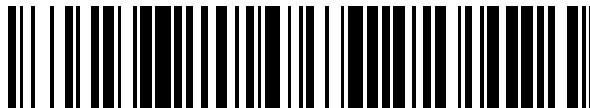


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 365**

51 Int. Cl.:

C07K 1/20 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2013 PCT/EP2013/050169**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.07.2013 WO13102684**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2013 E 13700036 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2800757**

54 Título: **Sistema de etiquetas de afinidad**

30 Prioridad:

06.01.2012 EP 12150412

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

26.09.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COLLEGE DUBLIN (100.0%)
Belfield Innovation Park Belfield
Dublin 4, IE**

72 Inventor/es:

**O'CONNELL, DAVID;
LINSE, SARA SNOGERUP;
THULIN, EVA y
MERINO, ALEJANDRO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 683 365 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

Sistema de etiquetas de afinidad5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un sistema de etiquetas de afinidad para la inmovilización, detección y/o purificación de moléculas. Particularmente, aunque no exclusivamente, la invención se refiere al uso de subdominios de mano EF "EF-hand" de proteínas de unión a calcio, tales como los subdominios EF1 y EF2 de calbindina D9k, como etiquetas de afinidad y ligandos de afinidad cognados para la inmovilización, detección y/o purificación de proteínas y otras moléculas.

Antecedentes de la invención

15 La capacidad de 'fijar' o 'inmovilizar' moléculas pequeñas en una ubicación deseada es importante para numerosas aplicaciones. Por ejemplo, en sistemas biológicos, la inmovilización de proteínas en un sustrato sólido se puede utilizar para aislar y/o detectar proteínas específicas dentro de una muestra biológica compleja. Además, la fijación de una proteína a un sustrato se utiliza a menudo para conseguir la separación o purificación de proteínas a partir de una mezcla de moléculas biológicas, por ejemplo, un producto lisado celular.

20 Existen varios enfoques para la inmovilización, detección y purificación de moléculas biológicas, incluyendo proteínas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden explotarse para purificar sus respectivos antígenos mediante inmunoprecipitación. Las proteínas también se pueden purificar utilizando técnicas de purificación por afinidad alternativas, en las que típicamente se utiliza un "ligando de afinidad" capaz de unirse a la proteína de interés para aislar la proteína.

Para los fines de la purificación por afinidad, la proteína de interés a menudo se "etiqueta" con una molécula a la que se une específicamente un ligando de afinidad. Se han desarrollado y utilizado diversos sistemas de etiquetado molecular para generar proteínas de fusión que incorporan etiquetas que incluyen las siguientes: etiqueta myc; etiqueta péptido Flag; Etiqueta His; Etiqueta Strep; Etiqueta GST; Etiqueta MBP; Etiqueta SNAP; Etiqueta Halo; Etiqueta Tap; INPACT-CN. Los ligandos de afinidad cognados para cada una de estas etiquetas son conocidos y pueden utilizarse, por ejemplo, en el contexto de enfoques de cromatografía de afinidad, para el aislamiento de proteínas etiquetadas de interés.

35 A pesar de la disponibilidad de varios sistemas comerciales de etiquetado molecular, existen desventajas asociadas con muchas de las etiquetas existentes. En particular, el tamaño de la etiqueta puede crear problemas durante la producción de la proteína de fusión recombinante, tal como la formación de cuerpos de inclusión, dificultad en la solubilización, falta de estabilidad y/o plegamiento incorrecto de la proteína de fusión y purificación no específica de proteínas bacterianas. Además, se ha informado de que las resinas que contienen metales que se unen a las Etiquetas His promueven la oxidación no específica en las cadenas laterales de aminoácidos de la proteína durante la purificación. Esta oxidación a menudo afecta a la funcionalidad de la proteína.

45 Un reto adicional en el campo de las etiquetas moleculares o de afinidad utilizadas para purificar las proteínas es equilibrar la fuerza y la especificidad de la unión necesaria para lograr una purificación eficaz con una interacción de baja afinidad suficiente que pueda disociarse para eluir la proteína purificada. Si la fuerza de unión entre la etiqueta de la proteína de fusión y su ligando de afinidad cognado es demasiado alta, puede ser necesario un protocolo de elución intenso para liberar la proteína, y esto puede perjudicar significativamente la función de la proteína purificada.

50 **Compendio de la invención**

Los autores de la presente invención intentaron explotar interacciones dependientes de calcio entre fragmentos o regiones de proteínas de origen natural con el fin de desarrollar un nuevo sistema de etiqueta de afinidad, que supera muchas de las desventajas asociadas con los sistemas existentes. Las etiquetas moleculares/de afinidad y los pares de unión al ligando de afinidad de la presente invención se basan en subdominios de mano EF encontrados en muchas proteínas de unión a calcio.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un sistema de etiqueta de afinidad para inmovilizar una molécula, comprendiendo dicho sistema:

- 60
- (i) una matriz de afinidad que comprende un primer subdominio de mano EF o fragmento del mismo anclado a un sustrato; y
 - (ii) una molécula etiquetada con un segundo subdominio de mano EF o fragmento del mismo,

en donde la molécula se inmoviliza en el sustrato mediante la interacción entre el primer y el segundo subdominios de mano EF o fragmentos de los mismos.

5 El primer subdominio de mano EF o fragmento del mismo se unirá típicamente al segundo subdominio de mano EF o fragmento del mismo en presencia de calcio.

Un fragmento de un primer o segundo subdominio de mano EF es un fragmento que conserva la capacidad del subdominio de mano EF completo para formar un par de unión de mano EF.

10 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una matriz de afinidad que comprende un primer subdominio de mano EF o fragmento del mismo que es capaz de unirse a un segundo subdominio de mano EF en presencia de calcio, en donde dicho primer subdominio de mano EF o fragmento del mismo está anclado a un sustrato y en donde dicho primer subdominio de mano EF se selecciona entre:

- 15 (i) EF2 de calbindina D9K,
 (ii) un subdominio de mano EF que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o
 (iii) un subdominio de mano EF que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1,

20 en donde el fragmento del primer subdominio de mano EF conserva la capacidad del subdominio de mano EF completo para formar un par de unión de mano EF. En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para purificar una molécula biológica etiquetada con un subdominio de mano EF o un fragmento del mismo de una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 25 (i) proporcionar una matriz de afinidad de acuerdo con el segundo aspecto de la invención;
 (ii) poner una muestra que contiene la molécula biológica etiquetada en contacto con la matriz de afinidad de (i) en condiciones que permitan la unión de los subdominios de mano EF;
 (iii) separar cualquier material no unido de la molécula biológica etiquetada unida a la matriz de afinidad; y
 (iv) efectuar la liberación de la molécula biológica etiquetada de la matriz de afinidad.

30 En los métodos de la invención, los subdominios de mano EF, o fragmentos de los mismos se unirán típicamente en presencia de calcio. Un fragmento de la etiqueta de subdominio de mano EF es un fragmento que conserva la capacidad del subdominio EF completo para formar un par de unión de mano EF con el ligando de afinidad de mano EF.

35 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1 Mapa de plásmido para pJexpress-peIB-EF1.

40 **Figura 2** Prueba de concepto experimental para el método de purificación de proteínas con nanopartículas de EF2-SiO₂ novedoso - expresión y purificación de la proteína de fusión EF1-scFv de peIBEF1. **(PP)** fracción periplásmica de producto lisado de sobrenadante de E. coli **(S)** que expresa peIB-scFv-EF1 post-incubación con sobrenadante de nanopartículas de EF2-SiO₂ **(W1)** post-lavado 1 con sobrenadante de tampón de lavado que contiene calcio **(W2)** post-lavado 2 con sobrenadante de tampón de lavado que contiene calcio **(E1)** post-lavado con sobrenadante de tampón de elución de EDTA sin calcio **(E2)** post-lavado con sobrenadante de tampón de elución de EDTA sin calcio **(E3)** post-lavado con tampón de elución de EDTA sin calcio.

Figura 3 Prueba de concepto experimental para el método de purificación de proteínas con nanopartículas de EF2-SiO₂ - expresión y purificación de proteína de fusión EF1-Snap25 a partir de pEF1-N.

50 **A** Purificación de proteínas de fusión utilizando nanopartículas de sílice EF2: **(1)** producto lisado nativo de EF1-Snap25 **(2)** primer lavado de calcio **(3)** segundo lavado de calcio **(4)** elución de EF1-Snap25 en tampón de EDTA.

B Confirmación de la expresión de la proteína de fusión con la etiqueta 6xHis: **(1)** sin expresión de proteína de fusión del vector vacío **(2)** producto lisado desnaturalizado de EF1-Snap25 **(3)** producto lisado nativo de EF1-Snap25 **(4)** flujo continuo de la elución de la columna de Ni-NTA **(5)** de la proteína de fusión EF1-Snap25 en imidazol 250 mM.

Figura 4 Mapa del plásmido para pJexpress404:92688 (EFTag-Nterminal-6His)

Figura 5 Mapa de plásmido para pJexpress401:92689 (EFTag-Cterminal-6His)

Figura 6 Mapa de plásmido para pJ602:92691 (EFTag-Nterminal-6His-mamífero)

60 **Figura 7** Mapa de plásmido para pJ602:92690 (EF1-Cterminal-6His-mamífero)

Descripción detallada

Manos EF como etiquetas de afinidad/ligandos de afinidad

La presente invención proporciona un sistema de etiquetas de afinidad basado en el uso de subdominios de mano EF. El sistema de la invención se basa en dos componentes: (i) una matriz de afinidad que comprende un primer subdominio de mano EF o fragmento del mismo anclado a un sustrato; y (ii) una molécula marcada con un segundo subdominio de mano EF o fragmento del mismo.

Los subdominios de mano EF son regiones discretas de estructura tridimensional conservada que se encuentran en muchas proteínas de unión a calcio tales como calmodulina 1 (SEQ ID NO: 3), calmodulina 2 (SEQ ID NO: 4), calmodulina 3 (SEQ ID NO: 5), similar a calmodulina 3 (SEQ ID NO: 6), similar a calmodulina 5 (SEQ ID NO: 7), similar a calmodulina 6 (SEQ ID NO: 8), calbindina 1 (SEQ ID NO: 9), calbindina 2 (SEQ ID NO: 10), calbindina D9K (SEQ ID NO: 11), recoverina (SEQ ID NO: 12), frecuenina (SEQ ID NO: 13), troponina C (SEQ ID NO: 14), parvalbúmina (SEQ ID NO: 15), calbindina D28k (SEQ ID NO: 16), secretagogina (SEQ ID NO: 17) y calretinina (SEQ ID NO: 18).

Las secuencias de aminoácidos subyacentes de las regiones proteicas definidas como "subdominios de mano EF" pueden variar considerablemente. Sin embargo, los subdominios de mano EF se caracterizan típicamente por un motivo de proteína de estructura secundaria "hélice-bucle-hélice" conservado. Se han resuelto las estructuras cristalinas de muchas proteínas que contienen mano EF (Håkansson M. et al. An extended hydrophobic core induces EF-hand swapping. Protein Science (2001), 10: 927-933).

Un requisito de la presente invención es que el primer subdominio de mano EF y el segundo subdominio de mano EF del sistema de etiqueta de afinidad formen un "par de unión". Según se utiliza en la presente memoria, el término par de unión significa dos moléculas o entidades que son capaces de interactuar o de asociarse para formar un complejo de unión. Es preferible que la interacción de unión entre el par de unión sea específica de manera que cada miembro del par de unión solo sea capaz de unirse a su compañero respectivo, o a un número limitado de compañeros de unión. Los subdominios de mano EF para su uso junto con la presente invención incluyen subdominios de mano EF seleccionados entre cualquier proteína de unión a calcio que sea capaz de formar un par de unión con un segundo subdominio de mano EF. El primer y segundo subdominios de mano EF que componen el par de unión del presente sistema de etiqueta de afinidad pueden derivar de diferentes proteínas de unión a calcio, pero preferiblemente derivan de la misma proteína de unión a calcio.

La proteína de unión a calcio se puede seleccionar a partir de cualquier fuente adecuada que incluya proteínas de origen humano, bovino, murino o de rata. Los subdominios de mano EF también pueden derivar de proteínas que tienen al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con proteínas de unión a calcio de origen humano, bovino, murino o de rata. Las proteínas de las que derivan los subdominios de mano EF pueden ser proteínas purificadas, proteínas expresadas de forma recombinante o proteínas sintetizadas químicamente.

En ciertas realizaciones, los subdominios de mano EF primero y segundo no son idénticos y derivan de la misma proteína de unión a calcio, en donde dicha proteína de unión a calcio contiene al menos dos subdominios de mano EF diferentes.

El primero y el segundo subdominios de mano EF se unen entre sí típicamente en presencia de calcio. Los subdominios de mano EF que forman pares de unión adecuados para su uso en el sistema de etiqueta de afinidad de la presente invención se pueden identificar tomando una proteína de unión a calcio que contiene al menos dos subdominios de mano EF, fragmentando dicha proteína para producir al menos dos fragmentos, conteniendo cada fragmento al menos un subdominio de mano EF, e intentando reconstituir la proteína a partir de los fragmentos respectivos de una manera dependiente de calcio. Los fragmentos que permiten la reconstitución de la proteína en presencia de calcio o que permiten la asociación no covalente de al menos dos fragmentos de la proteína original en presencia de calcio, son fuentes adecuadas de subdominios de mano EF para su uso en el sistema de etiqueta de afinidad de la presente invención.

Típicamente, la afinidad de la unión entre el primer subdominio de mano EF y el segundo subdominio de mano EF del sistema de etiqueta de afinidad en presencia de calcio comprende una K_D menor de 1 μM , preferiblemente menor de 100 nM y más preferiblemente menor de 10 nM. La afinidad de unión entre el primer subdominio de mano EF y el segundo subdominio de mano EF puede estar en el intervalo nM, pM o fM.

En una realización preferida de la invención, el primer y segundo subdominios de mano EF derivan de la proteína de unión a calcio calbindina D9k. La calbindina D9k (también conocida como proteína de unión a calcio S100) es una proteína de unión a calcio pequeña (Mr 8500) que consta de dos subdominios de mano EF, EF1 y EF2. EF1 y EF2 interactúan con alta afinidad ($K_A = 1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$; $K_D = 80 \text{ pM}$) y, por lo tanto, la calbindina D9k puede reconstituirse *in vitro* a partir de dos fragmentos de proteína separados correspondientes a sus dominios EF1 y EF2.

En la presente invención, el primer subdominio de mano EF del par de unión forma al menos parte del "ligando de afinidad" unido al sustrato de la matriz de afinidad. El segundo subdominio de mano EF forma al menos parte de la etiqueta o etiqueta molecular o etiqueta de afinidad anclada a una molécula de interés.

En ciertas realizaciones de la invención, el primer subdominio de mano EF comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

STLDELFEELDKNGDGEVSFEFEQVLVKKISQ (SEQ ID NO: 1) o un fragmento de la misma como se describe en la presente memoria.

5 En realizaciones adicionales, el primer subdominio de mano EF comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1.

10 Según se utiliza en la presente memoria, el término "identidad de secuencia" se utiliza para describir la relación de secuencia entre dos o más secuencias de nucleótidos o aminoácidos. El porcentaje de "identidad de secuencia" entre dos secuencias se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación (un número definido de posiciones), en donde la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (*es decir* huecos) en comparación con la secuencia de referencia para lograr un alineamiento óptimo. El porcentaje de identidad de secuencia se calcula determinando el número de posiciones en las que aparecen la base nucleotídica o residuo de aminoácido idénticos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones "emparejadas", dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100. Para la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas, la ventana de comparación estará determinada por la longitud completa de las regiones alineadas. Los métodos y el soporte lógico para determinar la identidad de secuencia están disponibles en la técnica e incluyen el soporte lógico Blast y el análisis GAP. Las secuencias pueden alinearse utilizando cualquiera de los algoritmos disponibles dentro de las herramientas de alineamiento de secuencias, incluyendo algoritmos que utilizan parámetros convencionales como el megablast, megablast discontinuo o algoritmos blastn para alinear secuencias de nucleótidos o los algoritmos PSI-BLAST, PHI-BLAST o blastp para alinear secuencias proteína, disponibles a través del software Blast.

25 En ciertas realizaciones de la invención, el segundo subdominio de mano EF comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:
KSPEELKGIFEKYAAKEGDPNQLSKEELKLLLGTEFPSSLKGM (SEQ ID NO: 2) o un fragmento del mismo como se describe en la presente memoria.

30 En realizaciones adicionales, el segundo subdominio de mano EF comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

35 En ciertas realizaciones de la invención, el segundo subdominio de mano EF puede estar codificado por un polinucleótido representado por SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32 o un polinucleótido con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% de identidad de secuencia. Los vectores de expresión que incorporan una secuencia de polinucleótido que codifica un segundo subdominio de mano EF son los descritos en otra parte de la presente memoria.

40 Los subdominios de mano EF para su uso junto con el sistema de etiqueta de afinidad de la presente invención pueden representar formas nativas o de tipo salvaje tales como subdominios aislados de formas nativas o de tipo salvaje de proteínas de unión a calcio. Alternativamente, se pueden utilizar subdominios de mano EF modificados, siempre que se conserve suficiente afinidad de unión entre el subdominio de mano EF de la matriz de afinidad (el primer subdominio de mano EF) y el subdominio de mano EF de la etiqueta de afinidad (el segundo subdominio de mano EF). Según se utiliza en la presente memoria, la afinidad de unión entre los subdominios de mano EF es suficiente, si la K_D es menor que 1 μM , preferiblemente menor que 100 nM y más preferiblemente menor que 10 nM.

45 Las modificaciones de los subdominios de mano EF pueden incluir la deleción de residuos de aminoácidos, la inserción de residuos de aminoácidos, mutaciones puntuales y/o concatenaciones. Las mutaciones puntuales pueden incluir mutaciones con cambio de sentido en las que cualquier aminoácido dentro de un subdominio de mano EF se sustituye por cualquier otro aminoácido. En ciertas realizaciones, se pueden introducir sustituciones conservativas en las que una sustitución conservativa implica la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de la misma categoría, es decir ácido, alcalino, hidrófobo e hidrófilo. Se puede introducir una sustitución conservativa para preservar la carga global del subdominio de mano EF.

50 Un experto en la técnica reconocerá que se pueden realizar modificaciones por varias razones. Éstas pueden incluir modificaciones para mejorar o reducir la afinidad de unión entre los subdominios de mano EF, modificaciones para mejorar la estabilidad del subdominio de mano EF o la molécula a la que está unido, modificaciones para facilitar la unión del primer subdominio de mano EF del ligando de afinidad al sustrato de la matriz de afinidad o para facilitar la unión del segundo subdominio de mano EF de la etiqueta de afinidad a la molécula de interés.

55 Los subdominios de mano EF modificados pueden tener niveles variables de identidad de secuencia con la forma salvaje correspondiente del subdominio de mano EF. En ciertas realizaciones, un subdominio de mano EF modificado puede tener al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con la correspondiente forma

salvaje del subdominio de mano EF.

En ciertas realizaciones, el sistema de etiqueta de afinidad de la presente invención puede comprender una matriz de afinidad que comprende un fragmento de un primer dominio de mano EF anclado a un sustrato. En realizaciones alternativas o adicionales, el sistema de etiqueta de afinidad de la presente invención puede comprender una molécula marcada con un fragmento de un segundo dominio de mano EF.

