

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 378**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C07K 14/01 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2016 PCT/US2016/062806**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.06.2017 WO17091467**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2016 E 16809601 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 3380606**

54 Título: **Vectores fagos de presentación y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

25.11.2015 US 201562259801 P

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

31.03.2020

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

AFSHAR, SEPIDEH

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 751 378 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

Vectores fagos de presentación y procedimientos de uso

La presente invención está en el campo de las tecnologías de los fagos de presentación. Más particularmente, la presente invención se refiere a vectores adecuados para su uso en la presentación de proteínas de fusión que comprenden la proteína de superficie P.III sobre la superficie de partículas del bacteriófago M13, así como a procedimientos para su uso y composiciones que comprenden los mismos.

Las técnicas de presentación en fagos actuales permiten la generación y presentación de bibliotecas peptídicas heterogéneas sobre la superficie de partículas de bacteriófago. El principio de la presentación en fagos se basa en la presentación de un péptido de interés como parte de una proteína de fusión con una proteína de revestimiento de la superficie del bacteriófago. En resumen, la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de interés se clona en fase abierta con un gen que codifica una proteína de revestimiento de la superficie del fago para generar un producto de fusión que se expresa o 'presenta' como parte de la superficie de revestimiento al ensamblarse el fago. La biblioteca peptídica que se expresa se puede entonces explorar contra una diana o antígeno para identificar potenciales ligandos peptídicos para una optimización o maduración de la afinidad posterior.

El bacteriófago M13 es un ejemplo de un fago utilizado comúnmente para la expresión de péptidos heterogéneos y fragmentos de anticuerpo mediante la presentación en fago. El ensamblaje del bacteriófago M13 filamentosos se produce en la membrana bacteriana interna. Las proteínas de revestimiento del fago se sintetizan en el citoplasma utilizando la maquinaria bacteriana sintética de proteínas y se dirigen entonces al periplasma mediante diferentes péptidos de señal. Las partículas funcionales del fago M13 comprenden cinco tipos de proteínas de revestimiento de superficie denominados P.III, P.VI, P.VII, P.VIII, y P.IX. Aunque todas estas cinco proteínas se han utilizado para presentar péptidos exógenos en la superficie de partículas M13, la proteína de revestimiento menor P.III es la que se utiliza más comúnmente para anclar péptidos de interés en la superficie de revestimiento del fago. (Methods in Molecular Biology, Vol. 178, Antibody Phage Display: Methods and Protocols, editado por O'Brien y Aitken). La P.III existe en cinco copias en el extremo proximal del fago M13 y tiene importantes papeles en la infectividad, ensamblaje y estabilidad del fago. La P.III se expresa como un polipéptido de 406 aminoácidos y está comprendida por tres regiones distintas: Los dominios N1, N2 y del extremo C (CT) (Russel y col., Introduction to Phage Biology and Display, Phage Display: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Lab. Press). El dominio N1 participa en la translocalización del ADN vírico en el huésped bacteriano (*E. coli*) durante la infección, aunque el dominio N2 transmite el reconocimiento de la célula huésped uniéndose al pelo F bacteriano. El dominio CT participa en el anclaje de la proteína P.III al revestimiento del fago durante el ensamblaje. (Omidfar y col., Advances in Phage Display Technology for Drug Discovery, Expert Opin. Drug Discov, (2015)).

Los sistemas de presentación en fagos se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de vector utilizado para la infección de la célula huésped bacteriana. Para la presentación de productos de fusión con P.III, se utilizan comúnmente vectores del tipo 3 y tipo 33. (Omidfar y col. (2015)). El vector tipo 3 comprende una copia del gen que codifica la proteína P.III (el gen g.III), al que se puede clonar en fase un gen que codifique un péptido exógeno de interés. Como resultado, cada péptido se presenta en el fago en cinco copias, cada una en fusión con una proteína P.III que se expresa. Aunque el uso de vectores de tipo 3 es una manera eficaz para presentar péptidos cortos, por ejemplo, de 12 aminoácidos o menos, la presentación de péptidos más largos reduce sustancialmente la infectividad del fago y, por lo tanto, su aplicación (título), evitando de esta manera la construcción de bibliotecas peptídicas altamente diversas. El vector tipo 33 comprende dos copias del gen g.III - la copia de tipo silvestre y la copia recombinante. Los genes g.III de tipo silvestre y recombinantes codifican una proteína P.III que tiene la misma secuencia de aminoácidos; sin embargo, se diferencian en la secuencia de nucleótidos y se expresan utilizando diferentes secuencias de péptidos de señal. Por ejemplo, la proteína P.III codificada por el g.III de tipo silvestre se puede expresar con la secuencia de señal endógena de 18 aminoácidos, mientras que la P.III codificada por el g.III recombinante puede expresarse con una secuencia de señal periplásmica.

Utilizando el sistema de tipo-33, el gen que codifica la proteína o péptido exógenos se puede clonar en fase con una copia del gen g.III (es decir, el gen de tipo silvestre o recombinante), permitiendo la presentación del péptido de interés con una reducción de los impedimentos estéricos sobre la superficie de revestimiento del fago. Por lo tanto, el vector de tipo-33 es tolerante para la presentación de péptidos exógenos más grandes, sin embargo, con un número de copias menor. El número de copias menor, sin embargo, crea una limitación para el aislamiento satisfactorio de péptidos específicos de diana debido a que los péptidos, antes de la maduración de afinidad, sufren una disminución de la afinidad por sus dianas. La menor afinidad, combinada con niveles de presentación menores, dificultan la detección de péptidos específicos de diana a partir de un gran agrupamiento de variantes peptídicas.

