas de medicina regenerativa, bioláminas, etc. Se pueden presentar en forma de tejidos entrelazados, tejidos de punto, tejidos trenzados, tejidos preparados sin tejer, etc.

Descripción de Números de Referencia

- 15 1, 31, 61, 81 extrusora
- 2, 30, 62, 80 dispositivo de producción de hilo sin estirar
- 3, 40 dispositivo de estiramiento con calor húmedo (dispositivo de primera etapa de estiramiento)
- 4, 50, 63, 90 dispositivo de estiramiento con calor seco (dispositivo de segunda etapa de estiramiento)
- 5, 39, 44, 64, 86, 92 rollo de hilo
- 20 6, 32, 66, 82 solución de hilado
- 7 tanque de almacenamiento
- 8 bomba de engranaje
- 9, 69, 83 hilera
- 10, 60 dispositivo de hilado-estiramiento
- 11, 35, 71, 85 líquido de coagulación
- 25 36 hilo no estirado
- 12, 38 agua caliente
- 13, 15, 41, 45 rodillo de prensa de suministro
- 14, 16, 42, 46 rodillo de prensa de entrada
- 17, 43, 77, 89 dispositivo de estiramiento con calor seco
- 30 18a-18f guía de hilo
- 19, 73 espacio libre
- 20, 34, 72, 84 baño de líquido de coagulación
- 21, 37 baño de estiramiento
- 22, 47, 78, 91 guía

A continuación Listado de Secuencias Libre

- 40 Secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 1-6, 8, 15, 17, 19
- Secuencias de bases de SEQ ID NOS: 7, 9, 10, 16, 18, 20
- Secuencias de cebador SEQ ID NOS: 11-14

LISTADO DE SECUENCIAS

- 45 <110> Spiber Inc.
- <120> SOLUCIÓN DE POLIPÉPTIDO, MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE FIBRA SINTÉTICA DE POLIPÉPTIDO, Y MÉTODO DE PURIFICACIÓN DE POLIPÉPTIDO
- 50 <130> H4038
- <150> JP2011-241486
- <151> 02-11-2011
- 55 <160> 20
- <170> PatentIn versión 3.3
- 60 <210> 1
- <211> 50
- <212> PRT
- <213> *Araneus diadematus*
- <400> 1

ES 2 653 253 T3

Ser Gly Cys Asp Val Leu Val Gln Ala Leu Leu Glu Val Val Ser Ala
1 5 10 15

Leu Val Ser Ile Leu Gly Ser Ser Ser Ile Gly Gln Ile Asn Tyr Gly
20 25 30

Ala Ser Ala Gln Tyr Thr Gln Met Val Gly Gln Ser Val Ala Gln Ala
35 40 45

Leu Ala
50

5
<210> 2
<211> 30
<212> PRT
<213> *Araneus diadematus*

<400> 2

Ser Gly Cys Asp Val Leu Val Gln Ala Leu Leu Glu Val Val Ser Ala
1 5 10 15

Leu Val Ser Ile Leu Gly Ser Ser Ser Ile Gly Gln Ile Asn
20 25 30

10
15
<210> 3
<211> 21
<212> PRT
<213> *Araneus diadematus*

<400> 3

Ser Gly Cys Asp Val Leu Val Gln Ala Leu Leu Glu Val Val Ser Ala
1 5 10 15

Leu Val Ser Ile Leu
20

20
25
30
<210> 4
<211> 1183
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína de seda de araña recombinante ADF3Kai-Large

<400> 4

ES 2 653 253 T3

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

ES 2 653 253 T3

Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gly Pro Gly Gln Gln
 195 200 205

Gly Pro Gly Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala
 210 215 220

Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly
 225 230 235 240

Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly Pro Tyr Gly
 245 250 255

Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly
 260 265 270

Tyr Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly Pro
 275 280 285

Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ser Ala Ala Ser Gly Gly Tyr Gly
 290 295 300

Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln
 305 310 315 320

Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly
 325 330 335

Tyr Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly
 340 345 350

Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly Pro Tyr Gly
 355 360 365

Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly
 370 375 380

Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
 385 390 395 400

Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly
 405 410 415

Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly
 420 425 430

Gln Gly Ala Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly

ES 2 653 253 T3

435					440					445					
Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro
450						455					460				
Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly
465					470					475					480
Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly
				485					490					495	
Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly
			500						505				510		
Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro
		515					520					525			
Gly	Gly	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Val	Ser
530						535					540				
Val	Ser	Arg	Ala	Arg	Ala	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln
545					550						555				560
Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	Pro	Gly
				565						570				575	
Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly
			580					585					590		
Gln	Gln	Gly	Pro	Ser	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gly
		595					600					605			
Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly
610						615						620			
Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro
625					630					635					640
Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Asn	Gly
				645						650				655	
Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Ala	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln
			660					665					670		
Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Tyr	Gly	Pro
		675					680					685			

ES 2 653 253 T3

Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly
 690 695 700
 Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr
 705 710 715 720
 Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln
 725 730 735
 Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly
 740 745 750
 Tyr Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly
 755 760 765
 Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala
 770 775 780
 Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Tyr Gly Gln Gln Gly
 785 790 795 800
 Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala
 805 810 815
 Ser Ala Ala Ser Ala Ala Ser Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gly Gln
 820 825 830
 Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro
 835 840 845
 Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser
 850 855 860
 Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly
 865 870 875 880
 Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala
 885 890 895
 Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly
 900 905 910
 Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
 915 920 925
 Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly
 930 935 940

ES 2 653 253 T3

Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly Ala Tyr Gly
945 950 955 960

Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly
965 970 975

Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
980 985 990

Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly
995 1000 1005

Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser
1010 1015 1020

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gly Gln
1025 1030 1035

Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly
1040 1045 1050

Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ala Ser Ala Ala Val Ser Val
1055 1060 1065

Gly Gly Tyr Gly Pro Gln Ser Ser Ser Val Pro Val Ala Ser Ala
1070 1075 1080

Val Ala Ser Arg Leu Ser Ser Pro Ala Ala Ser Ser Arg Val Ser
1085 1090 1095

Ser Ala Val Ser Ser Leu Val Ser Ser Gly Pro Thr Lys His Ala
1100 1105 1110

Ala Leu Ser Asn Thr Ile Ser Ser Val Val Ser Gln Val Ser Ala
1115 1120 1125

Ser Asn Pro Gly Leu Ser Gly Cys Asp Val Leu Val Gln Ala Leu
1130 1135 1140

Leu Glu Val Val Ser Ala Leu Val Ser Ile Leu Gly Ser Ser Ser
1145 1150 1155

Ile Gly Gln Ile Asn Tyr Gly Ala Ser Ala Gln Tyr Thr Gln Met
1160 1165 1170

Val Gly Gln Ser Val Ala Gln Ala Leu Ala
1175 1180

ES 2 653 253 T3

<210> 5
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> etiqueta de His y codón de inicio

<400> 5

10

Met His Ser Ser Gly Ser Ser
 1 5 10 15

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
 20

<210> 6
 <211> 660
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> proteína de seda de araña recombinante ADF3Kai

20

<400> 6

Met His Ser Ser Gly Ser Ser
 1 5 10 15

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Ala Arg Ala Gly Ser Gly Gln Gln
 20 25 30

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly
 35 40 45

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

Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Ser Gln Gln Gly Pro Gly Gln
 65 70 75 80

Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala
 85 90 95

Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro
 100 105 110

Gly Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala
 115 120 125

Ala Gly Gly Asn Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Ala Gly Gln Gln

ES 2 653 253 T3

130		135		140												
Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala						
145					150					155						160
Gly	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	
				165					170					175		
Pro	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
			180					185					190			
Ala	Ala	Gly	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	
		195					200					205				
Gly	Pro	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	
	210						215				220					
Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	
225					230					235					240	
Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	
				245					250					255		
Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	
			260						265				270			
Tyr	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro	
		275					280					285				
Tyr	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Tyr	Gly	
	290					295					300					
Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gly	Gln	
305					310						315				320	
Gly	Pro	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	
				325					330					335		
Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	
			340					345					350			
Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	
		355					360					365				
Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	
	370						375					380				

ES 2 653 253 T3

Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
385 390 395 400

Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly
405 410 415

Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly
420 425 430

Gln Gly Ala Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly
435 440 445

Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
450 455 460

Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly
465 470 475 480

Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly
485 490 495

Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly
500 505 510

Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
515 520 525

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

Val Gly Gly Tyr Gly Pro Gln Ser Ser Ser Val Pro Val Ala Ser Ala
545 550 555 560

Val Ala Ser Arg Leu Ser Ser Pro Ala Ala Ser Ser Arg Val Ser Ser
565 570 575

Ala Val Ser Ser Leu Val Ser Ser Gly Pro Thr Lys His Ala Ala Leu
580 585 590

Ser Asn Thr Ile Ser Ser Val Val Ser Gln Val Ser Ala Ser Asn Pro
595 600 605

Gly Leu Ser Gly Cys Asp Val Leu Val Gln Ala Leu Leu Glu Val Val
610 615 620

Ser Ala Leu Val Ser Ile Leu Gly Ser Ser Ser Ile Gly Gln Ile Asn
625 630 635 640

ES 2 653 253 T3

Tyr Gly Ala Ser Ala Gln Tyr Thr Gln Met Val Gly Gln Ser Val Ala
645 650 655

Gln Ala Leu Ala
660

- 5 <210> 7
- <211> 1983
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> ADN recombinante de gen de proteína de seda de araña ADF3Kai