Según se utiliza en la presente memoria, el término fragmento debe tomarse para indicar una región de un subdominio de mano EF que tiene 1, 2, 3, 4, 5, etc. aminoácidos menos de longitud en comparación con el subdominio de mano EF completo. Sin embargo, un requisito de la presente invención es que cualquier fragmento de subdominio de mano EF utilizado como parte del sistema de etiqueta de afinidad de la presente invención conserve la capacidad del subdominio de mano EF completo para formar un par de unión de mano EF. Por lo tanto, un fragmento de un primer o segundo subdominio de mano EF puede ser cualquier fragmento que conserve la capacidad del subdominio EF completo para formar un par de unión de mano EF. La afinidad de unión de dichos fragmentos de subdominio de mano EF se puede potenciar o reducir en comparación con los correspondientes subdominios EF completos.

Matriz de afinidad de mano EF

El primer componente del sistema de etiqueta de afinidad de la presente invención es una "matriz de afinidad". Según se utiliza en la presente memoria, el término matriz de afinidad se refiere a un sustrato al que está unido un ligando de afinidad. El ligando de afinidad comprende un primer subdominio de mano EF o fragmento del mismo de acuerdo con la descripción anterior; esto se denomina en la presente memoria ligando de afinidad de mano EF. El ligando de afinidad de mano EF es capaz de unirse a la segunda "etiqueta" del subdominio de mano EF anclado a la molécula de interés y, por lo tanto, es capaz de inmovilizar la molécula en el sustrato de la matriz de afinidad. La unión del ligando de afinidad de mano EF a la segunda etiqueta del subdominio de mano EF se produce típicamente en presencia de calcio. La unión de la molécula etiquetada con mano EF puede producirse a concentraciones de calcio superiores a 10 nM.

En una realización preferida, el primer subdominio de mano EF del ligando de afinidad comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1.

Además de un primer subdominio de mano EF, el ligando de afinidad puede incluir residuos de aminoácidos adicionales. Por ejemplo, el ligando de afinidad puede incluir secuencias polipeptídicas adicionales o fragmentos que flanquean el subdominio de mano EF en el contexto de la proteína de tipo salvaje de la que deriva el subdominio de mano EF. El ligando de afinidad también puede incluir subdominios de mano EF adicionales, por ejemplo, uno o más, dos o más, tres o más etcétera, subdominios de mano EF. Se pueden incluir residuos de aminoácidos y/o subdominios adicionales en el ligando de afinidad por varias razones, por ejemplo para aumentar la afinidad del ligando de afinidad por la segunda etiqueta del subdominio de mano EF unida a la molécula de interés.

El sustrato de la matriz de afinidad puede consistir en cualquier material adecuado, pero preferiblemente es sólido. En ciertas realizaciones, el sustrato puede incluir, pero no está limitado a, polisacáridos entrecruzados tales como celulosa, dextrano (sefadex), agarosa, sefarosa, papel, vidrio, plástico, metal, minerales, cerámica, celulosa, materiales semiconductores, sílice, diversas membranas (porosas o no porosas) o resinas poliméricas rígidas tales como poliestireno, poliestireno/látex y otros polímeros orgánicos e inorgánicos, tanto naturales como sintéticos. También se pueden utilizar sustancias que forman geles, tales como proteínas (por ejemplo, gelatinas), lipopolisacáridos, silicatos, agarosa y poliácridamidas. También son adecuados polímeros tales como dextranos, polialquilenglicoles o tensioactivos, tales como fosfolípidos o sales de alquilamonio de cadena larga (12-24 átomos de carbono).

El sustrato puede adoptar cualquiera de una serie de formas. Éstas incluyen, pero sin limitación, esferas sólidas o porosas u otras partículas, superficies sólidas tales como sustratos de matriz, columnas, capilares y similares. En una realización preferida de la invención, el sustrato comprende nanopartículas, tales como nanopartículas de sílice. Según se utiliza en la presente memoria, el término "nanopartícula" se debe adoptar para significar una partícula microscópica con al menos una dimensión inferior a 100 nm. En ciertas realizaciones, el sustrato no es un chip sensor del tipo utilizado junto con el aparato Biacore 3000.

Además, el sustrato se puede anclar a un soporte adicional de modo que la matriz de afinidad adopte una forma adecuada para la aplicación requerida. Por ejemplo, el sustrato puede empaquetarse en una columna, un capilar, un microcapilar o un tubo de electroforesis para formar una matriz de afinidad a través de la cual puede pasar una muestra. Alternativamente, el sustrato se puede utilizar para revestir las paredes de un recipiente o los pocillos de una placa de múltiples pocillos a la que se agrega una muestra que contiene la molécula etiquetada de interés.

El ligando de afinidad de mano EF puede anclarse al sustrato mediante cualquier medio adecuado. En una realización, el ligando se une covalentemente al sustrato. Si el ligando de afinidad de mano EF se une covalentemente al sustrato de la matriz de afinidad, el sustrato puede ser polifuncional o susceptible de ser polifuncionalizado. Los grupos funcionales que pueden estar presentes en el sustrato y se utilizan para la conexión incluyen, pero no se limitan a, ácidos carboxílicos, aldehídos, grupos amino, grupos ciano, grupos etilénicos, grupos hidroxilo, grupos mercapto y grupos haloacetilo (es decir grupos yodoacetilo).

El ligando de afinidad de mano EF se puede unir al sustrato directamente. En una realización, el ligando se une al sustrato mediante acoplamiento aleatorio de amina mediado por cualquier aminoácido a lo largo de la longitud del subdominio de mano EF, siempre que esto no interfiera en la unión del ligando de afinidad de mano EF a la segunda etiqueta de subdominio de mano EF. En una realización adicional, el ligando de afinidad de mano EF incorpora un residuo de cisteína en el extremo N o el extremo C y el primer ligando de afinidad de mano EF se une al sustrato mediante acoplamiento de tiol.

El ligando de afinidad de mano EF también se puede unir al sustrato indirectamente, por ejemplo por medio de un reactivo de entrecruzamiento o conector. Los expertos en la técnica conocerán reactivos de entrecruzamiento adecuados, e incluyen, pero sin limitación, carbodiimidas, maleimidas, succinimidias y disulfuros reactivos. Los conectores adecuados también son conocidos e incluyen, pero sin limitación, cadenas alquílicas tales como conectores carbonados de cadena lineal o ramificada, conectores carbonados heterocíclicos, conectores carbohidratados y conectores polipeptídicos.

Moléculas etiquetadas con mano EF

El segundo componente del sistema de etiqueta de afinidad de la presente invención es una molécula etiquetada con un segundo subdominio de mano EF o fragmento del mismo. Según se utiliza en la presente memoria, una "etiqueta" es una molécula anclada a la molécula de interés. En la presente invención, la etiqueta comprende un subdominio de mano EF o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente; por lo tanto, la etiqueta se denominará en la presente memoria "etiqueta mano EF". Una molécula "etiquetada con EF" o molécula "etiquetada" es cualquier molécula a la que se ancla una etiqueta mano EF de la invención para formar una molécula quimérica.

Además de un subdominio de mano EF, la etiqueta de afinidad puede incluir residuos de aminoácidos adicionales. Por ejemplo, la etiqueta de afinidad puede incluir secuencias polipeptídicas o fragmentos adicionales que flanquean el subdominio de mano EF en el contexto de la proteína de tipo salvaje de la que deriva el subdominio de mano EF. La etiqueta de afinidad también puede incluir subdominios de mano EF adicionales, por ejemplo, uno o más, dos o más, tres o más etcétera, subdominios de mano EF. Se pueden incluir residuos y/o subdominios de aminoácidos adicionales en la etiqueta de afinidad por varias razones, por ejemplo, para aumentar la afinidad de la etiqueta de afinidad por el ligando de afinidad mano EF de la matriz de afinidad.

La molécula a la que se ancla la etiqueta mano EF puede ser cualquier molécula orgánica o biológica de interés incluyendo, pero sin limitarse a, una proteína, un polipéptido, un ácido nucleico, un lípido, un polisacárido, un carbohidrato y una lectina. En una realización preferida, la etiqueta mano EF se ancla a una secuencia de polipéptido o proteína que no es parte del subdominio de mano EF, para formar una proteína de fusión.

La etiqueta mano EF se puede anclar a la molécula de interés por cualquier medio adecuado, y se puede anclar directa o indirectamente. Cuando la molécula es una proteína o polipéptido, la etiqueta mano EF se puede anclar covalentemente a la secuencia polipeptídica en el extremo N de la secuencia polipeptídica o en el extremo C de la secuencia polipeptídica. Alternativamente, la etiqueta mano EF se puede anclar al grupo funcional de la cadena lateral de un residuo de aminoácido de la secuencia polipeptídica en una posición entre el extremo N y el extremo C de la secuencia polipeptídica.

Cuando el anclaje de la etiqueta mano EF a la molécula es indirecto, el anclaje puede estar mediado por un conector. Un conector preferido es capaz de formar enlaces covalentes tanto para la etiqueta mano EF como para la molécula que se va a etiquetar. Los conectores adecuados son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no están limitados a, conectores carbonados de cadena lineal o ramificada, conectores carbonados heterocíclicos, conectores carbohidratados y conectores polipeptídicos. En algunas realizaciones, se puede utilizar un conector bifuncional que incluye un grupo funcional reactivo con una funcionalidad preexistente en la etiqueta mano EF, y otro grupo reactivo con una funcionalidad preexistente en la molécula que se vaya a etiquetar.

Cuando la etiqueta mano EF se ancla a un polipéptido o proteína para formar una proteína de fusión, se prefiere que el conector sea un conector polipeptídico. Además, el conector se puede unir a grupos funcionales de cadena lateral de aminoácidos constitutivos de la etiqueta y/o el polipéptido o a los grupos alfa amino y carboxilo de los aminoácidos terminales de la etiqueta mano EF y el polipéptido que se vaya a etiquetar.

En ciertas realizaciones, se pueden utilizar conectores escindibles para anclar la molécula de interés a la etiqueta

mano EF. Esto permite que la etiqueta mano EF se separe de la molécula de interés, por ejemplo, mediante la adición de un agente capaz de escindir el conector. Los expertos en la técnica conocen una serie de conectores escindibles diferentes. Dichos conectores pueden escindirse, por ejemplo, mediante irradiación de un enlace fotolábil o hidrólisis catalizada por ácido. También existen conectores polipeptídicos que incorporan un sitio de reconocimiento de proteasas y que pueden escindirse mediante la adición de una enzima de proteasa adecuada.

Proteínas de fusión de mano EF

En la presente memoria se proporcionan, pero no forman parte de la invención, proteínas de fusión de mano EF. Dichas proteínas de fusión comprenden un subdominio de mano EF o fragmento del mismo de acuerdo con las realizaciones descritas anteriormente, conjugado con una secuencia de polipéptido que no es parte del subdominio de mano EF o fragmento del mismo.

En una realización preferida, el subdominio de mano EF comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma, o una secuencia de aminoácidos con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% de identidad con la misma. En una realización preferida adicional, el subdominio de mano EF comprende EF1 de calbindina D9k.

La porción polipeptídica de la proteína de fusión que no es parte del subdominio de mano EF puede ser cualquier secuencia de polipéptido o proteína adecuada. En una realización, el polipéptido al que está unida la etiqueta del subdominio de mano EF puede ser un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de una inmunoglobulina que comprende cualquier dominio V_H y V_L de interés.

Las proteínas de fusión de mano EF utilizadas en la presente invención se pueden producir utilizando técnicas de síntesis química o utilizando técnicas de expresión recombinantes. Los mecanismos convencionales de síntesis química de péptidos son conocidos en la técnica e incluyen mecanismos de síntesis en fase sólida.

La expresión recombinante implica típicamente la producción de proteínas mediante el uso de un casete de expresión o vector de expresión adecuado. Los vectores de expresión de la presente invención están diseñados para expresar un polipéptido o proteína etiquetados con un subdominio de mano EF o fragmento del mismo.

En ciertas realizaciones, el vector de expresión comprende una secuencia de polinucleótido que codifica una etiqueta mano EF de acuerdo con la presente invención y un sitio de clonación que tiene uno o más sitios de restricción (es decir un sitio de clonación múltiple) para la inserción de una secuencia de polinucleótido adicional que codifica el polipéptido o proteína que se vaya a etiquetar con el subdominio de mano EF o fragmento del mismo. El sitio de clonación debería situarse de manera que cuando la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido o proteína se inserte en el vector, esté en fase con la secuencia polinucleotídica que codifica la etiqueta mano EF, de forma que cuando el polinucleótido del vector se transcriba y traduzca, se produzca una proteína de fusión. Dentro del vector de expresión, el polinucleótido que codifica la etiqueta mano EF puede situarse aguas arriba del sitio de clonación múltiple de modo que la etiqueta se coloca en el extremo 5' o 3' del polipéptido.

Los vectores de expresión para la producción de proteínas de fusión de mano EF pueden ser plásmidos o cósmidos bacterianos o pueden ser vectores de levadura tales como cromosomas artificiales de levadura (YAC), que se replican como cromosomas lineales pequeños. Los vectores de expresión adecuados también se pueden obtener de bacteriófagos, incluyendo todos los fagos de ADN y ARN, o virus tales como baculovirus, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus Herpes, virus Vaccinia y virus de ADN totalmente monocatenario, bicatenario y parcialmente bicatenario, virus de ARN con cadena de sentido todo positivo y negativo y retrovirus de replicación defectuosa.

Para la expresión recombinante de la proteína de fusión, el polinucleótido que codifica la proteína de fusión se debe unir operablemente a al menos una secuencia reguladora dentro del vector de expresión, en donde la secuencia reguladora es capaz de dirigir o efectuar la expresión de la proteína de fusión. El término secuencia reguladora se debe tomar en un contexto amplio y se pretende que se refiera a cualquier secuencia de nucleótidos capaz de efectuar la expresión de polinucleótidos a los que está conectada operablemente, incluyendo, pero sin limitarse a, promotores, potenciadores y otros elementos activadores de la transcripción de origen natural o sintéticos. La secuencia reguladora puede estar localizada en el extremo 5' o 3' de la secuencia de polinucleótido. El término "conectado operablemente" se refiere a una conexión funcional entre la secuencia reguladora y la secuencia de polinucleótido de manera que la secuencia reguladora impulsa la transcripción del polinucleótido. Los elementos conectados operablemente pueden ser contiguos o no contiguos. Preferiblemente, la secuencia reguladora es un promotor seleccionado del grupo que incluye, pero no se limita a, promotores constitutivos, promotores inducibles y/o promotores específicos de tejido.

Las proteínas de fusión etiquetadas con mano EF utilizadas en la presente invención se pueden expresar en una célula anfitriona. Se pretende que el término "célula anfitriona" incluya cualquier célula o línea celular en la que se

pueda introducir un vector de expresión recombinante para la producción de una proteína de fusión etiquetada con EF como se describió anteriormente con en fin de efectuar la expresión. Las células anfitrionas adecuadas incluyen, pero no están limitadas a células bacterianas (p.ej. *E. coli*), células de levadura, células fúngicas, células vegetales, células de invertebrados y células de vertebrados, incluyendo células de mamíferos. Las células anfitrionas no deberían derivarse de embriones humanos.

La elección del vector de expresión y la de secuencia reguladora o promotora asociada puede depender de la célula anfitriona que se vaya a utilizar. Por ejemplo, los vectores de expresión que incorporan el promotor temprano inmediato de CMV son adecuados para su uso en células anfitrionas de mamífero.

El vector de expresión puede se transfectar o transformar en una célula anfitriona adecuada utilizando cualquiera de los mecanismos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de mecanismos de transfección incluyen, pero sin limitación, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, electroporación y microinyección. El vector se puede mantener como un vector no integrado, por ejemplo, un plásmido, o alternativamente, se puede integrar en el genoma de la célula anfitriona.

El vector de expresión puede comprender opcionalmente un gen marcador seleccionable. Según se utiliza en la presente memoria, el término "gen marcador seleccionable" incluye cualquier gen que confiera un fenotipo a una célula en la que se expresa para facilitar la identificación y/o selección de células, que se transfectan o transforman con una construcción de expresión de la invención. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados incluyen genes de resistencia contra ampicilina (Ampr), tetraciclina (Tcr), kanamicina (Kanr), fosfinotricina, cloranfenicol (CAT), neomicina y geneticina G418. Otros genes marcadores adecuados proporcionan un rasgo metabólico, por ejemplo manA. También pueden utilizarse genes marcadores visuales e incluyen, por ejemplo, beta-glucuronidasa (GUS), luciferasa y proteína fluorescente verde (GFP).

El vector de expresión de la invención puede incluir adicionalmente un origen de replicación que se requiere para el mantenimiento y/o la replicación en un tipo celular o célula anfitriona específicos. Un ejemplo es aquel en el que se requiere que una construcción de expresión se mantenga en una célula bacteriana como un elemento genético extracromosómico o episomal (p.ej., una molécula de plásmido o cósmido) en una célula. Los orígenes preferidos de replicación incluyen, pero no se limitan a, pUC-ori, f1-ori, pBR322 ori (pMB1) y colE1 ori.

En la Figura 1 se muestra un vector de expresión (pJexpress411:59935 - pelBEF1a_optEc1) de la presente invención y la secuencia de polinucleótido se muestra en SEQ ID NO: 19. El vector de expresión comprende un casete de expresión adecuado para la expresión de una proteína de fusión que incorpora el subdominio EF1 de mano EF de calbindina D9k. El vector de expresión incorpora una secuencia líder pelB y un sitio de clonación múltiple, que incluye los sitios NcoI y NotI para la inserción de un polipéptido de interés aguas abajo de un promotor T7. La inserción de un polipéptido permite que el polipéptido se transcriba en marco con el subdominio EF1 de mano EF de la calbindina D9k (codificada por la secuencia de polinucleótido representada por los nucleótidos 1621-1746 de SEC ID NO: 19 es decir SEQ ID NO: 31 dentro del inserto del vector en los nucleótidos 1496-1758 de SEQ ID NO:19 es decir SEQ ID NO: 30). El vector de expresión también incluye múltiples sitios de restricción, un gen de resistencia a kanamicina y un origen de replicación pUC_ori. Los detalles completos de las características y sitios de enzimas de restricción presentes en el vector mostrado en la Figura 1 se proporcionan en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Vector	Mapa de características	Mapa de restricción		
		Nombre	Secuencia	Posiciones de corte
pJexpress411:59935 (SEQ ID NO: 19)	Inserto que incluye la secuencia que codifica el subdominio EF1 de mano EF de calbindina D9k: 59935 - Inicio: 1496 Fin: 1758 (SEQ ID NO: 30)	AclI	AACGTT	3115
		AlwNI	CAGNNNCT G	321,1537
		Apal	GGGCC	974,3664
		ApaI	GTGCAC	416,3433
		Ascl	GGCGCGCC	3024
	Secuencia EF1 - Inicio: 1621 Fin: 1746 (SEQ ID NO: 31)	Asel	ATTAAT	1423, 2835, 4138
		AsiSI	GCGATCGC	2636

ES 2 683 365 T3

Vector	Mapa de características	Mapa de restricción		
		Nombre	Secuencia	Posiciones de corte
	pUC_ori - Inicio: 2 Fin:805	Aval	CYCGRG	967, 1753, 1864
		Bell	TGATCA	3467
	Terminador rpn txn - Inicio: 977 Fin: 1090 (Complementaria)	BqlI	GCCNNNNN GGC	978, 1564
		BsmBI	CGTCTC	1810(C)
	Terminador bla txn - Inicio: 1097 Fin: 1397 (Complementaria)	BspHI	TCATGA	2, 2158
		BsrBI	CCGCTC	801, 2156, 1453(C)
		BsrDI	GCAATG	3866, 3500(C)
	Terminador rrnB1 B2 T1 txn - Inicio: 1858 Fin:2032	BssHII	GCGCGC	32, 3024, 3864
		BstEII	GGTNACC	3634
	pTF3 - Inicio: 1281 Fin:1306	BstXI	CCANNNNN NTGG	3255, 3384, 3507
		BtsI	GCAGTG	2584, 4186, 2497(C), 3818 (C)
	pTR - Inicio: 1941 Fin: 1957 (Complementaria)	EagI	CGGCCG	1589
		EcoRV	GATATC	1314, 3903
	Terminador T7 - Inicio: 1764 Fin:1810	HinCI	GTYRAC	1332, 3959
		HpaI	GTTAAC	3959
		KasI	GGCGCC	1091, 4092
	Promotor T7 - Inicio: 1424 Fin:1440	MluI	ACGCGT	1819, 3453
		NarI	GGCGCC	1092, 4093
		NcoI	CCATGG	1568
	Kanamicina - Inicio: 2217 Fin: 3011	NdeI	CATATG	1508
		NotI	GCGGCCGC	1589
		NruI	TCGCGA	2073, 2293
		NsiI	ATGCAT	1388, 2486, 2752
	lacl - Inicio: 3106 Fin: 4176	PciI	ACATGT	730, 1326
		PspOMI	GGGCC	970, 3660
		PspXI	VCTCGAGB	1753
		PvuI	CGATCG	2636
		PvuII	CAGCTG	4053,4146
		SapI	GCTCTTC	1625(C)
		SapI-Rev	GAAGAGC	1625
		SfiI		1564