- <400> 7

ES 2 653 253 T3

atgcatcacc	atcatcatca	tcaccaccac	cattcctcgg	gctcatcctt	ggaagtgtta	60
tttcaaggac	cagcacgagc	cggttcggga	caacaagggc	ctggccagca	gggccaggt	120
caacaagggc	caggacagca	gggtccttat	gggcccggcg	caagcgcagc	agctgcggcc	180
gctggtggct	atggtcctgg	ctccggtcaa	cagggcctt	cgcaacaagg	tcccgggcag	240
caaggtcctg	gtggccaggg	tccttacggg	ccgggggcga	gtgcggcagc	agccgctgca	300
ggcggttatg	gtccaggaag	cggacagcaa	ggtccgggag	gtcaaggtcc	gtatggocca	360
ggctctagcg	cggtcgcgc	tgccgcgggt	ggcaacggac	cagggagcgg	acaacagggc	420
gcgggacaac	agggtcagc	acagcaaggc	ccaggggcgt	cgccggctgc	agcggcggcc	480
ggaggctatg	gacccggctc	aggacaacag	ggaccgggtc	aacaaggacc	cggtggccaa	540
ggccctatg	gcccgggcgc	cagcgcggcc	gcagccgcg	cgggcgggta	cgccccggt	600
agcggccagg	gaccaggtca	gcaggggcca	ggaggtcagg	gcccatacgg	tccgggcgca	660
tccgcggcgg	cggcagcggc	aggtggctac	ggtcccggaa	gcggccaaca	ggggccaggg	720
caacaaggac	caggacaaca	aggtcctggg	ggccaaggac	cgtatggacc	aggagcatca	780
gctgcagccg	cggcagctgg	cggttacggg	ccaggctacg	gccagcaggg	tccgggtcag	840
cagggaccgg	gagggcaggg	gccttatggc	cctggcgctt	ccgcagccag	tgccgcttct	900
ggaggatacg	ggccgggaag	cggtcagcaa	ggccctggcc	aacaaggacc	tggaggccaa	960
gggccctacg	gcccaggagc	ctcggcagcc	gcagctgccg	caggtgggta	tgggocaggt	1020
agcgggcaac	aagggccggg	tcagcaagga	ccggggcaac	agggacctgg	gcagcaagga	1080
cccgggggtc	aaggcccgtc	cggacctggt	gcgtctgcag	ctgctgctgc	ggctggtgga	1140
tatggtccgg	gatcggggca	gcagggccc	ggtcagcagg	gccctggtca	gcaagggcca	1200
ggccaacagg	gacccggaca	acaaggcccg	ggtcaacagg	gtcctggaca	gcaggggccc	1260
ggccaacaag	gcctggggca	acagggctcg	gggggacagg	gggcctatgg	gcctggcgca	1320
tctgccgcgg	ctggcgcagc	cggtgggtac	gggcctgggt	caggtcaaca	ggggcctggt	1380

ES 2 653 253 T3

```

caacaaggcc cggggcaaca gggccccggc cagcaaggtc cagggcagca gggccccgga 1440
cagcaagggc ctggacaaca gggggccgga cagcaggac cttacgggcc cggtgcgagc 1500
gcagcggccg ccgccgcagg gggatatggc cccggatcgg gccagcaggg accaggccag 1560
caaggacctg gccaacaggg cccggggggg caggggccgt atggtccgg cgctgcaagt 1620
gctgcagtgt ccggtggagg ttacggccct cagtcttcgt ctgttccggg ggcgtccgca 1680
gttgcgagta gactgtcttc acctgctgct tcatcgcgag tatcgagcgc tgtttcgtct 1740
cttgtctcgt cgggtccac gaaacatgcc gccctttcaa atacgatttc atctgtagtg 1800
tcccaagtta gtgcaagtaa cccgggggta tccggatcgc acgttctcgt tcaggcactc 1860
ctagaagtag tatccgcgtt ggtgagcatc ttaggcagct cctcgatagg tcaaataaac 1920
tatggtgctt cagcccagta tacacagatg gtgggacaga gcgtcgcgca ggcattggct 1980
taa 1983

```

5 <210> 8
 <211> 1154
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> proteína de seda de araña recombinante ADF3Kai-Large-NRSH1
 <400> 8

ES 2 653 253 T3

Met His Ser Ser Gly Ser Ser
 1 5 10 15
 Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Ala Arg Ala Gly Ser Gly Gln Gln
 20 25 30
 Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly
 35 40 45
 Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr
 50 55 60
 Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Ser Gln Gln Gly Pro Gly Gln
 65 70 75 80
 Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala
 85 90 95
 Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro
 100 105 110
 Gly Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala

ES 2 653 253 T3

115		120		125															
Ala	Gly	Gly	Asn	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Ala	Gly	Gln	Gln				
130						135					140								
Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala				
145					150					155									160
Gly	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly				
				165					170					175					
Pro	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala				
			180					185						190					
Ala	Ala	Gly	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln				
		195					200					205							
Gly	Pro	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala				
210						215					220								
Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly				
225					230					235									240
Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly				
				245					250					255					
Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly				
			260					265					270						
Tyr	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro				
		275					280						285						
Tyr	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Tyr	Gly				
290						295					300								
Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gly	Gln				
305					310					315									320
Gly	Pro	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Gly	Gly									
				325					330						335				
Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly				
			340					345					350						
Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly				
		355					360					365							

ES 2 653 253 T3

Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly
 370 375 380

Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
 385 390 395 400

Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly
 405 410 415

Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly
 420 425 430

Gln Gly Ala Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly
 435 440 445

Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
 450 455 460

Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly
 465 470 475 480

Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly
 485 490 495

Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly
 500 505 510

Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
 515 520 525

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

Val Ser Arg Ala Arg Ala Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln
 545 550 555 560

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly
 565 570 575

Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gly
 580 585 590

Gln Gln Gly Pro Ser Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly
 595 600 605

Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly
 610 615 620

ES 2 653 253 T3

Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly Pro
 625 630 635 640
 Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Asn Gly
 645 650 655
 Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Ala Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln
 660 665 670
 Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro
 675 680 685
 Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly
 690 695 700
 Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr
 705 710 715 720
 Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln
 725 730 735
 Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly
 740 745 750
 Tyr Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly
 755 760 765
 Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala
 770 775 780
 Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Tyr Gly Gln Gln Gly
 785 790 795 800
 Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala
 805 810 815
 Ser Ala Ala Ser Ala Ala Ser Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gly Gln
 820 825 830
 Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro
 835 840 845
 Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser
 850 855 860
 Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly
 865 870 875 880

ES 2 653 253 T3

Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala
 885 890 895

Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly
 900 905 910

Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
 915 920 925

Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly
 930 935 940

Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Gln Gly Ala Tyr Gly
 945 950 955 960

Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly
 965 970 975

Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
 980 985 990

Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly
 995 1000 1005

Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser
 1010 1015 1020

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gly Gln
 1025 1030 1035

Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly
 1040 1045 1050

Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ala Ser Ala Ala Val Ser Val
 1055 1060 1065

Gly Gly Tyr Gly Pro Gln Ser Ser Ser Val Pro Val Ala Ser Ala
 1070 1075 1080

Val Ala Ser Arg Leu Ser Ser Pro Ala Ala Ser Ser Arg Val Ser
 1085 1090 1095

Ser Ala Val Ser Ser Leu Val Ser Ser Gly Pro Thr Lys His Ala
 1100 1105 1110

Ala Leu Ser Asn Thr Ile Ser Ser Val Val Ser Gln Val Ser Ala

ES 2 653 253 T3

atgcatcacc atcatcatca tcaccaccac cattcctcgg gctcatcctt ggaagtgtta 60
 tttcaaggac cagcacgagc cggttcggga caacaagggc ctggccagca gggcccaggt 120
 caacaagggc caggacagca gggtccttat gggcccggcg caagcgcagc agctgcggcc 180
 gctggtggct atggtcctgg ctccggtaa cagggccctt cgcaacaagg tcccgggcag 240
 caaggtcctg gtggccaggg tccttacggg ccggggggcga gtgcggcagc agccgctgca 300
 ggcggttatg gtccaggaag cggacagcaa ggtccgggag gtcaaggtcc gtatggccca 360
 ggctctagcg cggctgccc tgccgggggt ggcaacggac cagggagcgg acaacagggc 420
 gcgggacaac aggtccagc acagcaaggc ccagggggcgt cggcggctgc agcggcggcc 480
 ggaggctatg gaccgggctc aggacaacag ggaccgggtc aacaaggacc cggaggccaa 540
 ggcccctatg gcccgggcgc cagcgcggcc gcagccgccc cgggcccggta cggccccggt 600
 agcggccagc gaccaggtca gcaggggcca ggaggtcagg gcccatcagg tccgggcccga 660
 tccgcccggc cggcagcggc aggtggctac ggtcccggaa gcggccaaca ggggcccagg 720
 caacaaggac caggacaaca aggtcctggg ggccaaggac cgtatggacc aggagcatca 780
 gctgcagccc cggcagctgg cggttacggt ccaggctacg gccagcaggg tccgggtcag 840
 cagggaccgg gaggccaggg gccttatggc cctggcgtt ccgcagccag tgcgcttct 900
 ggaggatacg ggccgggaag cggtcagcaa ggccctggcc aacaaggacc tggaggccaa 960
 gggcccctac gcccaggagc ctccggcagc gcagctgccc caggtgggta tgggcccaggt 1020
 agcgggcaac aaggccggg tcagcaagga ccggggcaac agggacctgg gcagcaagga 1080
 cccgggggtc aaggcccgtc cggacctggt gcgtctgcag ctgctgctgc ggctggtgga 1140
 tatggtccgg gatcggggca gcagggccc ggtcagcagg gccctggtca gcaagggcca 1200
 ggccaacagg gaccgggaca acaaggccc ggtcaacagg gtccctggaca gcaggggccc 1260
 ggccaacaag gccctgggca acagggctcc gggggacagg gggcctatgg gcctggcgcga 1320

ES 2 653 253 T3

tctgccgccc ctggcgcagc cggcgggtac gggcctgggt caggtcaaca ggggcctgggt 1380
caacaaggcc ccgggcaaca gggccccggc cagcaaggct cagggcagca gggccccgga 1440
cagcaagggc ctggacaaca ggggccccga cagcagggac cttacgggcc cggcgcgagc 1500
gcagcggccc ccgcccagc gggatatggc cccggatcgg gccagcagg accaggccag 1560
caaggacctg gccaacagg ccgggggggt caggggcccgt atggtcccgg cgctgcaagt 1620
gctgcagtgt ccgtttctag agcacgagcc ggttcgggac aacaagggcc tggccagcag 1680
ggcccaggtc aacaagggcc aggacagcag ggtccttatg ggccccggcc aagcgcagca 1740
gctgcggccc ctggtggcta tggcctggc tccggtcaac agggcccttc gcaacaagggt 1800
cccgggcagc aaggctcctg tggccagggt ccctacgggc cgggggcgag tgcggcagca 1860
gccgctgcag gcggttatgg tccaggaagc ggacagcaag gtcccggagg tcaaggctccg 1920
tatggcccag gctctagcgc ggctgccgct gccgcgggtg gcaacggacc agggagcggga 1980
caacagggcg cgggacaaca gggcaccagga cagcaaggcc caggggcgtc ggcggctgca 2040
gcggcggccc gaggtatagg acccggctca ggacaacagg gaccgggtca acaaggaccc 2100
ggtggccaag gccctatagg cccgggcgcc agcgcggccc cagcccggc gggcgggtac 2160
ggccccggta gcggccagg accaggctag caggggcccag gaggtcaggg ccatacgggt 2220
ccggggcgc atccggggc ggacgcggca ggtggctacg gtcccggagg cggccaacag 2280
gggcccaggc aacaaggacc aggacaacaa ggtcctgggg gccaaaggacc gtatggacca 2340
ggagcatcag ctgcagccc gcagcctggc ggttacggtc caggctacgg ccagcagggt 2400
ccgggtcagc agggaccggg aggccagggg ccttatggcc ctggcggctc cgcagccagt 2460
gccgcttctg gaggatacgg gccgggaagc ggtcagcaag gccctggcca acaaggacct 2520
ggaggccaag ggccctacgg cccaggagcc tcggcagccc cagctgccgc aggtgggtat 2580
gggcccaggta gcgggcaaca agggcccgggt cagcaaggac cggggcaaca gggacctggg 2640
cagcaaggac ccgggggtca aggccogtac ggacctgggt cgtctgcagc tgctgctgcg 2700
gctggtggat atggtccggg atcggggcag cagggctccc gtcagcagg ccctggtcag 2760
caagggccag gccaacagg acccggacaa caaggcccgg gtcaacaggg tcctggacag 2820
caggggcccg gccacaagg ccctgggcaa cagggctccc ggggacaggg ggcctatggg 2880
cctggcgc atctgcggc tggcgcagcc ggtgggtacg ggccctgggtc aggtcaacag 2940
ggcctgggtc aacaaggccc cgggcaacag ggccccggcc agcaagggtcc agggcagcag 3000
ggccccggac agcaagggcc tggacaacag gggccccggac agcagggacc ttacgggccc 3060
ggtgcgagcg cagcggcccgc cgcgcaggg ggatatggcc cccgatccgg ccagcaggga 3120
ccaggccagc aaggacctgg ccaacagggc ccggggggtc aggggcccgt tggcctccggc 3180

ES 2 653 253 T3

```
gctgcaagtg ctgcagtgtc cgttggaggt taaggcctc agtattcgtc tgttccggtg 3240
gcgtccgcag ttgcgagtag actgtottca cctgctgctt catcgcgagt atcgagcgt 3300
gtttcgtctc ttgtctcgtc ggggtcccacg aaacatgccg ccctttcaaa tacgatttca 3360
tctgtagtgt cccaagttag tgcaagtaac ccggggttat ccggatgcga cgttctcgtt 3420
caggcactcc tagaagtagt atccgcgttg gtgagcatct taggcagctc ctcgataggt 3480
caaataaact atggtgcttc agcccagtat acacagatgg tgggacagag cgtcgcgcag 3540
gcattggctt aa 3552
```

5 <210> 10
<211> 3465
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> ADN recombinante de gen de proteína de seda de araña ADF3Kai-Large-NRSH1
<400> 10

ES 2 653 253 T3

atgcatcacc	atcatcatca	tcaccaccac	cattcctcgg	gctcatcctt	ggaagtgtta	60
tttcaaggac	cagcacgagc	cggttcggga	caacaagggc	ctggccagca	gggccaggt	120
caacaagggc	caggacagca	gggtccttat	gggcccgggc	caagcgcagc	agctgcggcc	180
gctggtggct	atggtcctgg	ctccggtaa	cagggccctt	cgcaacaagg	tcccgggcag	240
caaggtcctg	gtggccaggg	tcctacggg	ccggggggca	gtgcggcagc	agccgctgca	300
ggcggttatg	gtccaggaag	cggacagcaa	ggtccgggag	gtcaaggtcc	gtatggccca	360
ggctctagcg	cggctgccc	tgccgggggt	ggcaacggac	cagggagcgg	acaacagggc	420
gccccgacaac	agggccaggg	acagcaaggg	ccagggggct	cggcggctgc	agcggcggcc	480
ggaggctatg	gaccgggctc	aggacaacag	ggaccgggctc	aacaaggacc	cggcggccaa	540
ggccccctatg	gccccggggc	cagcgcggcc	gcagccggccg	cggcggggta	cggccccgggt	600
agcggccaggg	gaccaggtca	gcaggggcca	ggaggctcagg	gcccatacgg	tccgggcgca	660
tcccgggcgg	cggcagcggc	aggtggctac	ggtcccggaa	gcggccaaca	ggggccaggg	720
caacaaggac	caggacaaca	aggtcctggg	ggccaaggac	cgtatggacc	aggagcatca	780
gctgcagccg	cggcagctgg	cggttacggg	ccaggctacg	gccagcaggg	tccgggtcag	840
cagggaccgg	gagggcaggg	gccttatggc	cctggcgctt	ccgcagccag	tgccgcttct	900
ggaggatacgg	ggccgggaag	cggctcagcaa	ggccccggcc	aacaaggacc	tggaggccaa	960
gggccctacg	gcccaggagc	ctcggcagcc	gcagctgccg	caggtgggta	tgggccaggt	1020
agcgggcaac	aagggccggg	tcagcaagga	ccggggcaac	agggacctgg	gcagcaagga	1080
ccccggggctc	aaggcccgtta	cggacctggg	gcgtctgcag	ctgctgctgc	ggctggtgga	1140
tatggtccgg	gatcggggca	gcagggctcc	ggtcagcagg	gccctggtca	gcaagggcca	1200