Vector	Mapa de características	Mapa de restricción		
		Nombre	Secuencia	Posiciones de corte
			GGCCNNNN NGGCC	
		SmaI	CCCGGG	1866
		SspI	AATATT	1083, 1244, 2193, 2560
		XbaI	TCTAGA	1470
		XhoI	CTCGAG	1753
		XmaI	CCCGGG	1864

5 Otros vectores de expresión de acuerdo con la presente invención se muestran en las Figuras 4-7:
 pJexpress404:92688-EFTag-Nterminal-6His (Figura 4, secuencia de polinucleótido en SEQ ID NO: 20);
 pJexpress401:92689-EFTag-Cterminal-6His (Figura 5, secuencia de polinucleótido en SEQ ID NO: 21);
 pJ602:92691-EFTag-Nterminal-6His-mamífero (Figura 6, secuencia de polinucleótido en la SEQ ID NO: 22); y
 pJ602:92690-EF1-Cterminal-6His-mamífero (Figura 7, secuencia de polinucleótido en la SEQ ID NO: 23). Estos
 10 vectores de expresión también comprenden un casete de expresión adecuado para la expresión de una proteína de
 fusión que incorpora el subdominio EF1 de mano EF de la calbindina D9k. Los detalles completos de las
 características y sitios de enzimas de restricción presentes en los vectores mostrados en las Figuras 4-7 se
 proporcionan en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Vector	Mapa de características	Mapa de restricción				
		Nombre	Secuencia	Posiciones de corte		
pJexpress 404: 92688 (SEQ ID NO: 20)	Inserto que incluye la secuencia que codifica el subdominio EF1 de mano EF de calbindina D9k: 92688 - Inicio: 153 Fin: 489 (SEQ ID NO: 24)	Acc65I	GGTACC	401		
		AclI	AACGTT	2974, 3371, 3744		
		AfeI	AGCGCT	103, 3195		
		AlwNI	CAGNNNCTG	1588		
		ApaI	GGGCCC	936, 2431		
	Secuencia EF1 - Inicio: 241 Fin: 366 (SEQ ID NO: 32)	ApaLI	GTGCAC	1486, 2654, 3812		
		AscI	GGCGCGCC	3063		
		AseI	ATTAAT	1951, 3317		
	pUC_ori - Inicio: 1102 Fin: 1905 (Complementaria)	AvaI	CYCGRG	385, 935, 4274		
		BamHI	GGATCC	376		
		BclI	TGATCA	2620		
	Terminador rpn txn - Inicio: 817 Fin:930		GCCNNNNNG GC	BglI	495, 931, 3265	
				BglII	AGATCT	389
				BlpI	GCTNAGC	475
	terminador rmB1 B2 T1 txn - Inicio: 4111 Fin: 4285 (Complementaria)		TCCGGA	BspEI	3231	
BspHI				TCATGA	44, 1900, 3980	
BsrBI				CCGCTC	9(C), 70 (C), 1105 (C), 3986	

ES 2 683 365 T3

Vector	Mapa de características	Mapa de restricción		
		Nombre	Secuencia	Posiciones de corte
				(C)
	pTF3 - Inicio: 601 Fin: 626 (Complementaria)	BsrDI	GCAATG	2593, 2227(C)
		BssHII	GCGCGC	1870, 2223, 3063
		BstBI	TTCGAA	269
	pTR - Inicio: 4186 Fin:4202	BstEII	GGTNACC	2452
	rpo_bla_txn_term - Inicio: 506 Fin:930	BstXI	CCANNNNNN TGG	2588, 2711, 2840
		BtsI	GCAGTG	2275, 3545, 1907 (C), 3565 (C)
	Promotor T5 - Inicio: 41 Fin:88	EcoRI	GAATTC	343
		EcoRV	GATATC	592, 2188
	Terminador txn - Inicio: 506 Fin:930	HinCI	GTYRAC	574, 2132
		HindIII	AAGCTT	417
		HpaI	GTTAAC	2132
	ori bacteriano de alta número de copias - Inicio: 1103 Fin: 1906 (Complementaria)	KasI	GGCGCC	811, 1995
		KpnI	GGTACC	405
		MluI	ACGCGT	2634
		NarI	GGCGCC	812, 1996
	Ampicilina - Inicio: 3081 Fin: 3929 (Complementaria)	NcoI	CCATGG	405
		NdeI	CATATG	170
		NheI	GCTAGC	208
	AmpR - Inicio: 3087 Fin: 3929 (Complementaria)	NruI	TCGCGA	4069
		PciI	ACATGT	576, 1172
		PsiI	TTATAA	83, 772
	lacI - Inicio: 1916 Fin: 2986 (Complementaria)	PspOMI	GGGCC	932, 2427
		PstI	CTGCAG	397
		PvuI	CGATCG	3515
		PvuII	CAGCTG	398, 1945, 2038
		SacI	GAGCTC	386
		Scal-HF	AGTACT	3625
		SmaI	CCCGGG	4276
		SspI	AATATT	662, 823, 3949
		XbaI	TCTAGA	129
		XhoI	CTCGAG	385
		XmaI	CCCGGG	4274
		XmnI	GAANNNTTC	3744
pJexpress 401:	Inserto que incluye la secuencia que codifica	Acc65I	GGTACC	1686

ES 2 683 365 T3

Vector	Mapa de características	Mapa de restricción		
		Nombre	Secuencia	Posiciones de corte
92689 (SEQ ID NO: 21)	subdominio EF1 de mano EF de calbindina D9k: 92689 - Inicio: 1567 Fin: 1888 (SEQ ID NO: 25)	AclI	AACGTT	3166
		AfeI	AGCGCT	1517
		AlwNI	CAGNNNCTG	321
		Apal	GGGCCC	974, 3715
		ApaLI	GTGCAC	416, 3484
	Secuencia EF1 - Inicio: 1757 Fin: 1882 (SEQ ID NO: 32)	Ascl	GGCGCGCC	3075
		Asel	ATTAAT	2886, 4189
	pUC_ori - Inicio: 2 Fin:805	AsiSI	GCGATCGC	2687
		Aval	CYCGRG	967, 1670, 1915
	Terminador rpn txn - Inicio: 977 Fin: 1090 (Complementaria)	BamHI	GGATCC	1661
		BclI	TGATCA	3518
	terminador bla txn -	BglI	GCCNNNNNG GC	978, 1894
		BglII	AGATCT	1674
		Inicio: 1097 Fin: 1397 (Complementaria)	BspHI	TCATGA
	BsrBI		CCGCTC	801, 2207, 1423 (C), 1484 (C)
	Terminador rrnB1 B2 T1 txn - Inicio: 1909 Fin: 2083	BsrDI	GCAATG	3917, 3551 (C)
		BssHII	GCGCGC	32, 3075, 3915
		BstBI	TTCGAA	1785
	pTF3 - Inicio: 1281 Fin:1306	BstEII	GGTNACC	3685
	pTR - Inicio: 1992 Fin: 2008 (Complementaria)	BstXI	CCANNNNNN TGG	3306, 3435, 3558
		BtsI	GCAGTG	2635, 4237, 2548 (C), 3869 (C)
	Promotor T5 - Inicio: 1455 Fin:1502	EcoRI	GAATTC	1859
		EcoRV	GATATC	1314, 3954
		HinCI	GTYRAC	1332, 4010
	ori bacteriano de alto número de copias - Inicio: 1 Fin:804	HpaI	GTTAAC	4010
		KasI	GGCGCC	1091, 4143
	Kanamicina - Inicio: 2265 Fin: 3062	KpnI	GGTACC	1690
		MluI	ACGCGT	3504
		NarI	GGCGCC	1092, 4144
	lacI -Inicio: 3157 Fin: 4227	NcoI	CCATGG	1690
		NdeI	CATATG	1584
		NheI	GCTAGC	1622
		NruI	TCGCGA	2124, 2344

ES 2 683 365 T3

Vector	Mapa de características	Mapa de restricción		
		Nombre	Secuencia	Posiciones de corte
		Nsil	ATGCAT	1388, 2537, 2803
		Pcil	ACATGT	730, 1326
		Psil	TTATAA	1134, 1497
		PspOMI	GGGCCC	970, 3711
		PstI	CTGCAG	1682
		PvuI	CGATCG	2687
		PvuII	CAGCTG	1683, 4104, 4197
		SacI	GAGCTC	1671
		SmaI	CCCGGG	1917
		SspI	AATATT	1083, 1244, 2244, 2612
		XbaI	TCTAGA	1543
		XhoI	CTCGAG	1670
		XmaI	CCCGGG	1915
pJ602: 92691 (SEQ ID NO: 22)	Inserto que incluye la secuencia que codifica el Subdominio EF1 de mano EF de calbindina D9k: 92691 - Inicio: 2108 Fin: 2444 (SEQ ID NO: 26)	AatII	GACGTC	1599, 1652, 1735, 1921, 3182
		Acc65I	GGTACC	2356
		Accl	GTMKAC	3771, 3778
		AclI	AACGTT	4113, 4486
	Secuencia EF1 - Inicio: 2196 Fin: 2321 (SEC ID NO: 32)	AfeI	AGCGCT	3937
		AlwNI	CAGNNNCTG	321
		ApaI	GGGCCC	974
	pUC_ori - Inicio: 2 Fin: 805	ApaLI	GTGCAC	416, 3481, 4554
	Terminador rpn txn - Inicio: 977 Fin: 1090 (Complementaria)	Asel	ATTAAT	1481, 2086, 2678, 3078, 4059
		Aval	CYCGRG	967, 2340, 3028, 3214, 3224
	pTF3 - Inicio: 1281 Fin: 1306	AvrII	CCTAGG	3007
		BamHI	GGATCC	2331
	rpo_bla_txn_term - Inicio: 977 Fin: 1401 (Complementaria)	BclI	TGATCA	3058
		BglI	GCCNNNNNG	978, 1564, 1686, 1757, 3441, 4007
			GC	
txn_terminador - Inicio: 977 Fin: 1401 (Complementaria)	BglII	AGATCT	2344	
	BlpI	GCTNAGC	2430	
		BspEI	TCCGGA	3973
Promotor de CMV - Inicio: 1454 Fin: 2054	BspHI	TCATGA	2, 4722	
	BsrBI	CCGCTC	801, 1422(C),	

ES 2 683 365 T3

Vector	Mapa de características	Mapa de restricción		
		Nombre	Secuencia	Posiciones de corte
				319 0 (C), 4728 (C)
	ori SV40 - Inicio: 2682 Fin: 3025	BssHII	GCGCGC	32, 3172
		BstBI	TTCGAA	2224
	Resistencia a zeocina - Inicio: 3136 Fin:3510	BtsI	GCAGTG	4287, 2062(C), 37 15 (C), 4307 (C)
		EaqI	CGGCCG	3467
	Señal de poliadenilación de SV40 - Inicio: 3638 Fin: 3768	EcoRI	GAATTC	2298
		EcoRV	GATATC	1314
		FseI	GGCCGGCC	3412
	ori bacteriano de alto número de copias - Inicio: 1 Fin: 804	HinCI	GTYRAC	1332, 1458, 3072, 3146, 3779
		HindIII	AAGCTT	2372
	ZeoR - Inicio: 3139 Fin: 3501	KasI	GGCGCC	1091
		KpnI	GGTACC	2360
	Ampicilina - Inicio: 3823 Fin: 4671 (Complementaria)	MscI	TGGCCA	3139
		NarI	GGCGCC	1092
	AmpR - Inicio: 3829 Fin: 4671 (Complementaria)	NcoI	CCATGG	1834, 2360, 2914, 3134
		NdeI	CATATG	1708, 2125
		NqoMIV	GCCGGC	3408, 3469, 3583
		NheI	GCTAGC	2163
		NruI	TCGCGA	4811
		NsiI	ATGCAT	2757, 2829
		PciI	ACATGT	730, 1326
		PmlI	CACGTG	3067, 3513
		PsiI	TTATAA	1134, 2609, 3659
		PspOMI	GGGCCC	970
		PstI	CTGCAG	2352
		PvuI	CGATCG	4257
		PvuII	CAGCTG	2353
		SacI	GAGCTC	2042, 2341
		SalI	GTCGAC	3777
		SalI-HF	GTCGAC	3777
		Scal-HF	AGTACT	4367
		SexAI	ACCESO	2774, 3299
		SmaI	CCCGGG	3030, 3226
		SnaBI	TACGTA	1814

ES 2 683 365 T3

Vector	Mapa de características	Mapa de restricción		
		Nombre	Secuencia	Posiciones de corte
		SpeI	ACTAGT	1473
		SphI	GCATGC	2755, 2827
		Sspl	AATATT	1083, 1244, 4691
		StuI	AGGCCT	3006
		XhoI	CTCGAG	2340
		XmaI	CCCGGG	3028, 3224
		XmnI	GAANNNTTC	2679, 4486
		ZraI	GACGTC	1597, 1650, 1733, 1919, 3180
pJ602:92690	Inserto que incluye la secuencia que codifica EF1 de calbindina D9k	AatII	GACGTC	1599, 1652, 1735, 1921, 3167
(SEQ ID NO: 23)	Subdominio mano EF: 92690 - Inicio: 2108 Fin: 2429 (SEQ ID NO: 27)	Acc65I	GGTACC	2227
		Accl	GTMKAC	3756, 3763
		AclI	AACGTT	4098, 4471
		AfeI	AGCGCT	3922
	Secuencia EF1 - Inicio: 2298 Fin: 2423 (SEQ ID NO: 32)	AlwNI	CAGNNNCTG	321
		ApaI	GGGCC	974
		ApaLI	GTGCAC	416, 3466, 4539
	pUC_ori - Inicio: 2 Fin: 805	Asel	ATTAAT	1481, 2086, 2663, 3063, 4044
	Terminador rpn txn - Inicio: 977 Fin: 1090 (Complementaria)	AvaI	CYCGRG	967, 2211, 3013, 3199, 3209
	pTF3 - Inicio: 1281 Fin: 1306	AvrII	CCTAGG	2992
		BamHI	GGATCC	2202
	rpo_bla_txn_term - Inicio: 977 Fin: 1401 (Complementaria)	Bell	TGATCA	3043
		BglI	GCCNNNNNG GC	978, 1564, 1686, 1757, 3426, 3992
	Terminador txn - Inicio: 977 Fin: 1401 (Complementaria)	BglII	AGATCT	2215
		BspEI	TCCGGA	3958
		BSpHI	TCATGA	2, 4707
	Promotor CMV - Inicio: 1454 Fin: 2054	BsrBI	CCGCTC	801, 1422(C), 3175 (C), 4713 (C)
		BssHII	GCGCGC	32, 3157
	ori SV40 - Inicio: 2667 Fin: 3010	BstBI	TTCGAA	2326
		BtsI	GCAGTG	4272, 2062(C), 3700 (C), 4292 (C)
	Resistencia a zeocina - Inicio: 3121 Fin: 3495	EagI	CGGCCG	3452
		EcoRI	GAATTC	2400

ES 2 683 365 T3

Vector	Mapa de características	Mapa de restricción		
		Nombre	Secuencia	Posiciones de corte
		EcoRV	GATATC	1314
	Señal de poliadenilación de SV40 - Inicio: 3623 Fin: 3753	Fsel	GGCCGGCC	3397
		HincII	GTYRAC	1332, 1458, 3057, 3131, 3764
	ori bacteriano de alto número de copias - Inicio: 1 Fin: 804	KasI	GGCGCC	1091
		KpnI	GGTACC	2231
		MscI	TGGCCA	3124
	ZeoR - Inicio: 3124 Fin: 3486	NarI	GGCGCC	1092
	Ampicilina - Inicio: 3808 Fin: 4656 (Complementaria)	NcoI	CCATGG	1834, 2231, 2899, 3119
		NdeI	CATATG	1708, 2125
		NqoMIV	GCCGGC	3393, 3454, 3568
	AmpR - Inicio: 3814 Fin: 4656 (Complementaria)	NheI	GCTAGC	2163
		NruI	TCGCGA	4796
		NsiI	ATGCAT	2742, 2814
		PciI	ACATGT	730, 1326
		PmlI	CACGTG	3052, 3498
		PsiI	TTATAA	1134, 2594, 3644
		PspOMI	GGGCCC	970
		PstI	CTGCAG	2223
		PvuI	CGATCG	4242
		PvuII	CAGCTG	2224
		SacI	GAGCTC	2042, 2212
		SalI	GTCGAC	3762
		SalI-HF	GTCGAC	3762
		Scal-HF	AGTACT	4352
		SexAI	ACCESO	2759, 3284
		SmaI	CCCGGG	3015, 3211
		SnaBI	TACGTA	1814
		SpeI	ACTAGT	1473
		SphI	GCATGC	2740, 2812
		Sspl	AATATT	1083, 1244, 4676
		StuI	AGGCCT	2991
		XhoI	CTCGAG	2211
		XmaI	CCCGGG	3013, 3209
		XmnI	GAANNNTTC	2664, 4471
		ZraI	GACGTC	1597, 1650, 1733, 1919, 3165

Una vez expresadas, las proteínas de fusión se pueden purificar de acuerdo con procedimientos convencionales. En una realización preferida, las proteínas se purifican utilizando la matriz de afinidad de la presente invención de acuerdo con los métodos descritos a continuación.

5 Métodos

El sistema de etiqueta de afinidad de la presente invención se puede utilizar para una variedad de aplicaciones en las que se requiere fijar o inmovilizar una molécula en un sustrato.

10 En una realización, el sistema de etiqueta de afinidad se puede utilizar para detectar la presencia de una molécula en una muestra que contiene una mezcla de moléculas, por ejemplo para detectar una molécula o proteína biológica específica en una muestra biológica que contiene muchos tipos diferentes de moléculas biológicas. La molécula o proteína de interés se une a una etiqueta mano EF del tipo descrito anteriormente, y la muestra que contiene la molécula o proteína etiquetada con EF se pone en contacto a continuación con una matriz de afinidad de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente que comprende el ligando de afinidad de mano EF cognado. Cualquier molécula no unida se elimina mediante lavado dejando solo unidas moléculas etiquetadas con mano EF inmovilizadas en el sustrato de la matriz de afinidad. La detección de moléculas unidas se puede llevar a cabo utilizando cualquier medio adecuado conocido por los expertos en la técnica, incluyendo la detección de proteínas unidas utilizando anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos capaces de reconocer la proteína de interés.