ES 2 653 253 T3

ggccaacagg gacccggaca acaaggcccg ggtcaacagg gtccctggaca gcagggggccg 1260
 ggccaacaag gccctgggca acagggtccg gggggacagg gggcctatgg gcctggcgca 1320
 tctgcogccg ctggcgcagc cgggtgggtac gggcctgggt cagggtcaaca ggggcctgggt 1380
 caacaaggcc ccgggcaaca gggccccggc cagcaaggtc cagggcagca gggcccggga 1440
 cagcaagggc ctggacaaca ggggcccggg cagcagggac cttacgggccc cggtgcgagc 1500
 gcagcggccg ccggccgagc gggatatggc cccggatcgg gccagcaggg accaggccag 1560
 caaggacctg gccaacaggc cccgggggggt cagggggccgt atggtcccgg cgctgcaagt 1620
 gctgcagtgt ccgtttctag agcacgagcc ggttcgggac aacaagggcc tggccagcag 1680
 ggcccaggtc aacaagggcc aggacagcag ggtccttatg ggcccggcgc aagcgcagca 1740
 gctgcggccg ctggtggcta tggctcctggc tccggtcaac agggcccttc gcaacaagggt 1800
 cccgggcagc aaggtcctgg tggccagggt ccctacgggc cgggggcgag tgcggcagca 1860
 gccgctgcag gcggttatgg tccaggaagc ggacagcaag gtccgggagg tcaagggtccg 1920
 tatggcccag gctctagcgc ggctgccgct gccgcgggtg gcaacggacc agggagcggg 1980
 caacagggcg cgggacaaca ggggtccagga cagcaaggcc caggggcgtc gggcggctgca 2040
 gcggcggccg gaggctatgg acccggctca ggacaacagg gaccgggtca acaaggacc 2100
 ggtggccaag gccctatgg cccgggcgccc agcgcggccc cagccgcccgc gggcgggtac 2160
 ggccccggtg gcggccaggg accaggtcag caggggccag gaggtcaggg ccatacgggt 2220
 ccgggcgcat ccgcggcggc ggcagcggca ggtggctacg gtcccgggag cggccaacag 2280
 gggccagggc aacaaggacc aggacaacaa ggtcctgggg gccaaaggacc gtatggacca 2340
 ggagcatcag ctgcagcccgc ggcagctggc ggttacggtc caggctacgg ccagcaggggt 2400
 ccgggtcagc agggaccggg aggccagggg ccttatggcc ctggcgcttc cgcagccagt 2460
 gccgcttctg gaggatacgg gccgggaagc ggtcagcaag gccctggcca acaaggacct 2520
 ggaggccaag ggcctacgg cccaggagcc tcggcagccc cagctgccgc aggtgggtat 2580
 gggccaggtg gcgggcaaca agggcccgggt cagcaaggac cggggcaaca gggaoctggg 2640
 cagcaaggac ccgggggtca aggccctac ggacctgggt cgtctgcagc tgctgctgcg 2700
 gctggtggat atggtccggg atcggggcag cagggtcccg gtcagcaggg ccctggtcag 2760
 caaggggccg gccaacaggg acccgggaca caaggcccgg gtcaacaggg tcctggacag 2820
 caggggcccg gccacaagg ccctgggcaa caggggtccc ggggacaggg ggcctatggg 2880
 cctggcgcag ctgcccccgc tggcgcagcc ggtgggtacg ggcctgggtc aggtcaacag 2940
 gggcctggtc aacaaggccc cgggcaacag gggcccggcc agcaagggtc agggcagcag 3000
 ggcccgggac agcaagggcc tggacaacag gggcccggac agcagggacc ttacggggccc 3060

ES 2 653 253 T3

```

ggtgcgagcg cagcggccgc cgccgcaggg ggatatggcc ccggatcggg ccagcagggg 3120
ccaggccagc aaggacctgg ccaacagggc ccgggggggtc agggggccgta tgggtcccggc 3180
gctgcaagtg ctgcagtgtc cgttggaggt tacggccctc agtcttcgtc tgttcgggtg 3240
gcgtccgcag ttgcgagtag actgtcttca cctgctgctt catcgcgagt atcgagcgct 3300
gtttcgtctc ttgtctcgtc gggccccacg aaacatgccg ccctttcaaa tacgatttca 3360
tctgtagtgt cccaagttag tgcaagtaac ccggggttat ccggatgcga cgttctcgtt 3420
caggcactcc tagaagtagt atccgcgttg gtgagcatct tataa 3465

```

```

5  <210> 11
    <211> 20
    <212> ADN
    <213> Artificial

    <220>
    <223> cebador promotor T7

10  <400> 11
    taatacgact cactataggg          20

    <210> 12
    <211> 27
    <212> ADN
    <213> Artificial

    <220>
    <223> cebador Rep Xba I

    <400> 12
    tctagaaacg gacactgcag cacttg          27

25  <210> 13
    <211> 19
    <212> ADN
    <213> Artificial

30  <220>
    <223> cebador terminador T7

    <400> 13
    gctagtatt gctcagcg          19

35  <210> 14
    <211> 28
    <212> ADN
    <213> Artificial

40  <220>
    <223> cebador Xba I Rep

    <400> 14
    tctagagcac gagccggttc gggacaac          28

50  <210> 15
    <211> 434
    <212> PRT
    <213> Artificial

```

ES 2 653 253 T3

<220>

<223> Proteína de seda de araña recombinante ADF4Kai

<400> 15

5

```

Met His Ser Ser Gly Ser Ser
 1                    5                                10                    15

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Ala Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala
 20                    25                                30

Ala Ala Ala Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Gly Pro Glu Asn Gln Gly Pro
 35                    40                                45

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

Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Glu Asn
 65                    70                                75                                80

Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Ser Gly Ser
 85                    90                                95

Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly
 100                    105                                110

Pro Gly Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Gly Ser Gly Gly Tyr Gly
 115                    120                                125

Pro Gly Ser Gln Gly Ala Ser Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ala Ser Ala
 130                    135                                140

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly
 145                    150                                155                                160

Pro Gly Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Ala Tyr Gly Pro Gly Gly
 165                    170                                175

Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly
 180                    185                                190

Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Val Tyr Gly
 195                    200                                205

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

```

ES 2 653 253 T3

210 215 220

Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Glu Asn Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly
 225 230 235 240

Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 245 250 255

Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gln Gly Pro Ser
 260 265 270

Gly Pro Gly Gly Ser Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gln Gly Gly Ser
 275 280 285

Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro
 290 295 300

Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Tyr Gln
 305 310 315 320

Gly Pro Ser Gly Pro Gly Ala Tyr Gly Pro Ser Pro Ser Ala Ser Ala
 325 330 335

Ser Val Ala Ala Ser Val Tyr Leu Arg Leu Gln Pro Arg Leu Glu Val
 340 345 350

Ser Ser Ala Val Ser Ser Leu Val Ser Ser Gly Pro Thr Asn Gly Ala
 355 360 365

Ala Val Ser Gly Ala Leu Asn Ser Leu Val Ser Gln Ile Ser Ala Ser
 370 375 380

Asn Pro Gly Leu Ser Gly Cys Asp Ala Leu Val Gln Ala Leu Leu Glu
 385 390 395 400

Leu Val Ser Ala Leu Val Ala Ile Leu Ser Ser Ala Ser Ile Gly Gln
 405 410 415

Val Asn Val Ser Ser Val Ser Gln Ser Thr Gln Met Ile Ser Gln Ala
 420 425 430

Leu Ser

<210> 16
 <211> 1305
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 653 253 T3

<220>

<223> ADN recombinante de gen de proteína de seda de araña ADF4Kai

<400> 16

5

```

atgcaccatc atcatcacca tcaccaccat catagcagtg gatcttcott ggaagtatta      60
ttccagggtc ctgcggggtc aagcgcagct gctgcggtctg ctgctagtgg cagcgggggt      120
tatgggtcccg aaaatcaggg gccgtctgga cctgtggcat acggaccggg tgggccagtg      180
tccagtgccg cagctgccgc cgcagcaggc tcaggaccgg gaggctatgg gccagaaaat      240
caagggccga gcgggccagg gggatatggt cctgggggta gcggatcaag cgcggctgca      300
gctgccggcg ctgctagcgg tccggggcgg taaggcccg gctctcaggg tcogagcggc      360
cctggcgggg gtggtggtta tggccccggt tccaagggtg catctggtcc aggtggtccg      420
ggtgctagcg cagcggccgc ggcggctgcc gcggccgcaa gtggccctgg aggatatggc      480
cctgggtccc agggaccatc aggtcccggg gcgtatggac cgggcggccc cgggaagcagc      540
gccgcagccg ctgccgcagc ggcttcagga ccaggaggtt acggcccagg cagtcaaggt      600
ccttcaggcc cgggtgttta cgggtccaggc ggccccggta gtagtgctgc agcggcggcc      660
gcagctggtt cgggacctgg tgggtatgga cctgaaaacc aaggccatc ggggocctgt      720
ggctatggcc cgggcggtag tggatctagt gctgccgctg ccgctgctgc agccagcggg      780
cccggggggt acgggcctgg tagccaggga ccgtctgggc caggtggcag tggagggtat      840
ggcccaggta gtcaggggtg ttccggccca ggtgcgagcg ctgcggcggc ggcagcagca      900
gcaagcggac ctgggggcta tgggtccaggg tcacagggcc cctcagggtcc aggatatcag      960
ggcccgtcag ggocctgggg ctatggacca agtccatctg ctagtgcctc tgtggcggcc     1020
tccgtgtatc ttogoctcca accccgttta gaggtaagtt ctgccgtttc ctctttggtg     1080
tcgagtggcc cgaccaacgg ggcagcagtg agcggcgcac tcaatagtct ggtttctcaa     1140
atatcagcat ctaaccgggg tctgtctggt tgcgatgcgt tggttcaggc actgttagaa     1200
cttgtgtccg cgcttgtggc gattctttct agcgcgtcga ttggtaaggt gaatgtaagt     1260
agcgtgtctc agagcaccca gatgatctca caggcgtgtg cttaa                          1305

```

<210> 17

<211> 355

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Proteína de seda de araña recombinante MaSp2_N

<400> 17

15

```

Met His His His His His His Ser Ser Gly Ser Ser Leu Glu Val Leu
 1           5           10           15

```

ES 2 653 253 T3

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

ES 2 653 253 T3

Ala Val Ser Asn Leu Val Ser Ser Gly Pro Thr Ser Ser Ala Ala Leu
 275 280 285

Ser Ser Val Ile Ser Asn Ala Val Ser Gln Ile Gly Ala Ser Asn Pro
 290 295 300

Gly Leu Ser Gly Cys Asp Val Leu Ile Gln Ala Leu Leu Glu Ile Val
 305 310 315 320

Ser Ala Cys Val Thr Ile Leu Ser Ser Ser Ile Gly Gln Val Asn
 325 330 335

Tyr Gly Ala Ala Ser Gln Phe Ala Gln Val Val Gly Gln Ser Val Leu
 340 345 350

Ser Ala Phe
 355

<210> 18
 <211> 1068
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN recombinante de gen de proteína de seda de araña MaSp2_N

<400> 18

atgcatcacc atcatcatca ttcttcaggc tctctgctcg aagttctctt tcaaggaccg 60
 gcgagagcag gacctggcgg ctatcgtcct ggacaacaag gcccagtggt cccgggaagc 120
 gctgcggggg cggcagctgc agcggcaggt cccggaggct atggccccgg acaacagggg 180
 ccgggtgggt atgggcccgg acagcaaggc cctagcgggtg caggtagcgc ggcggccgca 240
 gcagcggcgg gtccccgtca acagggctta gggggctacg gacctggtca gcagggcccc 300
 ggtgggtatg gaccaggcca acaagggccg ggcggatacg gtccgggttc agctagcggc 360
 gcggcagcgg ctgccggacc agggcagcag gggccggggg ggtatggtcc tgggcaacaa 420
 ggaccaagcg ggccaggag cgcgagtga gcccgggccg ctgcaggccc aggtggctac 480
 gggcctggcc agcaaggtcc aggcggttac gcacccgggc aacagggtcc tagtgggcca 540
 ggaagtgcgg ctgcggcagc agcagctgcg agggcgggcc caggggggta cggcccagca 600
 cagcagggtc cgagcgggtc tggattgcc gcaagcgcag ctcccgctgg ccctggaggg 660
 tacggtccag ctgagcaagg gccggctgga tatggctcag gttctgccgt ggctgcctca 720
 gctggtgcgg gatcagcggg ttatggacct ggctcacagg caagtgctgc agcctcgcgt 780
 cttgcatccc ctgattcagg tgcacgcggt gccagtgccg tctcaaacct cgtgtcaagt 840

ES 2 653 253 T3

```

ggccccactt cgtcggctgc tttgtctagt gttatttcaa atgcogttag ccagatcggg      900
gcctcgaacc caggcttata tggttgtgat gtcottatto aagcactggt agagattggt      960
tctgcttggt tcacgatcct atcctcatcg tctatcgggc aggtcaatta tggtgccgcg     1020
tcgcagttcg cccaagttgt gggccaagc gttttgtcgg cgttttaa                       1068

```

<210> 19
 <211> 559
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Proteína de seda de araña recombinante Flag_92_short2

10

<400> 19

```

Met His Ser Ser Gly Ser Ser
 1                    5                                10                15

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Gly Ala Gly Gly Ser Gly Pro Gly
 20                25                                30

Gly Ala Gly Pro Gly Gly Val Gly Pro Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gly
 35                40                                45

Val Gly Pro Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gly Val Gly Pro Gly Gly Ser
 50                55                                60

Gly Pro Gly Gly Val Gly Pro Gly Gly Ala Gly Gly Pro Tyr Gly Pro
 65                70                                75                80

Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Pro Gly Gly
 85                90                                95

Ala Tyr Gly Pro Gly Gly Ser Tyr Gly Pro Gly Gly Ser Gly Gly Pro
 100               105                                110

Gly Gly Ala Gly Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gly Glu Gly Pro Gly Gly
 115               120                                125

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

Gly Gly Ala Gly Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gly Glu Gly Gly Pro Tyr
 145               150                                155                160

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

```

ES 2 653 253 T3

Pro Gly Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gly Glu Gly Pro Gly Gly Ala Gly
 180 185 190

Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gly Val Gly Pro Gly Gly Gly Gly Pro Gly
 195 200 205

Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Gly
 210 215 220

Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gly Tyr
 225 230 235 240

Gly Pro Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Ser Gly
 245 250 255

Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gly Ser Gly Pro
 260 265 270

Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gly Ser Gly Pro Gly
 275 280 285

Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Gly
 290 295 300

Ser Gly Pro Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Ser
 305 310 315 320

Gly Pro Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Ser Gly
 325 330 335

Pro Gly Gly Phe Gly Pro Gly Gly Phe Gly Pro Gly Gly Ser Gly Pro
 340 345 350

Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gly Ala Gly Pro Gly
 355 360 365

Gly Val Gly Pro Gly Gly Phe Gly Pro Gly Gly Ala Gly Pro Gly Gly
 370 375 380

Ala Gly Pro Gly Gly Ala Gly Pro Gly Gly Ala Gly Pro Gly Gly Ala
 385 390 395 400

Gly Pro Gly Gly Ala Gly Pro Gly Gly Ala Gly Pro Gly Gly Ala Gly
 405 410 415

Pro Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ser
 420 425 430

ES 2 653 253 T3

Gly Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Thr Thr Ile Ile Glu Asp Leu Asp
 435 440 445

Ile Thr Ile Asp Gly Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Ser Glu Glu Leu
 450 455 460

Thr Ile Ser Ala Tyr Tyr Pro Ser Ser Arg Val Pro Asp Met Val Asn
 465 470 475 480

Gly Ile Met Ser Ala Met Gln Gly Ser Gly Phe Asn Tyr Gln Met Phe
 485 490 495

Gly Asn Met Leu Ser Gln Tyr Ser Ser Gly Ser Gly Thr Cys Asn Pro
 500 505 510

Asn Asn Val Asn Val Leu Met Asp Ala Leu Leu Ala Ala Leu His Cys
 515 520 525

Leu Ser Asn His Gly Ser Ser Ser Phe Ala Pro Ser Pro Thr Pro Ala
 530 535 540

Ala Met Ser Ala Tyr Ser Asn Ser Val Gly Arg Met Phe Ala Tyr
 545 550 555

<210> 20
 <211> 1680
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ADN recombinante de gen de proteína de seda de araña Flag_92_short2

10

<400> 20

ES 2 653 253 T3

atgcatcacc atcatcatca tcaccaccac cattcctcgg gctcatcctt ggaagtgtta 60
tttcaaggac caggagctgg agggtcocgt cggggcggcg ctggtcocggg aggagtgggt 120
ccgggtgggt ctggaccocg tggagttagt cggggcgggt ccggtcocggg aggcgtcggg 180
cctggtggat caggacctgg aggtgtaggt octggtggcg cgggtggccc ttacggccct 240
gggggctctg gcccaggagg cgctggtggg gcaggagggc ctggtggggc gtatggtccc 300
gggggttcat acggcccagg gggttcagga ggtccaggag gtgcaggggg accatacggg 360
ccgggcggtg agggaccagg gggcgtggc ggacctatg gacctggcgg agctggaggt 420
ccctacgggc caggcggggc tggaggaccg tatggaccgg gtggagaagg tggtcogtac 480
ggcccggggc ggtcttacgg accagggtggc gcaggaggtc cttatggccc ggggtggacca 540
tacggtccag gcggagaggg tccagggtgg gcagggtggc cttatggccc gggaggagtt 600
ggtccaggcg gcggtggtcc gggcgggtat ggcccgggtg gcgcaggtcc aggcggatat 660