En otra realización, el sistema de etiqueta de afinidad de la invención puede utilizarse para generar una "matriz" de proteínas, tal como una matriz de proteínas para uso en la detección de la unión de un ligando o compuesto inhibidor a proteínas de interés. En estas circunstancias, el sustrato de la matriz de afinidad puede adoptar la forma de una matriz de "chip" o en fase sólida a la que se anclan múltiples ligandos de afinidad de mano EF. En el contexto de la presente invención, el término "múltiple" significa que se pueden inmovilizar en el sustrato al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, etc. y hasta al menos 1000, 5000, 10.000 etc. proteínas de fusión etiquetadas con mano EF del tipo descrito anteriormente mediante la unión a los ligandos de afinidad de mano EF anclados a la misma, para producir una matriz de proteínas. En una realización, las proteínas etiquetadas con mano EF son diferentes de manera que en el "chip" o "matriz" se muestran múltiples proteínas en cualquier momento. Los ligandos o compuestos inhibidores para someterlos a ensayo se pueden aplicar a la matriz de proteínas en condiciones adecuadas de manera que se capturan ligandos o compuestos inhibidores con afinidad de unión para cualquiera de las proteínas mostradas. Cualquier material no unido puede eliminarse por lavado y cualquier ligando unido o compuesto inhibidor puede detectarse mediante mecanismos conocidos por los expertos en la técnica.

Las matrices de proteínas descritas anteriormente se pueden modificar para mostrar diferentes conjuntos de proteínas dependiendo de la aplicación requerida. Por ejemplo, se puede separar un primer conjunto de proteínas etiquetadas con mano EF ancladas a la matriz de afinidad mediante la adición de un agente de liberación adecuado. Los agentes de liberación adecuados incluyen cualquier agente capaz de interrumpir la interacción entre la etiqueta mano EF de las proteínas y el ligando de afinidad de mano EF de la matriz de afinidad. Una vez que las proteínas etiquetadas con EF se separan de la matriz, la matriz se puede volver a cargar con un conjunto diferente de proteínas etiquetadas con mano EF. De esta forma, las matrices de afinidad de la invención en forma de chips o matrices recubiertas con ligandos de afinidad de mano EF pueden reciclarse para producir diferentes matrices de proteínas para su uso posterior.

En una realización preferida, el sistema de etiqueta de afinidad de la presente invención se puede utilizar para purificar moléculas, tales como moléculas biológicas, etiquetadas con un subdominio de mano EF o un fragmento del mismo a partir de una muestra. En una realización particularmente preferida, el sistema de etiqueta de afinidad se utiliza para purificar proteínas o polipéptidos a partir de una muestra. En un primer paso, la molécula o proteína de interés se marca con una etiqueta mano EF como se describió anteriormente. En una segunda etapa, se pone en contacto una muestra que contiene una molécula de interés etiquetada con EF-mano con una matriz de afinidad que comprende un subdominio de mano EF o fragmento del mismo anclado a un sustrato. El subdominio de mano EF o fragmento del mismo de la matriz de afinidad, es decir el ligando de afinidad de mano EF debe ser capaz de unirse a la etiqueta mano EF anclada a la molécula de interés.

La muestra que contiene la molécula etiquetada con mano EF de interés se pone en contacto con la matriz de afinidad en condiciones que permiten la unión de la etiqueta mano EF y el ligando de afinidad de mano EF. La molécula etiquetada con mano EF que se debe purificar generalmente se pone en contacto con la matriz de afinidad en una solución o tampón que incluye iones de calcio (u otro ion u otro equivalente que pueda sustituir al calcio) para facilitar la unión de la molécula etiquetada a la matriz. La unión de la molécula etiquetada con mano EF puede producirse a concentraciones de calcio superiores a 10 nM. En presencia de calcio, la K_D para la unión de los subdominios de mano EF o fragmentos de los mismos típicamente será menor que 1 μ M, preferiblemente menor que 100 nM y más preferiblemente menor que 10 nM.

Cualquier material no unido en la muestra se puede eliminar, por ejemplo, mediante el lavado de la matriz de afinidad. En una etapa final, la molécula de interés puede liberarse de la matriz de afinidad utilizando cualquier agente liberador adecuado. Generalmente, utilizando los métodos de la invención, se obtiene una composición sustancialmente pura con una homogeneidad de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

El agente de liberación puede ser cualquier agente capaz de separar la molécula de interés de la matriz de afinidad. En una realización, el agente de liberación es un agente capaz de interrumpir la interacción entre la etiqueta mano EF y el ligando de afinidad de mano EF de la matriz. Los agentes adecuados para este fin incluyen agentes capaces de secuestrar o quelar calcio. Los quelantes de calcio son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, entre otros, EDTA, EGTA, desferal, bifosfonato, ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), BAPTA/AM, EGTA/AM, 5N-BAPTA, 5,5'Br₂-BAPTA, fura-2, Quin-2 y similares.

En una realización adicional alternativa o en algunos casos, el agente de liberación es un agente capaz de escindir la molécula de interés de la etiqueta mano EF de manera que la molécula de interés se separe de la matriz de afinidad. Como se describió anteriormente, la etiqueta mano EF se puede anclar a la molécula de interés a través de un conector escindible. Cuando la molécula de interés es un polipéptido o proteína anclados a la etiqueta mano EF a través de un conector polipeptídico, el conector polipeptídico se puede diseñar de manera que contenga un sitio de reconocimiento de proteasa. Se puede utilizar cualquier proteasa capaz de reconocer el sitio de escisión del conector de polipéptido para liberar la proteína de interés de la etiqueta mano EF y separar de ese modo la proteína de interés de la matriz de afinidad.

Para los métodos de purificación por afinidad descritos en la presente memoria, la matriz de afinidad puede adoptar cualquier forma adecuada. Por ejemplo, la matriz de afinidad puede ocupar el interior de una columna de purificación de afinidad a la que se aplica una muestra. Cualquier material no unido puede separarse de las proteínas etiquetadas con EF unidas mediante lavado de la columna.

En una realización preferida, la matriz de afinidad comprende un sustrato de nanopartículas, en particular nanopartículas de sílice, con ligandos de afinidad de mano EF anclados. La muestra que contiene las proteínas etiquetadas con mano EF se mezcla con las nanopartículas en condiciones que permiten la unión entre los subdominios de mano EF. Las moléculas etiquetadas con mano EF unidas a las nanopartículas se pueden recoger mediante centrifugación en condiciones adecuadas para la sedimentación específica de las nanopartículas. Se pueden emplear diversas etapas de lavado para mejorar la pureza de la preparación de proteína, como entenderán fácilmente los expertos en la técnica.

En una aplicación adicional, el sistema de etiqueta de afinidad de la invención se puede utilizar para lograr el suministro dirigido de moléculas de interés. En una realización, el sistema de etiqueta de afinidad se puede utilizar para dirigir la administración de fármacos a sitios concretos dentro del organismo de un paciente que se vaya a tratar. Bajo estas circunstancias, el sustrato de la matriz de afinidad puede comprender un agente de direccionamiento, por ejemplo un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, capaz de reconocer un antígeno presente dentro de un tejido concreto o sobre una célula concreta dentro del organismo. La matriz de afinidad estaría así localizada en un sitio concreto dentro del organismo. La etiqueta mano EF podría anclarse a cualquier molécula o fármaco destinados a ser administrados a un paciente. La molécula o fármaco etiquetados con mano EF, una vez administrados al paciente, se localizarían así en el sitio de la matriz de afinidad a través de la interacción con el ligando de afinidad de mano EF cognado. Este enfoque se puede utilizar en particular para dirigir fármacos relativamente no específicos o tóxicos a su sitio de acción y de ese modo reducir la dosis global necesaria para la administración a un paciente.

La invención se comprenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

1. Producción de una proteína de fusión de mano EF - scFv-EF1

El gen de cadena pesada variable, la secuencia del conector de glicina serina y la secuencia del gen de la cadena ligera variable se escindieron del clon anti-scFv de ubiquitina (biblioteca Tomlinson I, recurso MRC Gene) utilizando los sitios de restricción Nco I/Not I. El fragmento escindido se purificó en gel y se ligó al vector de clonación pJexpress411:59935 - pelBEF1a optEc1 (pJexpress-pelB-EF1, Figura 1) que había sido digerido con los sitios de restricción Nco I/Not I y purificado en gel. La mezcla de ligación se utilizó para transformar químicamente células BL21 competentes de *E. coli*. Se preparó un cultivo durante la noche de *E. coli* BL21 transformadas con pJExpress pelB-anti-ubiquitin scFv-EF1 recogiendo una sola colonia de las bacterias transformadas en 2 mL de 2 x TY/100 µg/ml de ampicilina/glucosa al 2% (p/v). El cultivo de una noche se utilizó para inocular 2 litros de 2 x TY/100 µg/ml de ampicilina/glucosa al 0,1% (p/v) que se cultivó en una incubadora con movimiento oscilante a 37°C hasta que se obtuvo una DO_{600nm} de aprox.

Se añadió IPTG 1.0. (Sigma) a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de la proteína de fusión scFv-EF1 y el cultivo de expresión se transfirió a una incubadora con movimiento oscilante a 30°C ajustada a 250 rpm. Después de una incubación de 4 h, las bacterias se sedimentaron por centrifugación a 4000 **g** durante 20 min. A continuación se añadieron 50 mL de tampón de extracción periplasmático enfriado con hielo (Tris-HCl 30 mM, pH 8,0, sacarosa al 20% (p/v), EDTA 1 mM) a los sedimentos bacterianos para la resuspensión. Las bacterias se centrifugaron de nuevo a 4000 **g** durante 20 min y se retuvo el sobrenadante. A continuación se añadieron 50 mL tampón de choque osmótico enfriado con hielo (MgSO₄ 5 mM) a los gránulos bacterianos. La preparación fue nuevamente centrifugada a 4000 **g** durante 20 min y se retuvo el sobrenadante. Los sobrenadantes de la extracción periplásmica y la extracción de choque osmótico se combinaron y centrifugaron a 17.500 **g** durante 20 minutos para retirar los restos celulares.

2. Producción de una matriz de afinidad de mano EF

Se sedimentó 1 mg de nanopartículas (5 mg/ml) de SiO₂-COOH 70 nm en una microcentrifuga a 10.000 RPM durante 5 minutos. Se mezclaron primero volúmenes iguales de NHS 0,1 M y EDC 0,4 M, y se utilizaron 100 µl de la mezcla para volver a suspender las nanopartículas. La EDC/NHS se eliminó de las nanopartículas después de una breve centrifugación (5 min) a 10.000 RPM en una microcentrifuga. Se utilizaron 100 microlitros de una solución de PDEA, preparada disolviendo 4,5 mg de PDEA en 205 µl de tampón de borato 0,1 M a pH 8,5, para resuspender las partículas para introducir un grupo disulfuro reactivo en grupos carboxilo de las nanopartículas carboxiladas. Las nanopartículas se sedimentaron una vez más y se retiró el sobrenadante. A continuación, se utilizó EF2-GGC a 0,1 mg/ml en 100 µl de tampón de formiato sódico 10 mM a pH 4,3 para resuspender las partículas y se dejó incubar durante 10 minutos. La Cys C-terminal de EF2-GGC se utilizó para crear un enlace covalente entre el EF2-GGC inmovilizado en la superficie de las nanopartículas. La desactivación del exceso de disulfuros reactivos en la superficie de las nanopartículas se realizó resuspendiendo las partículas sedimentadas en 200 µl de L-cisteína 50 mM con NaCl 1 M en tampón de formiato 100 mM a pH 4,3. Las nanopartículas de EF2-SiO₂ resultantes se reconstituyeron en Tris HCl 10 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 150 mM.

3. Purificación de proteínas de scFv-EF1 utilizando el sistema de etiqueta de afinidad mano EF

Los sobrenadantes agrupados de la extracción periplásmica y la extracción de choque osmótico se sometió a cambio de tampón en Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 150 mM a pH 7,4 utilizando un cartucho centriprep YM-10 con centrifugación a 3.000 xg. A continuación se incubó 1 mL de la preparación sometida a intercambio con 0,1 mg/ml de nanopartículas de EF2-SiO₂ en un agitador rotativo, girando durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 10.000 RPM en una microcentrifuga durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y se guardó. La mezcla de nanopartículas se lavó luego dos veces en 150 µl de tampón de lavado de calcio (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 150 mM, pH 7,4). Las nanopartículas se eluyeron a continuación dos o tres veces en 150 µl de tampón de elución con EDTA (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Las fracciones resultantes (sobrenadantes, lavados y productos eluidos) se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% y se visualizaron mediante tinción con Coomassie y decoloración (Figura 2).

4. Producción de proteína de fusión EF1-Snap25 a partir de pEF1-N

La secuencia codificante para la proteína asociada a sinaptosomas humanos, 25 kDa (SNAP25) (número de acceso: NM_130811) se amplificó a partir de una construcción de vector utilizando cebadores de clonación de PCR específicos de gen: -

Snap25-BamHI	TGG GGA TCC ATG GCC GAA GAC (SEC ID NO: 28)
Snap25-NcoI	ATC CCA TGG TTA ACC ACT TCC CAG (SEQ ID NO: 29)

El producto de PCR se digirió con enzimas de restricción BamHI y NcoI que cortan dentro de los sitios de restricción incorporados a las secuencias de cebador de clonación. El producto de PCR digerido se purificó y se ligó a la secuencia de clonación múltiple del vector de expresión terminal pEFTag-N (pEF1-N, Figura 4) que se había digerido con las mismas enzimas de restricción y se purificó en gel. Brevemente, se añadió 1 µl de ADN ligasa T4 a una razón 2:1 de inserto génico con respecto a vector en una reacción de 20 µl durante 10 minutos. Se utilizaron 5 µl de esta reacción de ligación para transformar células de E. coli BL21 Rosetta competentes y se recogió una colonia transformada única y se inoculó s 5 mL de Overnight Express Autoinduction Media (Novagen) y se cultivó durante 8 horas a 37°C, de los cuales se utilizaron 2 mL. para inocular 100 mL de medio de cultivo. Después de 16 horas de crecimiento, las células se sedimentaron y las proteínas se purificaron en condiciones desnaturalizantes o nativas. Brevemente, la preparación desnaturalizante implicó la lisis de gránulos bacterianos con tampón de lisis que contenía Urea 8 M con purificación posterior en esferas de agarosa de Ni-NTA en un gradiente de pH de pH 8 a pH 4,5. La purificación nativa se realizó mediante la suspensión de sedimentos bacterianos en un tampón Tris con NaCl 300 mM y la sonicación de células con una micropunta sonicadora a 60W.

5. Purificación de proteína de EF1-Snap25 utilizando el sistema de etiqueta de afinidad mano EF

Se purificó EF1-Snap25 a partir de producto lisado bacteriano aclarado después de la incubación de 1 mL de producto lisado nativo con 0,1 mg/ml de nanopartículas de EF2-SiO₂ en un agitador rotativo, girando durante al menos 1 hora a 4°C. La mezcla se centrifugó a 10.000 RPM en una microcentrífuga durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y se guardó. La mezcla de nanopartículas se lavó a continuación dos veces en 150 µl de tampón de lavado de calcio (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 1 mM), KCl 150 mM pH 7,4). Las nanopartículas se eluyeron a continuación dos veces en 250 µl de tampón de elución con EDTA (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Las fracciones resultantes (sobrenadantes, lavados y productos eluidos) se analizaron mediante electroforesis como se muestra en la Figura 3A.

EF1-Snap25 también se purificó utilizando la secuencia 6xHis incorporada a la secuencia del vector EF1-N. Utilizando cromatografía de afinidad de metal inmovilizado y esferas de agarosa Ni-NTA, la proteína EF1-Snap25 se purificó incubando 5 mL de producto lisado nativo con 1 mL de suspensión de agarosa Ni-NTA (aproximadamente 0,25-0,5 g/ml) y colocándolo en una columna de cromatografía. La columna se lavó en tampón que contenía imidazol 10 - 20 mM seguido de elución en 1 mL de tampón de lisis nativo que contenía 250 mM de imidazol. Este protocolo de purificación se realizó como control positivo para la purificación de EF1-Snap25 a través del protocolo EF1-EF2. Los resultados se muestran en la Figura 3B.

20 Conclusión

El sistema de etiqueta de afinidad mano EF facilitó un protocolo de purificación significativamente más rápido que la purificación con etiqueta His, con la recuperación basada en centrifugación que facilita la purificación de proteína en un tiempo significativamente más corto que la cromatografía de afinidad de metal inmovilizado empleada con el método de etiqueta His. La recuperación de proteína también fue significativamente mejor utilizando el sistema de etiqueta de afinidad mano EF que requiere muy poca matriz de afinidad (es decir, nanopartículas de EF2) para purificar cantidades equivalentes de proteína como se muestra en la Figura 3. Como consecuencia, se logró una pureza mucho más alta en un marco temporal mucho más corto. Es importante destacar que para las proteínas sensibles, la elución con EDTA de proteína es un tratamiento mucho más suave que el protocolo de elución con imidazol utilizado para proteínas etiquetadas con His. Utilizando el sistema de etiqueta de afinidad mano EF, muy a menudo la preparación de proteína resultante no requerirá diálisis, mientras que este es un requisito previo con la proteína etiquetada con His eluida con imidazol. En resumen, existe una ventaja significativa al utilizar el sistema de etiqueta de afinidad mano EF en términos de velocidad de purificación, rendimiento de proteína purificada y condiciones óptimas de la proteína. El alcance de la presente invención no debe estar limitado por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las descritas en la presente memoria serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas.