ggaccaggtg gctctggacc cggagggtag gggccgggtg gttcagggcc tggaggttat 720
ggtccgggag gtagtggacc aggaggttat gggcctgggg gttcagggcc aggtggttat 780
ggtccaggag gatcaggctc aggtggaagt ggtccagggg gttatggccc tgggtgtagc 840
ggcccagggt gcagtggacc gggaggatat ggcccaggag gttcaggtcc cgggtggatac 900
ggaccgggtg gatctggacc aggcggttct ggtccgggag gttacggtcc tgggggtagt 960
ggtcccggag gtagtggacc aggtggatat ggaccaggag ggtctggacc cggaggtttt 1020
ggtccaggcg gatttggtcc tgggtggttct gggcctgggt ggtatggtcc tggcggatct 1080
ggtccagggt gggcaggacc tgggtggagtt ggacctgggg gttttggacc cgggtggtgcg 1140
ggaccagggg gtgcaggtcc tgggtggcgt ggtcctggag gcgctgggcc aggcggtgct 1200
ggacctggag gagcaggacc aggtggtgct ggcccgggtg gcgcaggccc tggaggtgct 1260
ggtggagctg gtggtgcagg tggagcaggt ggttcaggag gagctggtgg ttcaggtgga 1320
actactataa tcgaagacct tgatattacg attgatggag cagatggtcc catcactatt 1380
tcggaagaat tgactatttc agcttattat ccatcatcta gagtgcctga tatggttaat 1440
ggaattatgt ctgcaatgca aggaagtgg ttttaattatc aatggtttgg taatatgttg 1500
totcaatata gtagtgggtc tggaacatgt aatccgaata atgtaaatgt tttaatggat 1560
gcgctgtag cggtttaca ttgtcttagt aatcatggat cctcatcatt tgctccgagt 1620
cctactccag cagctatgtc agcctatagc aattctggtg gtagaatggt tgcttattaa 1680

REIVINDICACIONES

1. Una solución de polipéptido en la que un polipéptido obtenido a partir de proteínas de seda de araña natural se disuelve en un disolvente,
 5 en la que el polipéptido es una proteína de seda de araña natural o una proteína de seda de araña recombinante y el disolvente contiene al menos uno seleccionado entre los siguientes (i)-(iii):
- (i) Dimetil sulfóxido;
 (ii) Dimetil sulfóxido con una sal inorgánica; y
 10 (iii) N,N-dimetilformamida con una sal inorgánica; y
- en la que, cuando la solución de polipéptido es de un 100 % en masa, el porcentaje del polipéptido está en un intervalo de un 3 a un 45 % en masa.
- 15 2. La solución de polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en la que, cuando el disolvente es de un 100 % en masa, el porcentaje de la sal inorgánica está en un intervalo de un 0,1 a un 20 % en masa.
3. La solución de polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que, cuando el disolvente es de un 100 % en masa, el porcentaje de la al menos una sustancia seleccionada entre (i)-(iii) mencionada
 20 anteriormente es un 22 % en masa o superior y un 100 % en masa o inferior, y el porcentaje restante contiene alcohol.
4. La solución de polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que, cuando el disolvente es de un 100 % en masa, el porcentaje de la al menos una sustancia seleccionada entre (i)-(iii)
 25 mencionada anteriormente es de un 10 % en masa o superior y un 100 % en masa o inferior, y el porcentaje restante contiene agua.
5. La solución de polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la sal inorgánica es al menos una seleccionada entre haluros de metal alcalino, haluros de metal alcalinotérreo, nitrato de metal
 30 alcalinotérreo y tiocianato.
6. La solución de polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en las que la solución de polipéptido es una solución de fluido de hilado.
- 35 7. Un método para producir una fibra de polipéptido artificial usando la solución de polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende:
- usar la solución de polipéptido como una solución de fluido de hilado; y
 40 extruir la solución de fluido de hilado de una hilera en un líquido de coagulación en un baño de desolvatación para eliminar un disolvente de la solución de fluido de hilado y formar una fibra para preparar un hilo no estirado, obteniendo de ese modo una fibra de polipéptido artificial.
8. El método para producir una fibra de polipéptido artificial de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende
 45 adicionalmente:
- estirar el hilo no estirado.
9. Un método para purificar un polipéptido usando la solución de polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las
 50 reivindicaciones 1 a 5, que comprende:
- someter la solución de polipéptido a tratamiento térmico y a partir de ese momento eliminar una sustancia no disuelta en la misma.
10. El método para purificar un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el polipéptido obtenido a
 55 partir de proteínas de seda de araña natural es insoluble.
11. El método para purificar un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en el que el tratamiento térmico se realiza de 45 a 100 °C.
- 60 12. El método para purificar un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la sustancia no disuelta se elimina mediante separación a través de filtración o centrifugación.

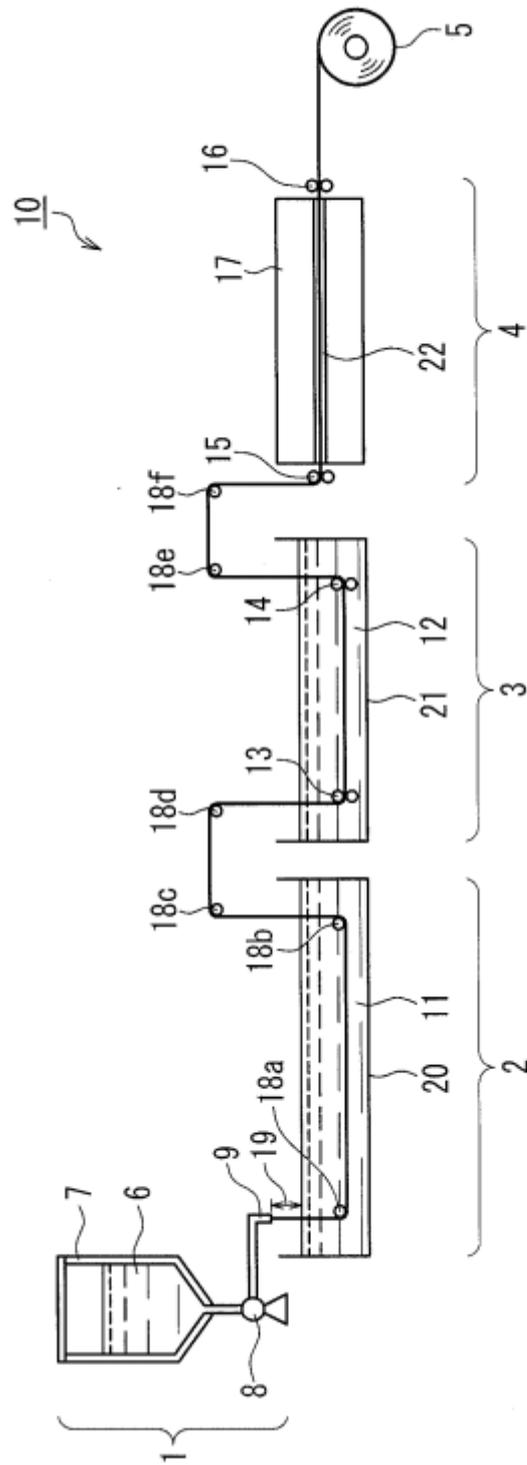


FIG. 1

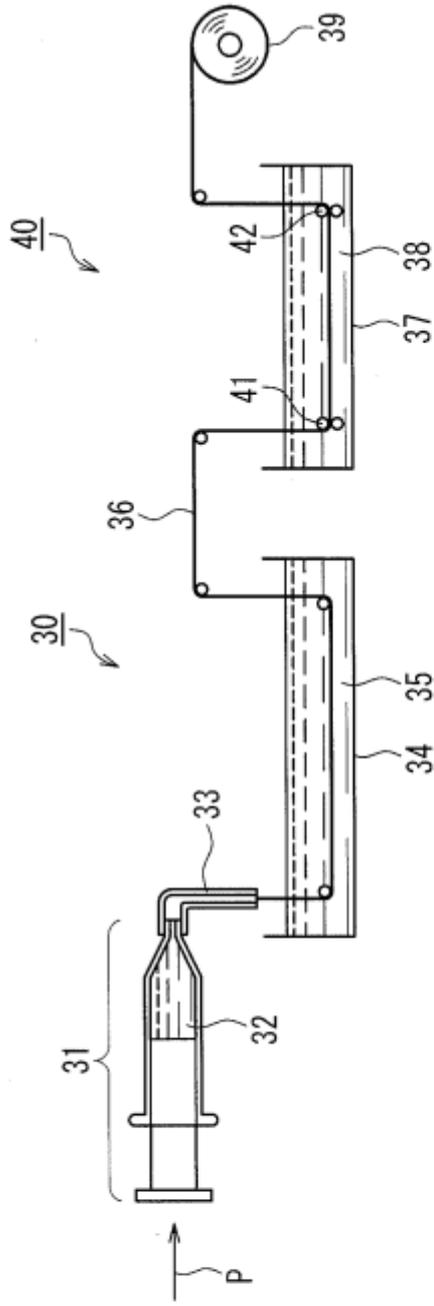


FIG. 2A

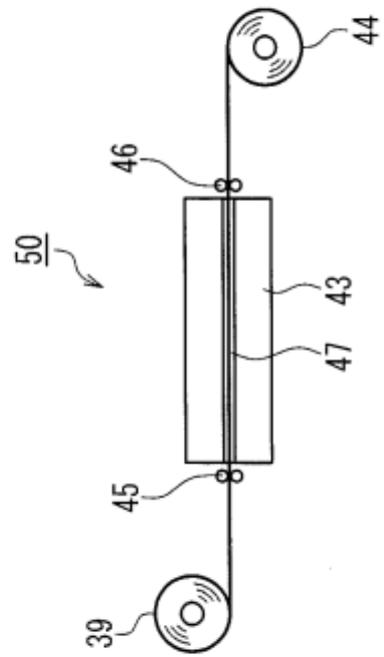


FIG. 2B

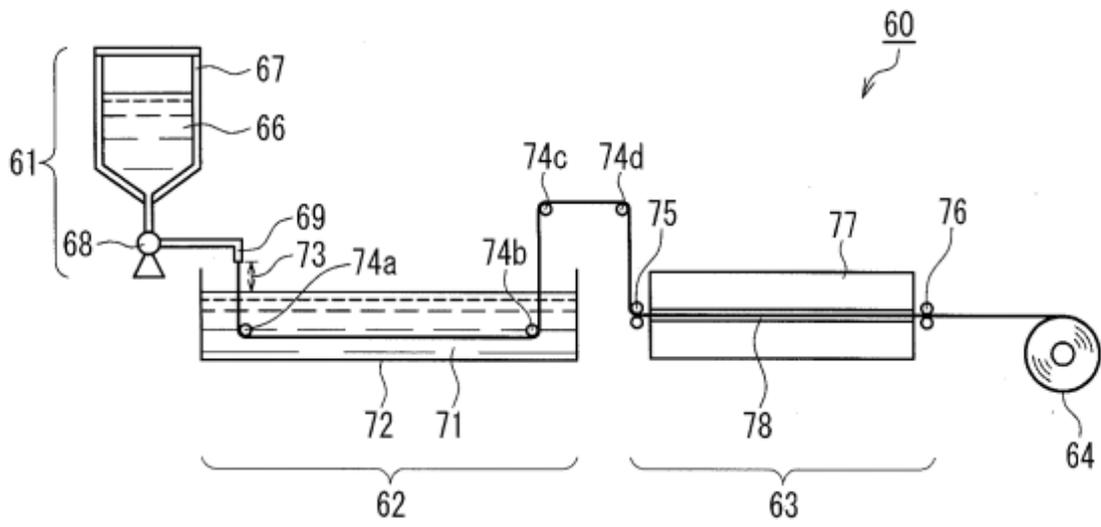


FIG. 3

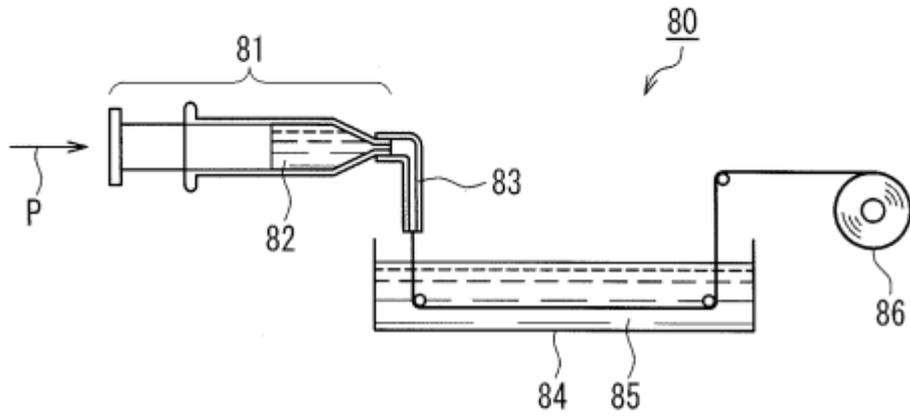


FIG. 4A

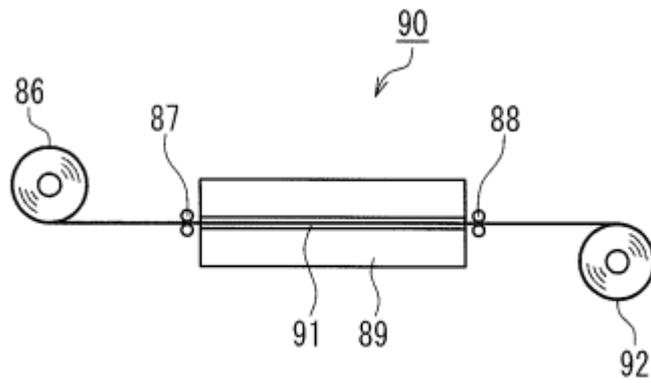


FIG. 4B

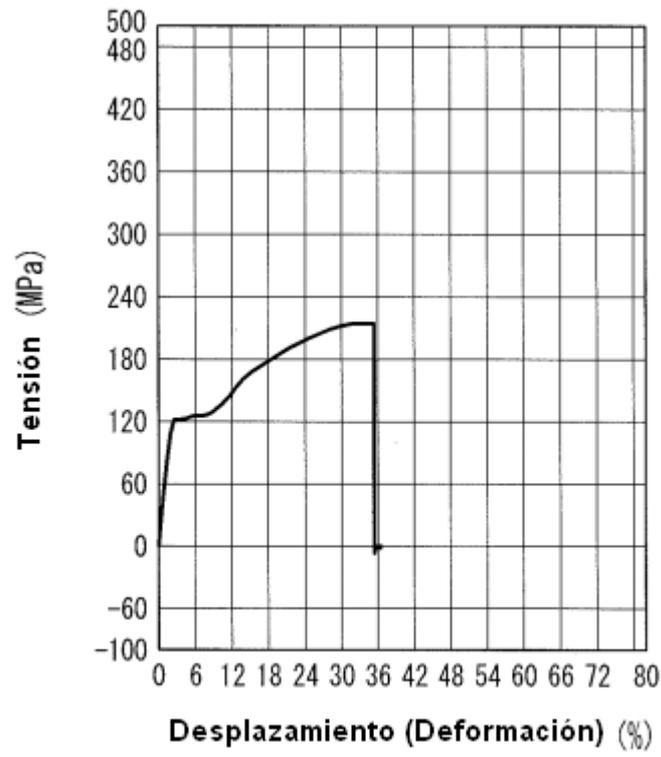


FIG. 5

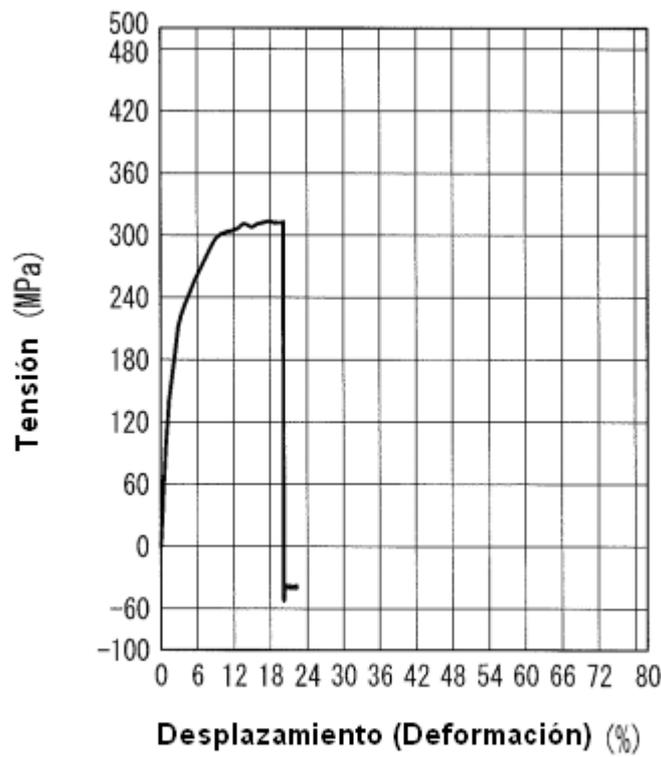


FIG. 6