40 LISTA DE SECUENCIAS

<110> University College Dublin

<120> Sistema de etiquetas de afinidad

45 <130> P106453WO00

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.5

50

<210> 1

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

55

<220>

<223> Fragmento

60

<400> 1

ES 2 683 365 T3

Ser Thr Leu Asp Glu Leu Phe Glu Glu Leu Asp Lys Asn Gly Asp Gly
1 5 10 15

Glu Val Ser Phe Glu Glu Phe Gln Val Leu Val Lys Lys Ile Ser Gln
20 25 30

<210> 2
<211> 43
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Fragmento

10

<400> 2

Lys Ser Pro Glu Glu Leu Lys Gly Ile Phe Glu Lys Tyr Ala Ala Lys
1 5 10 15

Glu Gly Asp Pro Asn Gln Leu Ser Lys Glu Glu Leu Lys Leu Leu Leu
20 25 30

Gly Thr Glu Phe Pro Ser Leu Leu Lys Gly Met
35 40

15 <210> 3
<211> 149
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 3

Met Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala
1 5 10 15

ES 2 683 365 T3

Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu
 20 25 30

Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu
 35 40 45

Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile
 50 55 60

Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr
 65 70 75 80

Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp
 85 90 95

Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn
 100 105 110

Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu
 115 120 125

Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln
 130 135 140

Met Met Thr Ala Lys
 145

<210> 4
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 4

Met Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala
 1 5 10 15

Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu
 20 25 30

Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu
 35 40 45

Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile
 50 55 60

Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr
 65 70 75 80

10

ES 2 683 365 T3

Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp
 85 90 95

Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn
 100 105 110

Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu
 115 120 125

Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln
 130 135 140

Met Met Thr Ala Lys
 145

<210> 5
 <211> 148
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe
 1 5 10 15

Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu
 20 25 30

Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu
 35 40 45

Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp
 50 55 60

Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp
 65 70 75 80

Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly
 85 90 95

Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu
 100 105 110

Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala
 115 120 125

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met
 130 135 140

Met Thr Ala Lys
 145

10
 15 <210> 6
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 683 365 T3

<400> 6

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

5

<210> 7
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 7

Met Ala Gly Glu Leu Thr Pro Glu Glu Glu Ala Gln Tyr Lys Lys Ala
 1 5 10 15
 Phe Ser Ala Val Asp Thr Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asn Ala Gln Glu

ES 2 683 365 T3

20 25 30
 Leu Gly Ala Ala Leu Lys Ala Thr Gly Lys Asn Leu Ser Glu Ala Gln
 35 40 45
 Leu Arg Lys Leu Ile Ser Glu Val Asp Ser Asp Gly Asp Gly Glu Ile
 50 55 60
 Ser Phe Gln Glu Phe Leu Thr Ala Ala Arg Lys Ala Arg Ala Gly Leu
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Gln Val Ala Phe Arg Ala Phe Asp Gln Asp Gly Asp Gly
 85 90 95
 His Ile Thr Val Asp Glu Leu Arg Arg Ala Met Ala Gly Leu Gly Gln
 100 105 110
 Pro Leu Pro Gln Glu Glu Leu Asp Ala Met Ile Arg Glu Ala Asp Val
 115 120 125
 Asp Gln Asp Gly Arg Val Asn Tyr Glu Glu Phe Ala Arg Met Leu Ala
 130 135 140
 Gln Glu
 145

<210> 8
 <211> 181
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

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

10

ES 2 683 365 T3

85 90 95

Leu Met Gly Val Tyr His Glu Lys Ala Gln Asn Gln Glu Ser Glu Leu
100 105 110

Arg Ala Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Glu Gly Lys Gly Tyr Ile Asp
115 120 125

Trp Asn Thr Leu Lys Tyr Val Leu Met Asn Ala Gly Glu Pro Leu Asn
130 135 140

Glu Val Glu Ala Glu Gln Met Met Lys Glu Ala Asp Lys Asp Gly Asp
145 150 155 160

Arg Thr Ile Asp Tyr Glu Glu Phe Val Ala Met Met Thr Gly Glu Ser
165 170 175

Phe Lys Leu Ile Gln
180

<210> 9
 <211> 260
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

Ala Glu Ser His Leu Gln Ser Ser Leu Ile Thr Ala Ser Gln Phe Phe
1 5 10 15

Glu Ile Trp Leu His Phe Asp Ala Asp Gly Ser Gly Tyr Leu Glu Gly
20 25 30

Lys Glu Leu Gln Asn Leu Ile Gln Glu Leu Gln Gln Ala Arg Lys Lys
35 40 45

Ala Gly Leu Glu Leu Ser Pro Glu Met Lys Thr Phe Val Asp Gln Tyr
50 55 60

Gly Gln Arg Asp Asp Gly Lys Ile Gly Ile Val Glu Leu Ala His Val
65 70 75 80

Leu Pro Thr Glu Glu Asn Phe Leu Leu Leu Phe Arg Cys Gln Gln Leu
85 90 95

Lys Ser Cys Glu Glu Phe Met Lys Thr Trp Arg Lys Tyr Asp Thr Asp
100 105 110

His Ser Gly Phe Ile Glu Thr Glu Glu Leu Lys Asn Phe Leu Lys Asp

10

ES 2 683 365 T3

115 120 125

Leu Leu Glu Lys Ala Asn Lys Thr Val Asp Asp Thr Lys Leu Ala Glu
 130 135 140

Tyr Thr Asp Leu Met Leu Lys Leu Phe Asp Ser Asn Asn Asp Gly Lys
 145 150 155 160

Leu Glu Leu Thr Glu Met Ala Arg Leu Leu Pro Val Gln Glu Asn Phe
 165 170 175

Leu Leu Lys Phe Gln Gly Ile Lys Met Cys Gly Lys Glu Phe Asn Lys
 180 185 190

Ala Phe Glu Leu Tyr Asp Gln Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Glu Asn
 195 200 205

Glu Leu Asp Ala Leu Leu Lys Asp Leu Cys Glu Lys Asn Lys Gln Asp
 210 215 220

Leu Asp Ile Asn Asn Ile Thr Thr Tyr Lys Lys Asn Ile Met Ala Leu
 225 230 235 240

Ser Asp Gly Gly Lys Leu Tyr Arg Thr Asp Leu Ala Leu Ile Leu Cys
 245 250 255

Ala Gly Asp Asn
 260

<210> 10
 <211> 271
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ala Gly Pro Gln Gln Gln Pro Pro Tyr Leu His Leu Ala Glu Leu
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Gln Phe Leu Glu Ile Trp Lys His Phe Asp Ala Asp Gly
 20 25 30

Asn Gly Tyr Ile Glu Gly Lys Glu Leu Glu Asn Phe Phe Gln Glu Leu
 35 40 45

Glu Lys Ala Arg Lys Gly Ser Gly Met Met Ser Lys Ser Asp Asn Phe
 50 55 60

10 Gly Glu Lys Met Lys Glu Phe Met Gln Lys Tyr Asp Lys Asn Ser Asp

ES 2 683 365 T3

20 25 30

Lys Leu Leu Ile Gln Ala Glu Phe Pro Ser Leu Leu Lys Gly Pro Asn
 35 40 45

Thr Leu Asp Asp Leu Phe Gln Glu Leu Asp Lys Asn Gly Asp Gly Glu
 50 55 60

Val Ser Phe Glu Glu Phe Gln Val Leu Val Lys Lys Ile Ser Gln
 65 70 75

<210> 12
 <211> 200
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Met Gly Asn Ser Lys Ser Gly Ala Leu Ser Lys Glu Ile Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Leu Gln Leu Asn Thr Lys Phe Ser Glu Glu Leu Cys Ser Trp Tyr
 20 25 30

Gln Ser Phe Leu Lys Asp Cys Pro Thr Gly Arg Ile Thr Gln Gln Gln
 35 40 45

Phe Gln Ser Ile Tyr Ala Lys Phe Phe Pro Asp Thr Asp Pro Lys Ala
 50 55 60

Tyr Ala Gln His Val Phe Arg Ser Phe Asp Ser Asn Leu Asp Gly Thr
 65 70 75 80

Leu Asp Phe Lys Glu Tyr Val Ile Ala Leu His Met Thr Thr Ala Gly
 85 90 95

Lys Thr Asn Gln Lys Leu Glu Trp Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Val Asp
 100 105 110

Gly Asn Gly Thr Ile Ser Lys Asn Glu Val Leu Glu Ile Val Met Ala
 115 120 125

Ile Phe Lys Met Ile Thr Pro Glu Asp Val Lys Leu Leu Pro Asp Asp
 130 135 140

Glu Asn Thr Pro Glu Lys Arg Ala Glu Lys Ile Trp Lys Tyr Phe Gly
 145 150 155 160

Lys Asn Asp Asp Asp Lys Leu Thr Glu Lys Glu Phe Ile Glu Gly Thr

10

ES 2 683 365 T3

165

170

175

Leu Ala Asn Lys Glu Ile Leu Arg Leu Ile Gln Phe Glu Pro Gln Lys
 180 185 190

Val Lys Glu Lys Met Lys Asn Ala
 195 200

<210> 13
 <211> 190
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Met Gly Lys Ser Asn Ser Lys Leu Lys Pro Glu Val Val Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Thr Arg Lys Thr Tyr Phe Thr Glu Lys Glu Val Gln Gln Trp Tyr Lys
 20 25 30

Gly Phe Ile Lys Asp Cys Pro Ser Gly Gln Leu Asp Ala Ala Gly Phe
 35 40 45

Gln Lys Ile Tyr Lys Gln Phe Phe Pro Phe Gly Asp Pro Thr Lys Phe
 50 55 60

Ala Thr Phe Val Phe Asn Val Phe Asp Glu Asn Lys Asp Gly Arg Ile
 65 70 75 80

Glu Phe Ser Glu Phe Ile Gln Ala Leu Ser Val Thr Ser Arg Gly Thr
 85 90 95

Leu Asp Glu Lys Leu Arg Trp Ala Phe Lys Leu Tyr Asp Leu Asp Asn
 100 105 110

Asp Gly Tyr Ile Thr Arg Asn Glu Met Leu Asp Ile Val Asp Ala Ile
 115 120 125

Tyr Gln Met Val Gly Asn Thr Val Glu Leu Pro Glu Glu Glu Asn Thr
 130 135 140

Pro Glu Lys Arg Val Asp Arg Ile Phe Ala Met Met Asp Lys Asn Ala
 145 150 155 160

Asp Gly Lys Leu Thr Leu Gln Glu Phe Gln Glu Gly Ser Lys Ala Asp
 165 170 175

10 Pro Ser Ile Val Gln Ala Leu Ser Leu Tyr Asp Gly Leu Val
 180 185 190

15 <210> 14
 <211> 161
 <212> PRT

ES 2 683 365 T3

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

5 Glu

<210> 15

<211> 110

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 15

Met Ser Met Thr Asp Leu Leu Asn Ala Glu Asp Ile Lys Lys Ala Val
 1 5 10 15

15

ES 2 683 365 T3

Gly Ala Phe Ser Ala Thr Asp Ser Phe Asp His Lys Lys Phe Phe Gln
 20 25 30
 Met Val Gly Leu Lys Lys Lys Ser Ala Asp Asp Val Lys Lys Val Phe
 35 40 45
 His Met Leu Asp Lys Asp Lys Ser Gly Phe Ile Glu Glu Asp Glu Leu
 50 55 60
 Gly Phe Ile Leu Lys Gly Phe Ser Pro Asp Ala Arg Asp Leu Ser Ala
 65 70 75 80
 Lys Glu Thr Lys Met Leu Met Ala Ala Gly Asp Lys Asp Gly Asp Gly
 85 90 95
 Lys Ile Gly Val Asp Glu Phe Ser Thr Leu Val Ala Glu Ser
 100 105 110

<210> 16
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 16

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

10

ES 2 683 365 T3

Asp Leu Leu Glu Lys Ala Asn Lys Thr Val Asp Asp Thr Lys Leu Ala
 130 135 140

Glu Tyr Thr Asp Leu Met Leu Lys Leu Phe Asp Ser Asn Asn Asp Gly
 145 150 155 160

Lys Leu Glu Leu Thr Glu Met Ala Arg Leu Leu Pro Val Gln Glu Asn
 165 170 175

Phe Leu Leu Lys Phe Gln Gly Ile Lys Met Cys Gly Lys Glu Phe Asn
 180 185 190

Lys Ala Phe Glu Leu Tyr Asp Gln Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Glu
 195 200 205

Asn Glu Leu Asp Ala Leu Leu Lys Asp Leu Cys Glu Lys Asn Lys Gln
 210 215 220

Asp Leu Asp Ile Asn Asn Ile Thr Thr Tyr Lys Lys Asn Ile Met Ala
 225 230 235 240

Leu Ser Asp Gly Gly Lys Leu Tyr Arg Thr Asp Leu Ala Leu Ile Leu
 245 250 255

Cys Ala Gly Asp Asn
 260

<210> 17
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 17

Met Asp Ser Ser Arg Glu Pro Thr Leu Gly Arg Leu Asp Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Phe Trp Gln Val Trp Gln Arg Phe Asp Ala Asp Glu Lys Gly Tyr Ile
 20 25 30

Glu Glu Lys Glu Leu Asp Ala Phe Phe Leu His Met Leu Met Lys Leu
 35 40 45

Gly Thr Asp Asp Thr Val Met Lys Ala Asn Leu His Lys Val Lys Gln
 50 55 60

Gln Phe Met Thr Thr Gln Asp Ala Ser Lys Asp Gly Arg Ile Arg Met
 65 70 75 80

10

ES 2 683 365 T3

Lys Glu Leu Ala Gly Met Phe Leu Ser Glu Asp Glu Asn Phe Leu Leu
85 90 95

Leu Phe Arg Arg Glu Asn Pro Leu Asp Ser Ser Val Glu Phe Met Gln
100 105 110

Ile Trp Arg Lys Tyr Asp Ala Asp Ser Ser Gly Phe Ile Ser Ala Ala
115 120 125

Glu Leu Arg Asn Phe Leu Arg Asp Leu Phe Leu His His Lys Lys Ala
130 135 140

Ile Ser Glu Ala Lys Leu Glu Glu Tyr Thr Gly Thr Met Met Lys Ile
145 150 155 160

Phe Asp Arg Asn Lys Asp Gly Arg Leu Asp Leu Asn Asp Leu Ala Arg
165 170 175

Ile Leu Ala Leu Gln Glu Asn Phe Leu Leu Gln Phe Lys Met Asp Ala
180 185 190

Cys Ser Thr Glu Glu Arg Lys Arg Asp Phe Glu Lys Ile Phe Ala Tyr
195 200 205

Tyr Asp Val Ser Lys Thr Gly Ala Leu Glu Gly Pro Glu Val Asp Gly
210 215 220

Phe Val Lys Asp Met Met Glu Leu Val Gln Pro Ser Ile Ser Gly Val
225 230 235 240

Asp Leu Asp Lys Phe Arg Glu Ile Leu Leu Arg His Cys Asp Val Asn
245 250 255

Lys Asp Gly Lys Ile Gln Lys Ser Glu Leu Ala Leu Cys Leu Gly Leu
260 265 270

Lys Ile Asn Pro
275

<210> 18
<211> 271
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

10 Met Ala Gly Pro Gln Gln Gln Pro Pro Tyr Leu His Leu Ala Glu Leu
1 5 10 15

ES 2 683 365 T3

Thr Ala Ser Gln Phe Leu Glu Ile Trp Lys His Phe Asp Ala Asp Gly
 20 25 30

Asn Gly Tyr Ile Glu Gly Lys Glu Leu Glu Asn Phe Phe Gln Glu Leu
 35 40 45

Glu Lys Ala Arg Lys Gly Ser Gly Met Met Ser Lys Ser Asp Asn Phe
 50 55 60

Gly Glu Lys Met Lys Glu Phe Met Gln Lys Tyr Asp Lys Asn Ser Asp
 65 70 75 80

Gly Lys Ile Glu Met Ala Glu Leu Ala Gln Ile Leu Pro Thr Glu Glu
 85 90 95

Asn Phe Leu Leu Cys Phe Arg Gln His Val Gly Ser Ser Ala Glu Phe
 100 105 110

Met Glu Ala Trp Arg Lys Tyr Asp Thr Asp Arg Ser Gly Tyr Ile Glu
 115 120 125

Ala Asn Glu Leu Lys Gly Phe Leu Ser Asp Leu Leu Lys Lys Ala Asn
 130 135 140

Arg Pro Tyr Asp Glu Pro Lys Leu Gln Glu Tyr Thr Gln Thr Ile Leu
 145 150 155 160

Arg Met Phe Asp Leu Asn Gly Asp Gly Lys Leu Gly Leu Ser Glu Met
 165 170 175

Ser Arg Leu Leu Pro Val Gln Glu Asn Phe Leu Leu Lys Phe Gln Gly
 180 185 190

Met Lys Leu Thr Ser Glu Glu Phe Asn Ala Ile Phe Thr Phe Tyr Asp
 195 200 205

Lys Asp Arg Ser Gly Tyr Ile Asp Glu His Glu Leu Asp Ala Leu Leu
 210 215 220

Lys Asp Leu Tyr Glu Lys Asn Lys Lys Glu Met Asn Ile Gln Gln Leu
 225 230 235 240

Thr Asn Tyr Arg Lys Ser Val Met Ser Leu Ala Glu Ala Gly Lys Leu
 245 250 255

Tyr Arg Lys Asp Leu Glu Ile Val Leu Cys Ser Glu Pro Pro Met
 260 265 270

5 <210> 19
 <211> 4185
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>

ES 2 683 365 T3

<223> Plásmido

<400> 19

```

ctcatgacca aaatccctta acgtgagtta cgcgcgcgtc gttccactga gcgtcagacc      60
ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct      120
tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa      180
ctctttttcc gaaggttaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gttcttctag      240
tgtagccgta gttagcccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgcctc      300
tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg      360
actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca      420
cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat      480
gagaaagcgc cacgcttccc gaaggggagaa aggcggacag gtatccgta agcggcaggg      540
tcggaacagg agagcgcacg aggggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc      600
ctgtcggggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc      660
ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg ccttttttacg gttcctggcc ttttctggc      720
cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg      780
cctttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga      840
gcgaggaagc ggaaggcag agtagggaac tgccaggcat caaactaagc agaaggcccc      900
tgacggatgg cctttttgcg tttctacaaa ctctttctgt gttgtaaac gacggccagt      960
cttaagctcg ggccccctgg gcggttctga taacgagtaa tcgttaatcc gcaaataacg     1020
taaaaacccg cttcggcggg tttttttatg gggggagttt agggaaagag catttgtcag     1080
aatatttaag gggcctgtc actttgcttg atatatgaga attatttaac cttataaatg     1140
agaaaaaagc aacgcacttt aaataagata cgttgctttt tcgattgatg aacacctata     1200
attaaactat tcatctatta tttatgattt tttgtatata caatatttct agtttgtaa     1260
agagaattaa gaaaataaat ctcgaaaata ataaaggaa aatcagtttt tgatatcaaa     1320
attatacatg tcaacgataa tacaaaatat aatacaaact ataagatgtt atcagtattt     1380
attatgcatt tagaataaat tttgtgtcgc ccttccgcga aattaatagc actcactata     1440
ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaataa ttttgtttaa ctttaggag     1500
ataaaacata tgaaatacct attgcctacg gcagccgctg gattgttatt actcgcggcc     1560

```

5

ES 2 683 365 T3

cagccggcca tggccgagat gaccagggc gccgcaggcg gttctggttc cggtagcagc 1620
 aagagcccgg aagagctgaa aggcaccttc gagaagtatg cggcgaaaga gggcgacccg 1680
 aaccaactga gcaaagaaga actgaagctg ctgctgcaaa ccgagtttcc gagcctgctg 1740
 aagggtatgt aactcgagcc ccctagcata accccttggg gcctctaaac gggctctgag 1800
 gggttttttg cccctgagac gcgtcaatcg agttcgtacc taagggcgac accccctaata 1860
 tagcccgggc gaaaggcca gtcttctgac tgagccttcc gttttatttg atgcctggca 1920
 gttccctact ctcgcatggg gagtccccac actaccatcg gcgctacggc gtttcacttc 1980
 tgagttcggc atggggtcag gtgggaccac cgcgctactg ccgccaggca aacaaggggt 2040
 gttatgagcc atattcaggt ataaatgggc tcgcgataat gttcagaatt ggttaattgg 2100
 ttgtaacact gaccocattt tgtttatttt tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca 2160
 tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagaat atgagccata 2220
 ttcaacggga aacgtcgagg ccgcgattaa attccaacat ggatgctgat ttatatgggt 2280
 ataaatgggc tcgcgataat gtcgggcaat caggtgcgac aatctatcgc ttgtatggga 2340
 agcccgatgc gccagagttg tttctgaaac atggcaaagg tagcgttgcc aatgatgta 2400
 cagatgagat ggtcagacta aactggctga cggaaattat gccacttccg accatcaagc 2460
 attttatccg tactcctgat gatgcatggt tactcaccac tgcgatcccc ggaaaaacag 2520
 cgttcaggt attagaagaa taccctgatt caggtgaaaa tattgtgat gcgctggcag 2580
 tgttcctcgc ccggttgac tcgattcctg tttgtaattg tccttttaac agcgatcgcg 2640
 tatttcgcct cgcctcaggc caatcacgaa tgaataacgg tttggtgat gcgagtgatt 2700
 ttgatgacga gcgtaatggc tggcctggtg aacaagtctg gaaagaaatg cataaacttt 2760
 tgccattctc accggattca gtcgtcactc atggtgattt ctacttgat aaccttattt 2820
 ttgacgaggg gaaattaata ggttgatttg atgttgacg agtcggaatc gcagaccgat 2880
 accagatct tgccatccta tggaactgcc tcggtgagtt ttctccttca ttacagaaac 2940
 ggctttttca aaaatatggt attgataatc ctgatatgaa taaattgcag tttcatttga 3000
 tgctcgatga gtttttctaa gcggcgccgc atcgaatggc gcaaaacctt tcgcggtatg 3060
 gcatgatagc gcccgaaga gagtcaattc aggggtggtg atatgaaacc agtaacgta 3120
 tacgatgtcg cagagtatgc cgggtgtctt tatcagaccg tttcccgcgt ggtgaaccag 3180
 gccagccacg tttctgcgaa aacgcgggaa aaagtggaag cggcgatggc ggagctgaat 3240
 tacattccca accgcgtggc acaacaactg gcgggcaaac agtcgttgct gattggcggt 3300
 gccacctcca gtctggccct gcacgcgcgc tcgcaaatg tcgcggggat taaatctcgc 3360
 gccgatcaac tgggtgccag cgtggtggtg tcgatggtag aacgaagcgg cgtcgaagcc 3420

ES 2 683 365 T3

tgtaaagcgg cggtgcacaa tcttctcgcg caacgcgtca gtgggctgat cattaactat 3480
 ccgctggatg accaggatgc cattgctgtg gaagctgcct gcactaatgt tccggcgтта 3540
 tttcttgatg tctctgacca gacacccatc aacagtatta ttttctcca tgaggacggт 3600
 acgcgactgg gcgtggagca tctggtcgca ttgggtcacc agcaaatcgc gctgttagcg 3660
 ggcccattaa gttctgtctc ggcgcgtctg cgtctggctg gctggcataa atatctcact 3720
 cgcaatcaaa ttcagccgat agcggaacgg gaaggcgact ggagtgccat gtccggtttt 3780
 caacaaacca tgcaaatgct gaatgagggc atcgttccca ctgcgatgct ggttgccaac 3840
 gatcagatgg cgctgggсgc aatgcgcgcc attaccgagt ccgggctgсg cgttggtgсg 3900
 gatatctcgg tagtgggata cgacgatacc gaagatagct catgttatat cccgcсgтта 3960
 accaccatca aacaggattt tсgcctgctg gggcaaacca gcgtggaccg ctgctgcaa 4020
 ctctctcagg gccaggcggт gaagggcaat cagctgttgс cagtctcact ggtgaaaaga 4080
 aaaaccaccc tggcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta 4140
 atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtga 4185

<210> 20
 <211> 4301
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Plásmido

10

<400> 20

aattgtgagc ggataacaat tacgagcttc atgcacagtg aaatcatgaa aaatttattt 60
 gctttgtgag cggataacaa ttataatatg tggaaattgt agcgctcaca attccacaac 120
 ggtttccctc tagaaataat tttgtttaac ttttaagaag gagatataca tatcgggggт 180
 tctcatcacc atcaccatca cggtatggct agcatgactg gtggacagca aatgggtcgg 240
 aagtctccag aagaactgaa gggcattttc gaaaaatatg cagccaaaga aggtgatcca 300
 aaccaactgt ccaaggagga gctgaagcta ctgcttcaga cggattccc cagtttgctg 360
 aagggtccac gatggggatc cgagctcgag atctgcagct ggtaccatgg tactcgaagc 420
 ttgatccggc tgctaacaaa gcccgaaagg aagctgagtt ggctgctgcc accgctgagc 480
 aataactagc cccaagggcg acacaaaatt tattctaaat gataataaat actgataaca 540
 tcttatagtt tgtattatat tttgtattat cgttgacatg tataattttg atatcaaaaa 600
 ctgattttcc ctttattatt ttcgagattt attttcttaa ttctcttaa caaactagaa 660
 atattgtata tacaaaaaat cataaataat agatgaatag tttaattata ggtgttcac 720
 aatcgaaaaa gcaacgtatc ttatttaaag tgcgttgctt ttttctcatt tataaggтта 780
 aataattctc atatatcaag caaagtgaca ggcgcсctta aatattctga caaatgctct 840

ES 2 683 365 T3

ttccctaaac tcccccata aaaaaaccg ccgaagcggg tttttacggt atttgcggat	900
taacgattac tcgttatcag aaccgccag ggggccgag cttaaactg gccgtcgttt	960
tacaacacag aaagagtttg tagaaacgca aaaaggccat ccgtcagggg ctttctgctt	1020
agtttgatgc ctggcagttc cctactctcg ctttccgctt cctcgcctcac tgactcgcgtg	1080
cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg aatacgggta	1140
tccacagaat caggggataa cgcagaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaggcc	1200
aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgcc ccctgacgag	1260
catcacaata atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac	1320
caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc	1380
ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctacgcgtgt	1440
aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc	1500
gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga	1560
cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta	1620
ggcggtgcta cagagttctt gaagtggggt gctaactacg gctacactag aagaacagta	1680
tttggatctt gcgctctgct gaagccagtt accttcgaa aaagagttgg tagctcttga	1740
tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggttttttg tttgcaagca gcagattacg	1800
cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgcctag	1860
tggaacgacg cgcgcgtaac tcacgttaag ggattttggt catgagtcac tgcccgcttt	1920
ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagag	1980
cggtttgctg attgggcgcc aggggtggtt ttcttttcac cagtgcgact ggcaacagct	2040
gattgccctt caccgcctgg ccctgagaga gttgcagcaa gcgggtccacg ctggtttgcc	2100
ccagcagcgg aaaatcctgt ttgatggtgg ttaacggcgg gatataacat gagctatctt	2160
cggtatcgtc gtatcccact accgagatat ccgcaccaac gcgcagcccg gactcggtaa	2220
tggcgcgcat tgcgccagc gccatctgat cgttggcaac cagcatcgca gtgggaacga	2280
tgccctcatt cagcatttgc atggtttgtt gaaaaccgga catggcactc cagtcgcctt	2340
cccgttccgc tatcggctga atttgattgc gactgagata tttatgccag ccagccagac	2400
gcagacgcgc cgagacagaa cttaatgggc ccgctaacag cgcgatttgc tggtgacca	2460
atgcgaccag atgctccacg ccagtcgog taccgtcctc atgggagaaa ataatactgt	2520
tgatgggtgt ctggtcagag acatcaagaa ataacgccgg aacattagtg caggcagctt	2580
ccacagcaat ggcacactgg tcatccagcg gatagttaat gatcagccca ctgacgcgtt	2640
gcgcgagaag attgtgcacc gccgctttac aggcttcgac gccgcttctg tetaccatcg	2700

ES 2 683 365 T3

acaccaccac gctggcacc accgtgatcgg cgcgagattt aatcgccgag acaatttgcg 2760
 acggcgcggtg cagggccaga ctggagggtg caacgc caat cagcaacgac tgtttgcccg 2820
 ccagttggtg tgccacgagg ttgggaatgt aattcagctc cgccatcgcc gcttccactt 2880
 tttcccgctg tttcgcagaa acgtggctgg cctgggtcac cagcgggaa acggtctgat 2940
 aagagacacc ggcatactct gcgacatcgt ataacgttac tggtttcata ttcaccacc 3000
 tgaattgact ctcttcggg cgctatcatg ccataccgag aaagggtttg cgccattcga 3060
 tggcgcgccg cttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctat 3120
 cgttcatcca tagttgctg actccccgctc gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta 3180
 ccatctggcc ccagcgtgc gatgataccg cgagaaccac gtcaccggc tccggattta 3240
 tcagcaataa accagccagc cggaaggggc gagcgcagaa gtggctcctgc aactttatcc 3300
 gcctccatcc agtctattaa ttggtgcggg gaagctagag taagtagttc gccagttaat 3360
 agtttgcgca acgttggtgc catcgtaca ggcacgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt 3420
 atggcttcat tcagctccg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatggtg 3480
 tgcaaaaaag cggttagctc cttcgtcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca 3540
 gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta 3600
 agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgagg 3660
 cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcccaca tagcagaact 3720
 ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg 3780
 ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatctc agcatcttt 3840
 actttcacca gcgtttctg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccg aaaaaaggga 3900
 ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atattcttcc tttttcaata ttattgaagc 3960
 atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataa 4020
 caaatagggg tcagtggtac aaccaattaa ccaattctga acattatcg gagcccattt 4080
 atacctgaat atggctcata acacccttg ttgcctggc ggcagtagcg cggtggtccc 4140
 acctgacccc atgccgaact cagaagtga acgcctagc gccgatggta gtgtggggac 4200
 tccccatgag agagtaggga actgccaggc atcaataaa acgaaaggct cagtcgaaag 4260
 actgggcctt tcgcccggc taattatggg gtgtgcct t 4301

- <210> 21
- <211> 4236
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Plásmido

- 10 <400> 21

ES 2 683 365 T3

ctcatgacca aaatccctta acgtgagtta cgcgcgcgtc gttccactga gcgtcagacc 60
 ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct 120
 tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccgcatcaa gagctaccaa 180
 ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gttcttctag 240
 tgtagccgta gttagcccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgcctc 300
 tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg 360
 actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca 420
 cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat 480
 gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg 540
 tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc 600
 ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc 660
 ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc 720
 cttttgctca catgttcttt cctgcgttat ccctgattc tgtggataac cgtattaccg 780
 cctttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc gagtcaagtga 840
 gcgaggaagc ggaaggcag agtagggaac tgcaggcat caaactaagc agaaggcccc 900
 tgacggatgg cctttttgcg tttctacaaa ctctttctgt gttgtaaac gacggccagt 960
 cttaagctcg ggccccctgg gcggttctga taacgagtaa tcgttaatcc gcaaataacg 1020
 taaaaacccg cttcggcggg tttttttatg gggggagttt agggaaagag catttgctcag 1080
 aatatttaag ggcgcctgtc actttgcttg atatatgaga attatttaac cttataaatg 1140
 agaaaaaagc aacgcacttt aaataagata cgttgctttt tcgattgatg aacacctata 1200
 attaaactat tcatctatta tttatgattt tttgtatata caatatttct agtttgtaa 1260
 agagaattaa gaaaataaat ctcgaaaata ataaaggaa aatcagtttt tgatatcaaa 1320
 attatacatg tcaacgataa tacaaaatat aatacaaact ataagatggt atcagtattt 1380
 attatgcatt tagaataaat tttgtgtcgc ccttaattgt gagcggataa caattacgag 1440
 cttcatgcac agtgaaatca tgaaaaattt atttgctttg tgagcggata acaattataa 1500
 tatgtggaat tgtgagcgtc cacaattcca caacggtttc cctctagaaa taattttggt 1560
 taacttttaa gaaggagata tacatatgcg gggttctcat caccatcacc atcacggtat 1620
 ggctagcatg actggtggac agcaaatggg tcggcgatgg ggatccgagc tcgagatctg 1680
 cagctggtac catggtactc gaagcagcag cggaggagga ggaagcggag gaggaggaag 1740
 cggaggagga ggaagcaagt ctccagaaga actgaagggc attttcgaaa aatatgcagc 1800
 caaagaaggt gatccaaacc aactgtccaa ggaggagctg aagctactgc ttcagacgga 1860

ES 2 683 365 T3

attccccagt ttgctgaagg gtccatagcc ccaagggcga caccocctaa ttagccggg 1920
 cgaaaggccc agtctttcga ctgagccttt cgttttattt gatgcctggc agttccctac 1980
 tctcgcacgg ggagtcacca cactaccatc ggcgctacgg cgtttcactt ctgagttcgg 2040
 catggggca ggtgggacca ccgcgctact gccgccaggc aaacaagggg tgttatgagc 2100
 catattcagg tataaatggg ctgcgataa tgttcagaat tggtaattg gttgtaaacac 2160
 tgaccctat ttgtttattt ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat 2220
 aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagaa tatgagccat attcaacggg 2280
 aaacgtcgag gccgcgatta aattccaaca tggatgctga tttatatggg tataaatggg 2340
 ctgcgataa tgtcgggcaa tcaggtgcga caatctatcg cttgtatggg aagcccgatg 2400
 cgccagagtt gtttctgaaa catggcaaaag gtagcgttgc caatgatgtt acagatgaga 2460
 tggctcagact aaactggctg acggaattta tgccacttcc gaccatcaag cattttatcc 2520
 gtactcctga tgatgcatgg ttactcacca ctgcgatccc cggaaaaaca gcgttccagg 2580
 tattagaaga atatcctgat tcaggtgaaa atattgttga tgcgctggca gtgttctcgc 2640
 gccggttca ctcgattcct gtttgtaatt gtccttttaa cagcgatcgc gtatttcgcc 2700
 tcgctcaggg gcaatcacga atgaataacg gtttgggttga tgcgagtgat tttgatgacg 2760
 agcgtaatgg ctggcctggt gaacaagtct ggaagaaat gcataaactt ttgccattct 2820
 caccggattc agtcgtcact catggtgatt tctcacttga taaccttatt tttgacgagg 2880
 ggaaattaat aggttgatt gatgttgac gagtcggaat cgcagaccga taccaggatc 2940
 ttgccatcct atggaaactgc ctcggtgagt tttctccttc attacagaaa cggctttttc 3000
 aaaaatatgg tattgataat cctgatatga ataaattgca gtttcatttg atgctcgatg 3060
 agtttttcta agcggcgcgc catcgaatgg cgcaaacct ttcgcggtat ggcgatgatg 3120
 cgcccgaag agagtcaatt caggggtgtg aatatgaaac cagtaacgtt atacgatgct 3180
 gcagagtatg ccggtgtctc ttatcagacc gtttcccgcg tgggaacca ggcacgccac 3240
 gtttctgcga aaacgcggga aaaagtggaa gcggcgatgg cggagctgaa ttacattccc 3300
 aaccgcgtgg cacaacaact ggcgggcaaa cagtcggttc tgattggcgt tgccacctcc 3360
 agtctggccc tgcacgcgcc gtcgcaaatt gtcgcgcgca ttaaatctcg cgccgatcaa 3420
 ctgggtgcca gcgtggtggt gtcgatgta gaacgaagcg gcgtcgaagc ctgtaaagcg 3480
 gcggtgcaca atottctcgc gcaacgcgctc agtgggctga tcattaacta tccgctggat 3540
 gaccaggatg ccattgctgt ggaagctgcc tgcactaatg ttccggcgtt atttcttgat 3600
 gtctctgacc agacacccat caacagtatt attttctccc atgaggacgg tacgcgactg 3660
 ggcgtggagc atctggtcgc attgggtcac cagcaaatcg cgctgttagc gggcccatta 3720
 agttctgtct cggcgcgtct gcgtctggct ggctggcata aatatctcac tcgcaatcaa 3780

ES 2 683 365 T3

attcagccga tagcggaacg ggaagcgac tggagtgcc tgtccggtt tcaacaaacc 3840
 atgcaaatgc tgaatgaggg catcgttccc actgcatgac tggttgcaa cgatcagatg 3900
 gcgctgggcg caatgcgagc cattaccgag tccgggctgc gcgctggtgc ggatatctcg 3960
 gtagtgggat acgacgatac cgaagatagc tcatgttata tcccgccgtt aaccaccatc 4020
 aaacaggatt ttgcctgct ggggcaaacc agcgtggacc gcttgctgca actctctcag 4080
 ggcagggcg tgaagggcaa tcagctggtg ccagctctac tggtgaaaag aaaaaccacc 4140
 ctggcgcca atacgcaaac cgcctctccc cgcgcttgg ccgattcatt aatgcagctg 4200
 gcacgacag tttcccgact ggaaagcggg cagtga 4236

<210> 22
 <211> 4852
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Plásmido

10

<400> 22

ctcatgacca aaatccctta acgtgagtta cgcgcgctc gttccactga gcgtcagacc 60
 ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgctga atctgctgct 120
 tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccgatcaa gagtaccaa 180
 ctctttttcc gaaggttaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gttcttctag 240
 tgtagccgta gttagcccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgtc 300
 tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg 360
 actcaagacg atagttaccg gataagggc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca 420
 cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat 480
 gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccgta agcggcaggg 540
 tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc 600
 ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc 660
 ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacggg cctttttacg gttcctggcc ttttctggc 720
 cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg 780
 cttttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga 840
 gcgaggaagc ggaaggcag agtagggaac tgccaggcat caaactaagc agaaggcccc 900
 tgacggatgg cttttttgcg tttctacaaa ctctttctgt gttgtaaac gacggccagt 960
 cttaaagctcg ggccccctgg cgcggtctga taacgagtaa tcgttaatcc gcaaataacg 1020
 taaaaaccg cttcggcggg tttttttatg gggggagttt agggaaagag catttctcag 1080

ES 2 683 365 T3

aatatttaag ggcgcctgtc actttgcttg atatatgaga attatttaac cttataaatg 1140
agaaaaaagc aacgcacttt aaataagata cgttgctttt tcgattgatg aacacctata 1200
attaactat tcatctatta tttatgattt tttgtatata caatatttct agtttgtaa 1260
agagaattaa gaaaataaat ctcgaaaata ataaagggaa aatcagtttt tgatatcaaa 1320
attatacatg tcaacgataa tacaaaatat aatacaaact ataagatggt atcagtattt 1380
attatcattt agaataaatt ttgtgtcgcc cttaattgtg agcggataac aattacgagc 1440
tcatgcaca gtggcgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg 1500
ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataaacttac gtaaatggcc 1560
cgcctggctg accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca 1620
tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaacctg 1680
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg 1740
acggtaaatg gcccgctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt 1800
ggcagtacat ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca 1860
tcaatggcg tgatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg 1920
tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact 1980
ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag 2040
ctctctggct aactagagaa cccactgctt actggcttat cgaaattaat acgactcact 2100
ataggggtta agaaggagat atacatatgc ggggttctca tcaccatcac catcacggta 2160
tggctagcat gactggtgga cagcaaatgg gtcggaagtc tccagaagaa ctgaagggca 2220
ttttcgaaaa atatgcagcc aaagaagggtg atccaaacca actgtccaag gaggagctga 2280
agctactgct tcagacggaa ttccccagtt tgctgaaggg tccacgatgg ggatccgagc 2340
tcgagatctg cagctggtac catggtactc gaagcttgat ccggctgcta acaaagcccg 2400
aaaggaagct gagttggctg ctgccaccgc tgagcaataa ctagaaaatc agcctcgact 2460
gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgcccctccc ccgtgccttc cttgaccctg 2520
gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcatc acaacactca 2580
accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggt 2640
taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaatta attctgtgga atgtgtgtca 2700
gttaggggtg ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct 2760
caattagtca gcaaccaggt gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca 2820
aagcatgcat ctcaattagt cagcaacat agtcccgcc ctaactccgc ccatcccgcc 2880
cctaactccg cccagttccg cccattctcc gccccatggc tgactaattt tttttattta 2940
tgagaggcc gaggccgct ctgcctctga gctattccag aagtagtgag gaggettttt 3000

ES 2 683 365 T3

tggaggccta ggcttttgca aaaagctccc gggagcttgt atatccattt tcggatctga 3060
 tcagcacgtg ttgacaatta atcatcggca tagtatatcg gcatagtata atacgacaag 3120
 gtgaggaact aaacccatggc caagttgacc agtgccgttc cggtgctcac cgcgcgcgac 3180
 gtcgccggag cggtcgagtt ctggaccgac cggctcgggt tctcccggga cttcgtggag 3240
 gacgacttcg ccggtgtggt ccgggacgac gtgaccctgt tcatcagcgc ggtccaggac 3300
 caggtggtgc cggacaacac cctggcctgg gtgtgggtgc gcggcctgga cgagctgtac 3360
 gccgagtggc cggaggtcgt gtccacgaac ttccgggacg cctccggggc ggccatgacc 3420
 gagatcggcg agcagccgtg ggggcgggag ttcgcctcgc gcgaccggc cggcaactgc 3480
 gtgcacttcg tggccgagga gcaggactga cacgtgctac gagatttoga ttccaccgcc 3540
 gccttctatg aaaggttggg cttcggaaac gttttccggg acgccggctg gatgatcctc 3600
 cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc gccacccca acttgtttat tgcagcttat 3660
 aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg 3720
 cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt atcatgtctg tataccgtcg 3780
 acctctagct agagcttggc gtaatcatgg tcattaccaa tgcttaatca gtgaggcacc 3840
 tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat 3900
 aactacgata cgggagggct taccatctgg ccccgcgct gcgatgatac cgcgagaacc 3960
 acgctcaccg gctccggatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag 4020
 aagtggcctt gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgc ggaagctag 4080
 agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt gccatcgta caggcatcgt 4140
 ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg 4200
 agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt 4260
 tgtcagaagt aagtggccg cagtgttacc actcatggtt atggcagcac tgcataattc 4320
 tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 4380
 attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa 4440
 taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacggt cttcggggcg 4500
 aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctctgtcacc 4560
 caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag 4620
 gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatattctt 4680
 cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 4740
 tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggtcagtggt acaaccaatt aaccaattct 4800
 gaacattatc gcgagcccat ttatacctga atatggctca taacaccctt tg 4852