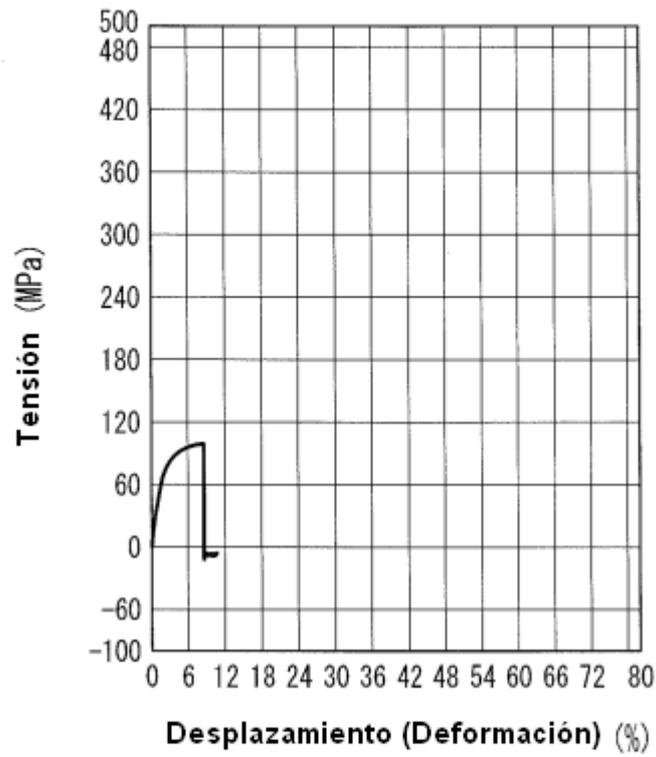


FIG. 7

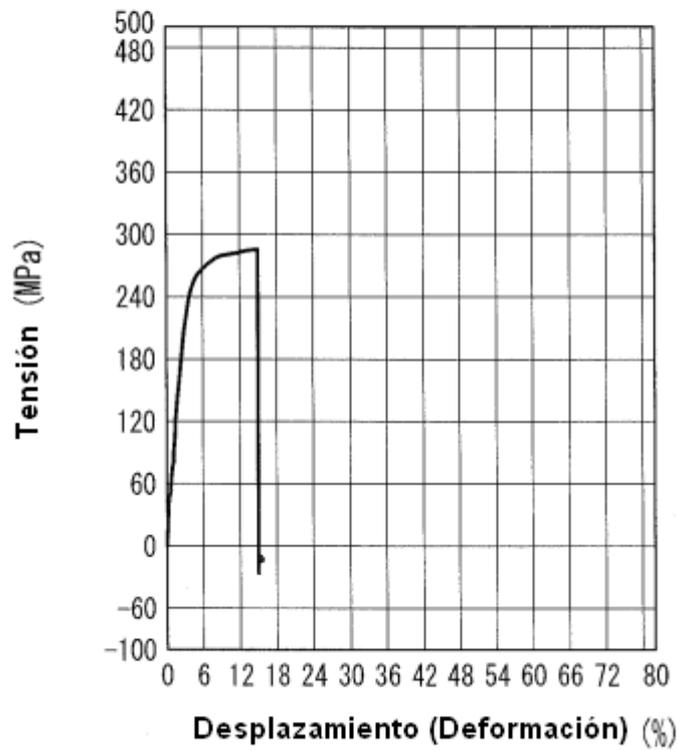


FIG. 8

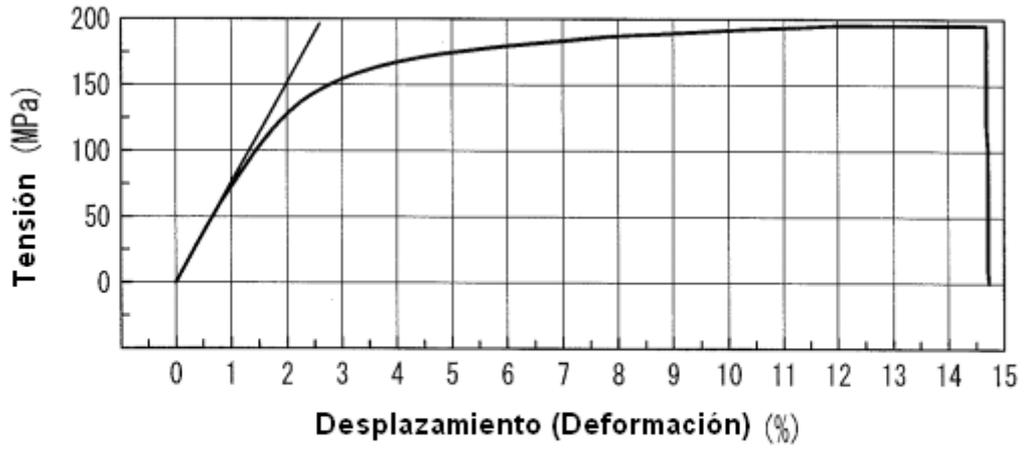


FIG. 9

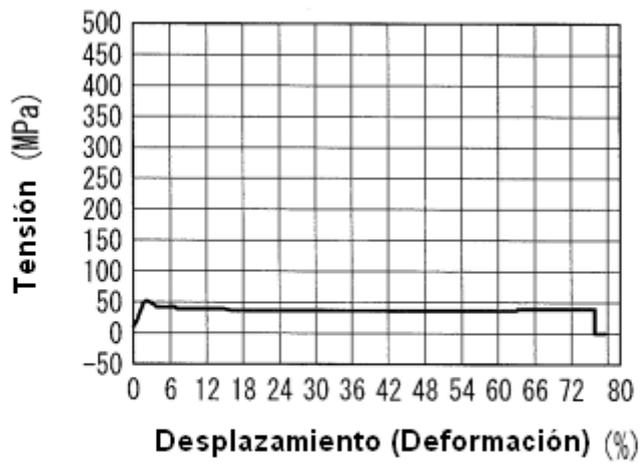


FIG. 10

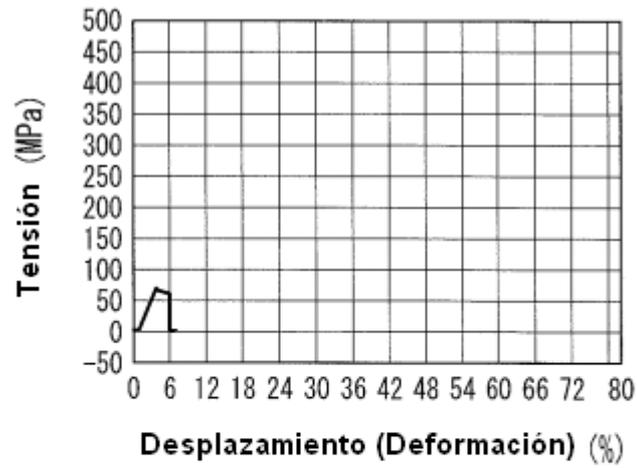


FIG. 11

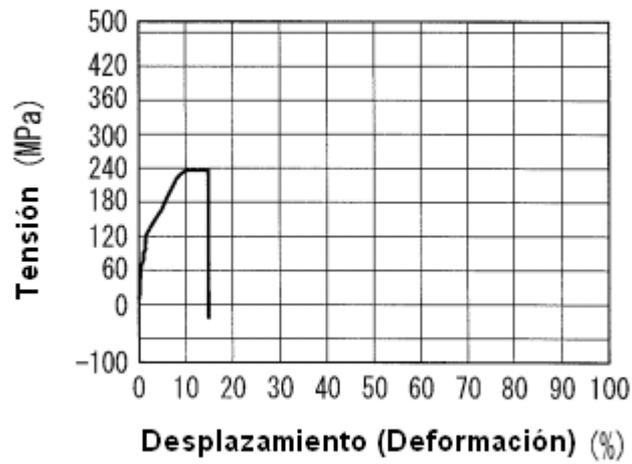


FIG. 12

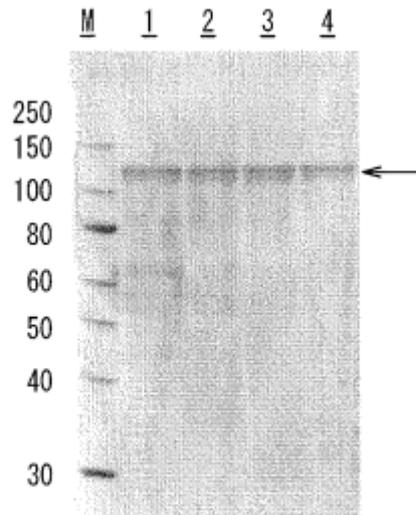


FIG. 13

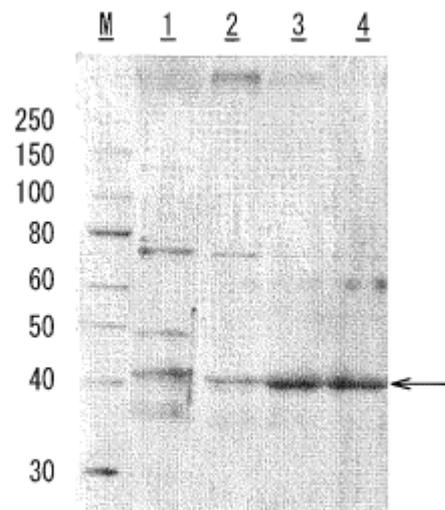


FIG. 14