<210> 23
 <211> 4837
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Plásmido

10

ES 2 683 365 T3

<400> 23

ctcatgacca	aaatccctta	acgtgagtta	cgcgcgcgtc	gttccactga	gcgtcagacc	60
ccgtagaaaa	gatcaaagga	tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	atctgctgct	120
tgcaaacaaa	aaaaccaccg	ctaccagcgg	tggtttgttt	gccggatcaa	gagctaccaa	180
ctctttttcc	gaaggtaact	ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	gttcttctag	240
tgtagccgta	gtagcccac	cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	tacctcgctc	300
tgctaatacct	gttaccagtg	gctgctgcc	gtggcgataa	gtcgtgtctt	accgggttgg	360
actcaagacg	atagttaccg	gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	ggttcgtgca	420
cacagcccag	cttgaggcga	acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	cgtgagctat	480
gagaaagcgc	cacgcttccc	gaagggagaa	aggcggacag	gtatccggt	agcggcaggg	540
tcggaacagg	agagcgcacg	agggagcttc	cagggggaaa	cgcctggtat	ctttatagtc	600
ctgtcggggt	tcgccacctc	tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	tcaggggggc	660
ggagcctatg	gaaaaacgcc	agcaacgcgg	ccttttttacg	gttcctggcc	ttttgctggc	720
cttttgctca	catgttcttt	cctgcgttat	cccctgattc	tgtggataac	cgtattaccg	780
cctttgagtg	agctgatacc	gctcgcgcc	gccgaacgac	cgagcgcagc	gagtcagtga	840
gcgaggaagc	ggaaggcgag	agtagggaac	tgccaggcat	caaaactaagc	agaaggcccc	900
tgacggatgg	cctttttgcg	tttctacaaa	ctctttctgt	gttgtaaaac	gacggccagt	960
cttaagctcg	ggccccctgg	gcggttctga	taacgagtaa	tcgttaatcc	gcaaataacg	1020
taaaaacccg	cttcggcggg	tttttttatg	gggggagttt	agggaaagag	catttgtcag	1080
aatatttaag	ggcgcctgtc	actttgcttg	atatatgaga	attatttaac	cttataaatg	1140
agaaaaagc	aacgcacttt	aaataagata	cgttgctttt	tcgattgatg	aacacctata	1200
attaaactat	tcatctatta	tttatgattt	tttgtatata	caatatttct	agtttgtaa	1260
agagaattaa	gaaaataaat	ctcgaataa	ataaaggaa	aatcagtttt	tgatatcaaa	1320
attatacatg	tcaacgataa	tacaaaatat	aatacaaact	ataagatggt	atcagtattt	1380
attatcattt	agaataaatt	ttgtgtcgcc	cttaattgtg	agcggataac	aattacgagc	1440
ttcatgcaca	gtggcgttga	cattgattat	tgactagtta	ttaatagtaa	tcaattacgg	1500
ggtcattagt	tcatagccca	tatatggagt	tccgcgttac	ataacttacg	gtaaatggcc	1560
cgcctggctg	accgcccac	gacccccgcc	cattgacgtc	aataatgacg	tatgttocca	1620

ES 2 683 365 T3

tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg	1680
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg	1740
acggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt	1800
ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca	1860
tcaatgggcg tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg	1920
tcaatgggag tttgttttg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact	1980
ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag	2040
ctctctggct aactagagaa cccactgctt actggcttat cgaaattaat acgactcact	2100
ataggggtta agaaggagat atacatatgc ggggttctca tcaccatcac catcacggtg	2160
tggctagcat gactggtgga cagcaaatgg gtcggcgatg gggatccgag ctcgagatct	2220
gcagctggtg ccatggtact cgaagcagca gcggaggag aggaagcggg ggaggaggaa	2280
gcggaggagg aggaagcaag tctccagaag aactgaaggg cattttcgaa aaatatgcag	2340
ccaaagaagg tgatccaaac caactgtcca aggaggagct gaagctactg cttcagacgg	2400
aattccccag tttgctgaag ggtccataga aaatcagcct cgactgtgcc ttctagttgc	2460
cagccatctg ttgtttgcc ctccccctg ccttccttga ccctggaagg tgccactccc	2520
actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcacaac actcaaccct atctcgtct	2580
attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga	2640
tttaacaaaa atttaacgcg aattaattct gtggaatgtg tgtcagttag ggtgtgaaa	2700
gtccccagc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac	2760
caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca tgcactcaa	2820
ttagttagca accatagtcc cgcccctaac tccgccatc ccgcccctaa ctccgccag	2880
ttccgcccat tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgagc aggccgaggc	2940
cgctctgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttgag gcctaggctt	3000
ttgcaaaaag ctccgggag cttgtatata cattttcgga tctgatcagc acgtgttgac	3060
aattaatcat cggcatagta tatcggcata gtataatagc acaaggtagg gaactaaacc	3120
atggccaagt tgaccagtgc cgttccggtg ctcaccgcgc gcgacgtcgc cggagcggtc	3180
gagttctgga ccgaccggct cgggttctcc cgggacttcg tggaggacga cttcgccggt	3240
gtggtccggg acgacgtgac cctgttcata agcgggtcc aggaccaggt ggtgccggac	3300
aacaccctgg cctgggtgtg ggtgcgcggc ctggacgagc tgtacgccga gtggtcggag	3360
gtcgtgtcca cgaacttccg ggacgcctcc gggccggcca tgaccgagat cggcgagcag	3420
ccgtgggggc gggagttcgc cctgcgcgac ccggccggca actgcgtgca cttcgtggcc	3480

ES 2 683 365 T3

gaggagcagg actgacacgt gctacgagat ttcgattcca cgcgccctt ctatgaaagg 3540
 ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tccctccagcg cggggatctc 3600
 atgctggagt tcttcgcccc ccccaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa 3660
 agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt 3720
 ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgtatac cgtcgcacctc tagctagagc 3780
 ttggcgtaat catggtcatt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg 3840
 tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctcgt tagataacta cgatacggga 3900
 gggcttacca tctggcccca gcgctgcgat gataccgcga gaaccacgct caccggctcc 3960
 ggatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac 4020
 tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc 4080
 agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat cgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc 4140
 gtttgggatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 4200
 catgtttgtc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgtttgtca gaagtaagtt 4260
 ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 4320
 atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 4380
 tatgcggcga ccgagttgct cttgcccgcc gtcaatacgg gataataacc cgccacatag 4440
 cagaacttta aaagtgtca tcattgaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat 4500
 cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact gatcttcagc 4560
 atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa 4620
 aaaggaata agggcgacac ggaaatggtg aatactcata ttcttccttt ttcaatatta 4680
 ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa 4740
 aaataaacia ataggggtca gtgttacaac caattaacca attctgaaca ttatcgcgag 4800
 cccatttata cctgaatatg gctcataaca ccccttg 4837

<210> 24
 <211> 337
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Plásmido

10

<400> 24

ttaagaagga gatatacata tgcgggggtc tcatcacat caccatcacg gtatggctag 60
 catgactggg ggacagcaaa tgggtcggaa gtctccagaa gaactgaagg gcattttcga 120
 aaaatatgca gccaaagaag gtgatccaaa ccaactgtcc aaggaggagc tgaagctact 180
 gcttcagacg gaattcccca gtttctgtaa ggggtccagc tggggatccg agctcgagat 240
 ctgcagctgg taccatggta ctcgaagctt gatccggctg ctaacaaagc ccgaaaggaa 300
 gctgagttgg ctgctgccac cgctgagcaa taactag 337

15

ES 2 683 365 T3

	<210> 25		
	<211> 322		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> Plásmido		
	<400> 25		
10	ttaagaagga gatatacata tgcgggggttc tcatcaccat caccatcacg gtatggctag	60	
	catgactggg ggacagcaaa tgggtcggcg atggggatcc gagctcgaga tctgcagctg	120	
	gtaccatggg actcgaagca gcagcggagg aggaggaagc ggaggaggag gaagcggagg	180	
	aggaggaagc aagtctccag aagaactgaa gggcattttc gaaaaatatg cagccaaaga	240	
	aggtgatcca aaccaactgt ccaaggagga gctgaagcta ctgcttcaga cggaattccc	300	
	cagtttgctg aagggtccat ag	322	
	<210> 26		
	<211> 337		
15	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Plásmido		
20	<400> 26		
	ttaagaagga gatatacata tgcgggggttc tcatcaccat caccatcacg gtatggctag	60	
	catgactggg ggacagcaaa tgggtcggaa gtctccagaa gaactgaagg gcattttcga	120	
	aaaaatatgca gccaaagaag gtgatccaaa ccaactgtcc aaggaggagc tgaagctact	180	
	gcttcagacg gaattcccca gtttgctgaa ggtccacga tggggatccg agctcgagat	240	
	ctgcagctgg taccatggta ctcgaagctt gatccggctg ctaacaaagc ccgaaaggaa	300	
	gctgagttgg ctgctgccac cgctgagcaa taactag	337	
25	<210> 27		
	<211> 322		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
30	<220>		
	<223> Plásmido		
	<400> 27		
	ttaagaagga gatatacata tgcgggggttc tcatcaccat caccatcacg gtatggctag	60	
35	catgactggg ggacagcaaa tgggtcggcg atggggatcc gagctcgaga tctgcagctg	120	
	gtaccatggg actcgaagca gcagcggagg aggaggaagc ggaggaggag gaagcggagg	180	
	aggaggaagc aagtctccag aagaactgaa gggcattttc gaaaaatatg cagccaaaga	240	
	aggtgatcca aaccaactgt ccaaggagga gctgaagcta ctgcttcaga cggaattccc	300	
	cagtttgctg aagggtccat ag	322	

ES 2 683 365 T3

<210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 28
 10
 tggggatcca tggccgaaga c 21
 <210> 29
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador
 20
 <400> 29
 atcccatggt taaccacttc ccag 24
 25
 <210> 30
 <211> 263
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Plásmido
 <400> 30
 aggagataaa acatatgaaa tacctattgc ctacggcagc cgctggattg ttattactcg 60
 cggcccagcc ggccatggcc gagatgacctc aggcggccgc aggcggttct ggttccggta 120
 gcagcaagag cccggaagag ctgaaaggca tcttcgagaa gtatgcggcg aaagagggcg 180
 acccgaacca actgagcaaa gaagaactga agctgctgct gcaaaccgag tttccgagcc 240
 35
 tgctgaaggg tatgtaactc gag 263
 <210> 31
 <211> 126
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Subdominio de mano EF1
 45
 <400> 31
 aagagcccgg aagagctgaa aggcattctc gagaagtatg cggcgaaaga gggcgacccg 60
 aaccaactga gcaaagaaga actgaagctg ctgctgcaaa ccgagtttcc gagcctgctg 120
 aagggt 126
 50
 <210> 32
 <211> 126
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55

ES 2 683 365 T3

<220>

<223> Subdominio de mano EF1

<400> 32

5

aagtctccag aagaactgaa gggcattttc gaaaaatatg cagccaaaga aggtgatcca 60

aaccaactgt ccaaggagga gctgaagcta ctgcttcaga cggaattccc cagtttgctg 120

aagggt 126

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de etiqueta de afinidad para inmovilizar una molécula, comprendiendo dicho sistema:

- 5 (i) una matriz de afinidad que comprende un primer subdominio de mano EF o fragmento del mismo anclado a un sustrato; y
 (ii) una molécula etiquetada con un segundo subdominio de mano EF o fragmento del mismo,

10 en donde la molécula se inmoviliza en el sustrato mediante la interacción entre el primer y el segundo subdominios EF o fragmentos de los mismos, y en donde un fragmento de un primer o segundo subdominio EF conserva la capacidad del subdominio EF completo formar un par de unión de mano EF.

15 2. El sistema de la reivindicación 1, en donde el primer subdominio de mano EF o fragmento del mismo es capaz de unirse al segundo subdominio de mano EF o fragmento del mismo en presencia de calcio y/o en donde la afinidad de unión entre el primer subdominio de mano EF y el segundo subdominio de mano EF es $K_D = 10$ nM o menos.

20 3. El sistema de la reivindicación 1 o 2, donde el primer subdominio de mano EF se selecciona del grupo que consiste en los dominios de mano EF encontrados en cualquier proteína de unión a calcio que comprende dos o más manos EF, y en donde el subdominio de mano EF es capaz de formar un par de unión con un segundo subdominio de mano EF, en presencia de calcio, opcionalmente en donde el primer subdominio de mano EF se selecciona entre:

- 25 (i) una proteína de origen humano, bovino, murino o de rata;
 (ii) el grupo de subdominios proteicos que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3-18;
 (iii) el grupo de dominios de proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 85% de identidad de secuencia con uno cualquiera de SEQ ID NO: 3-18;
 (iv) EF2 de calbindina D9k;
 (v) un subdominio de mano EF que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
 30 (vi) un subdominio de mano EF que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 85% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1.

35 4. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el sustrato de la matriz de afinidad se selecciona del grupo que consiste en polisacárido entrecruzado, cerámica, metal, vidrio, plástico, celulosa, sílice, y/o en donde el primer subdominio de mano EF se ancla al sustrato mediante acoplamiento aleatorio de amina o en donde el primer subdominio de mano EF se modifica para facilitar el anclaje al sustrato y/o en donde el primer subdominio de mano EF se ancla al sustrato a través de un conector.

40 5. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la molécula etiquetada con un segundo subdominio de mano EF o fragmento del mismo es una proteína de fusión que comprende un segundo subdominio de mano EF y una secuencia polipeptídica que no es parte del subdominio de mano EF. opcionalmente en donde el segundo subdominio de mano EF está unido a la secuencia polipeptídica en el extremo N-terminal de la secuencia polipeptídica o en el extremo C terminal de la secuencia polipeptídica o a un residuo de aminoácido de la secuencia polipeptídica en una posición entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de la secuencia polipeptídica o en donde el segundo subdominio de mano EF está unido a la secuencia polipeptídica a través de un conector.

45

50 6. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el segundo subdominio de mano EF se selecciona del grupo que consiste en los subdominios de mano EF encontrados en cualquier proteína de unión a calcio que comprende dos o más manos EF, y en donde el subdominio de mano EF es capaz de formar un par de unión con un primer subdominio de mano EF en presencia de calcio, opcionalmente en donde el segundo subdominio de mano EF está:

- 55 (i) derivado de la misma proteína de unión a calcio que el primer subdominio de mano EF; o
 (ii) es de una proteína de origen humano, bovino, murino o de rata; o
 (iii) se selecciona del grupo de dominios proteicos que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3-17; o
 (iv) se selecciona del grupo de dominios de proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85% de identidad de secuencia con uno cualquiera de SEQ ID NO: 3-17; o
 60 (v) es EF1 de calbindina D9K; o
 (vi) es un subdominio de mano EF que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; o
 (vii) es un subdominio de mano EF que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

7. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la primera y la segunda manos EF se disocian mediante la adición de un agente quelante de calcio, opcionalmente en donde el agente quelante de calcio se selecciona del grupo que consiste en EDTA, EGTA, BAPTA, citrato y fosfato .

5 8. El uso del sistema de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para detectar la presencia de una molécula biológica en una muestra o para detectar la unión de un ligando o inhibidor a una molécula biológica en una muestra o para purificar moléculas biológicas etiquetadas con un subdominio de mano EF .

10 9. Una matriz de afinidad que comprende un primer subdominio de mano EF o fragmento del mismo que es capaz de unirse a un segundo subdominio de mano EF en presencia de calcio, en donde dicho primer dominio de mano EF o fragmento del mismo se ancla a un sustrato y donde dicho primer subdominio de mano EF se selecciona entre:

- 15 (i) EF2 de calbindina D9K,
(ii) un subdominio de mano EF que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o
(iii) un subdominio de mano EF que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1,

20 en donde el fragmento del primer subdominio de mano EF conserva la capacidad del subdominio de mano EF completo para formar un par de unión de mano EF.

25 10. La matriz de la reivindicación 9, en donde el sustrato de la matriz de afinidad se selecciona del grupo que consiste en polisacárido entercruzado, cerámica, metal, vidrio, plástico, celulosa, sílice y/o en donde el primer subdominio de mano EF o fragmento del mismo se ancla al sustrato mediante acoplamiento aleatorio de amina o en donde el primer subdominio de mano EF o fragmento del mismo se modifica para facilitar el anclaje al sustrato,
y/o en donde el primer subdominio de mano EF o fragmento del mismo se ancla al sustrato a través de un conector.

30 11. Un método para purificar una molécula biológica etiquetada con un subdominio de mano EF o un fragmento del mismo a partir de una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 35 (i) proporcionar la matriz de afinidad de la reivindicación 9 o la reivindicación 10;
(ii) poner una muestra que contiene la molécula biológica etiquetada en contacto con la matriz de afinidad de (i) en condiciones que permitan la unión de los subdominios de mano EF (es decir en presencia de calcio);
(iii) separar cualquier material no unido de la molécula biológica etiquetada unida a la matriz de afinidad; y
(iv) efectuar la liberación de la molécula biológica etiquetada de la matriz de afinidad.

40 12. El método de la reivindicación 11 en donde la liberación de la molécula biológica etiquetada se efectúa mediante la adición de un agente que quela el calcio o mediante la escisión de la etiqueta del subdominio de mano EF y/o en donde la matriz de afinidad comprende un dominio de mano EF anclado a un sustrato que consiste esencialmente en, o que consiste en, nanopartículas de sílice y/o en donde la molécula biológica es una proteína o polipéptido.

Figura 1

pJexpress411:59935 - pelBEF1a_optEc1

En el mapa únicamente se muestran enzimas de restricción con un solo sitio de reconocimiento

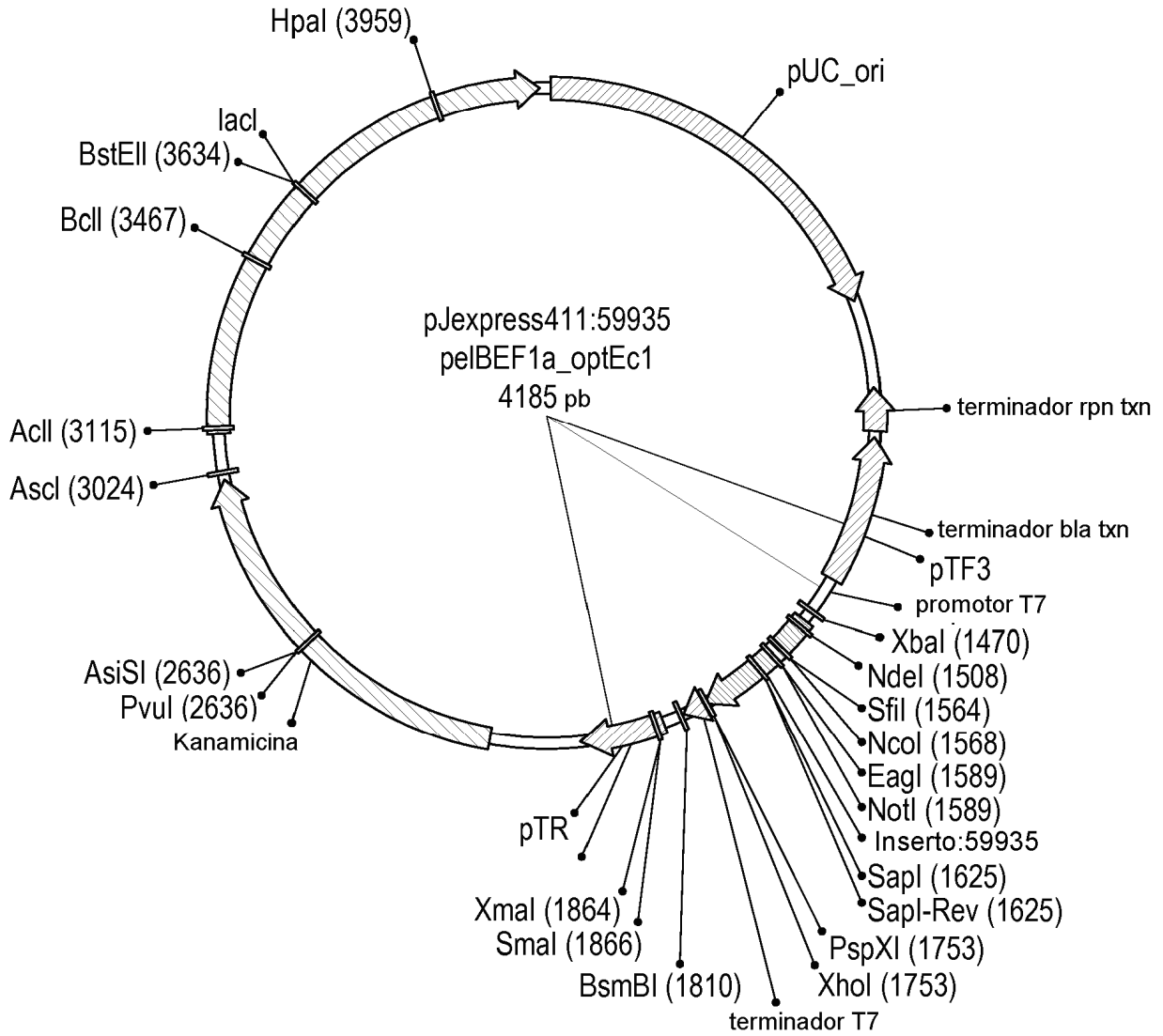


Figura 2

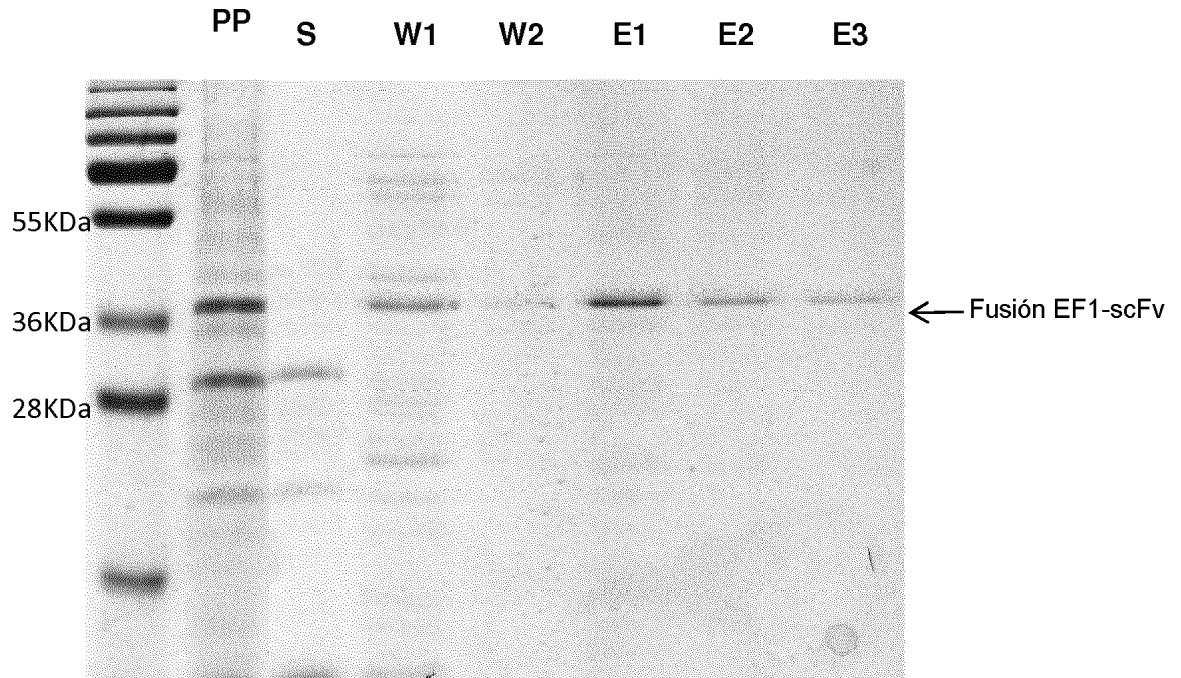


Figura 3

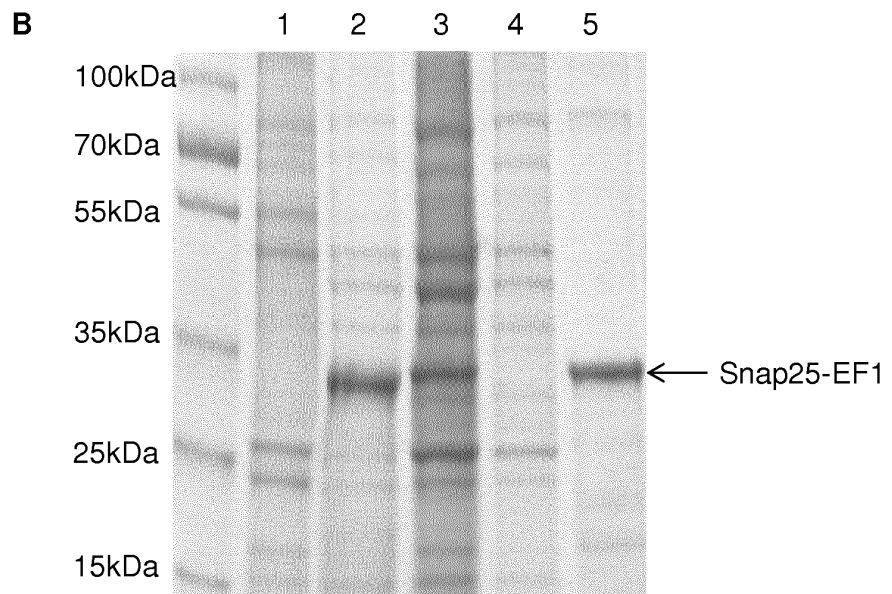
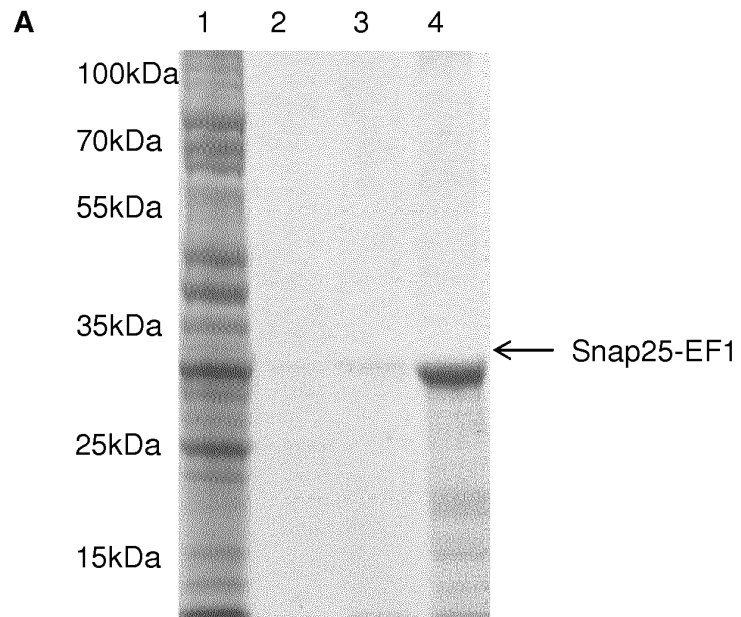


Figura 4

pJexpress404:92688 - EFTag-Nterminal-6His

En el mapa únicamente se muestran enzimas de restricción con un solo sitio de reconocimiento

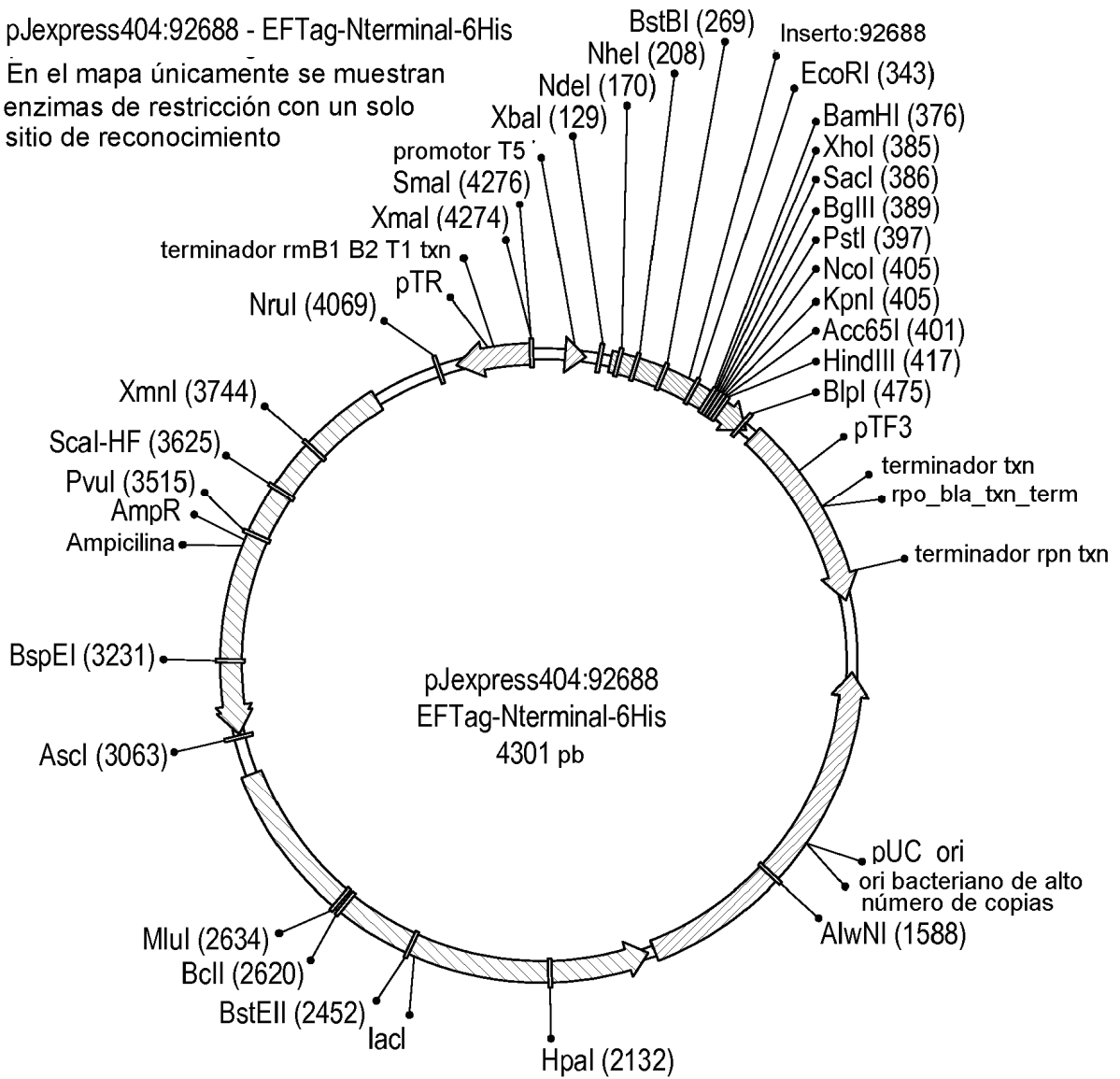


Figura 5

pJexpress401:92689 - EFTag-Cterminal-6His
 En el mapa únicamente se muestran enzimas de restricción con un solo sitio de reconocimiento

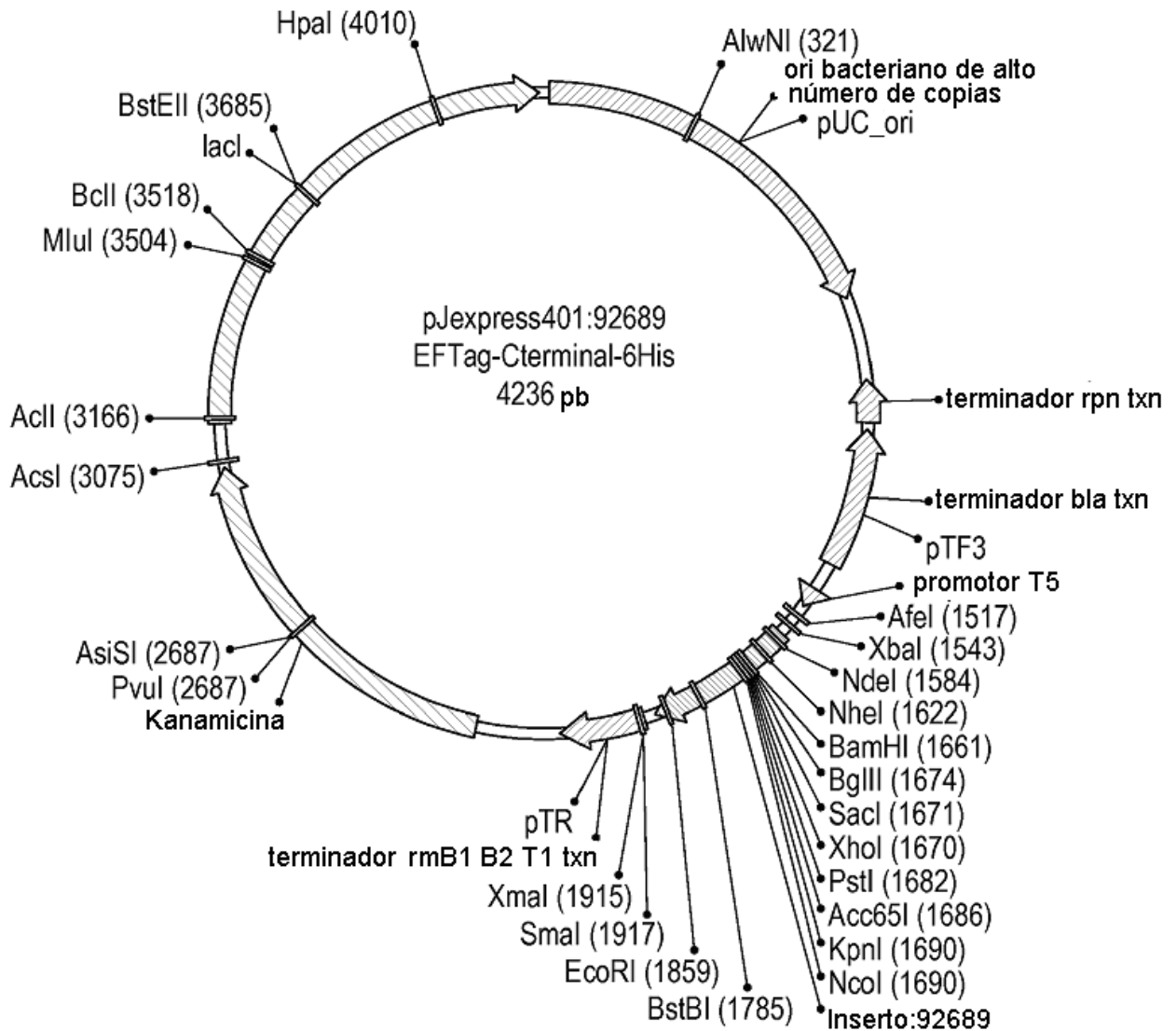


Figura 6

pJ602:92691 - EFTag-Nterminal-6His-mamífero
 En el mapa únicamente se muestran enzimas de restricción
 con un solo sitio de reconocimiento

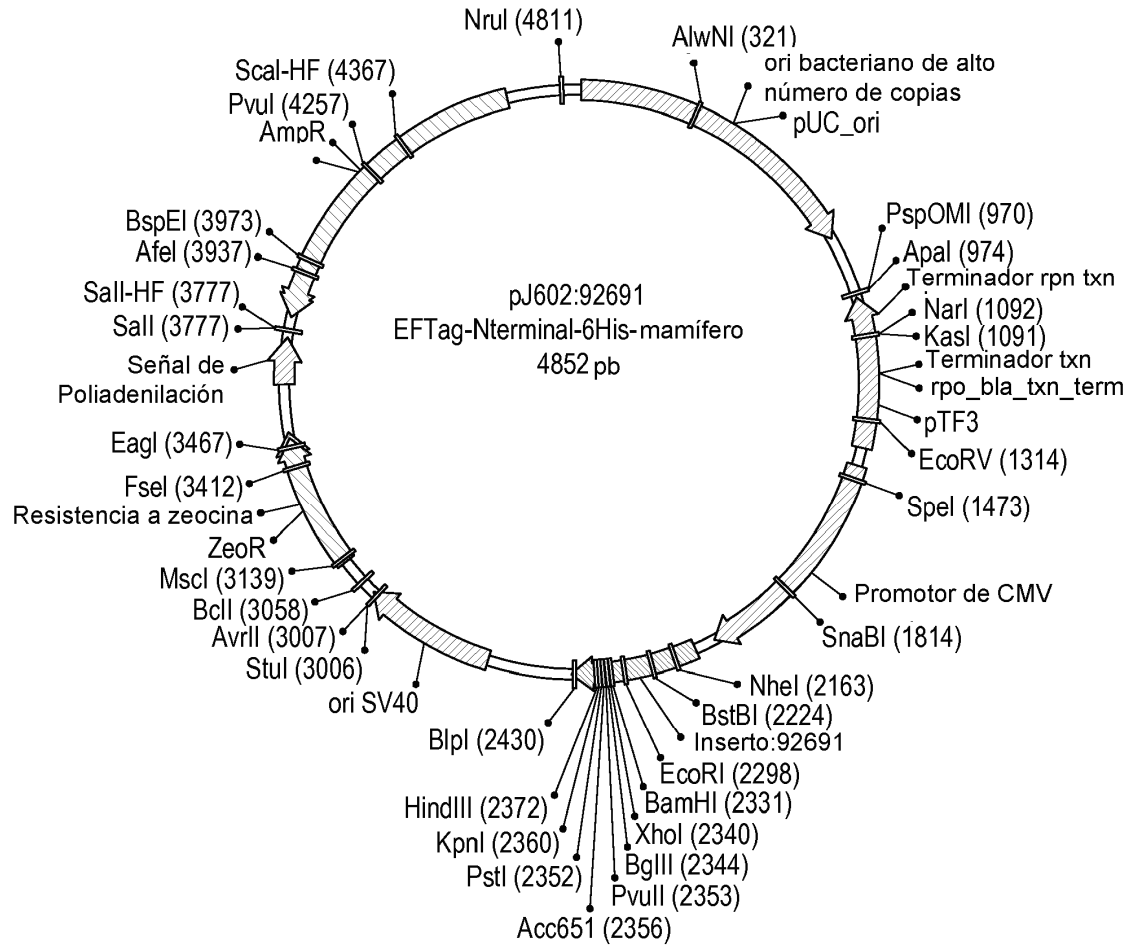


Figura 7

pJ602:92690-EF1-Cterminal-6His-mamífero

En el mapa únicamente se muestran enzimas de restricción con un solo sitio de reconocimiento