De acuerdo con la presente invención, se ha identificado un sistema mejorado de vectores fagos de tipo-33 y procedimientos de uso de manera que se pueden presentar satisfactoriamente péptidos, por ejemplo, péptidos de hasta 35 aminoácidos de longitud sobre la superficie del fago M13 en múltiples copias. En este sistema, la presentación mejorada del péptido de interés se consigue introduciendo mutaciones definidas en el gen g.III de tipos silvestre. Estas mutaciones reducen la incorporación del polipéptido codificado por el gen g.III de tipo silvestre mutado sobre la superficie del fago. Como consecuencia, se presentan sobre el fago más copias de la proteína P.III codificada por el gen g.III recombinante. Esto da como resultado un nivel más alto de presentación de un péptido

exógeno de interés cuando se fusiona o clona en fase con el producto del gen g.III recombinante. Además, los vectores y procedimientos de la presente invención permiten la generación de partículas del bacteriófago M13 que mantienen la infectividad del fago a niveles comparables con el bacteriófago M13 tipo silvestre cuando se presentan péptidos de hasta 35 aminoácidos de longitud sobre la superficie de revestimiento del fago.

5 Por lo tanto, la presente invención proporciona un vector bacteriófago M13 tipo 33 que comprende una primera secuencia de polinucleótido que codifica una secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1 y una segunda secuencia de polinucleótido que codifica una secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 2. Como una realización particular del vector bacteriófago M13 mencionado anteriormente, dicha primera secuencia de polinucleótido se da en la SEQ ID NO: 3 y dicha segunda secuencia de polinucleótido se da en la SEQ ID NO: 4.
10 Como otra realización particular de los vectores mencionados anteriormente, dicho vector comprende adicionalmente una secuencia de polinucleótido que codifica una secuencia marcadora de detección adecuada clonada en fase con y corriente arriba de la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1. Como una realización particular adicional del vector mencionado anteriormente, dicha primera secuencia de polinucleótido se da en la SEQ ID NO: 15. Como una realización particular más adicional a
15 cualquiera de los vectores mencionados anteriormente, dicho vector es una molécula de polinucleótido de cadena doble.

Como otra realización, la presente invención proporciona cualquiera de los vectores de bacteriófago M13 tipo 33 como se ha descrito anteriormente, que comprenda adicionalmente una secuencia de polinucleótido que codifique un polipéptido exógeno, y particularmente un polipéptido exógeno de hasta 35 aminoácidos de longitud, se clonan en
20 fase con y corriente arriba de la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia polipeptídica que se da como la SEQ ID NO: 1, o corriente arriba de la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia marcadora de detección adecuada. Más particularmente, la secuencia de polinucleótido que codifica el péptido exógeno se clona en fase con la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1, o con la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia marcadora de detección adecuada, mediante una
25 secuencia de polinucleótido que codifica un engarce peptídico corriente arriba de la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1, o la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia marcadora de detección adecuada. Más particularmente, el polipéptido exógeno tiene entre 7 y 35 aminoácidos de longitud.

En otra realización más, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de una partícula de bacteriófago M13 que comprende: (a) transfectar una célula huésped bacteriana con un vector bacteriófago M13 tipo 33 de cadena doble que comprende una primera secuencia de polinucleótido que codifica una secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1 y una segunda secuencia de polinucleótido que codifica una secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 2, (b) la incubación de dichas células huésped bacteriana en condiciones adecuadas para la expresión de dichas primera y segunda secuencias de polinucleótido y el ensamblaje de las
35 partículas del bacteriófago M13 en dicha célula huésped bacteriana, y (c) la recuperación a partir de dicha células huésped bacteriana de una partícula de bacteriófago M13 que comprende las secuencias polipeptídicas que se dan en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 presentadas independientemente sobre la superficie de revestimiento del bacteriófago M13. Más particular respecto a esta realización, dicha secuencia de polinucleótido se da en la SEQ ID NO: 3 y dicha segunda secuencia de polinucleótido se da en la SEQ ID NO: 4.
40 Como otra realización particular, la presente invención proporciona cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente en los que el vector bacteriófago M13 de doble cadena comprende adicionalmente una secuencia de polinucleótido que codifica una secuencia marcadora de detección adecuada clonada en fase con y corriente arriba de la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1. Como otra realización particular más, el vector bacteriófago M13 de doble cadena comprende la secuencia de polinucleótido que se da en la SEQ ID NO: 15. Incluso más particularmente, la presente invención proporciona cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, en los que el vector M13 de cadena doble comprende adicionalmente una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido exógeno, y particularmente un polipéptido exógeno de hasta 35 aminoácidos de longitud, se clonan en fase con y corriente arriba de la secuencia de polinucleótido que
45 codifica la secuencia polipeptídica que se da como la SEQ ID NO: 1, o corriente arriba de la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia marcadora de detección adecuada. Como otra realización particular, la secuencia de polinucleótido que codifica el polipéptido exógeno se clona en fase con la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1, o con la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia marcadora de detección adecuada, mediante una secuencia de polinucleótido que codifica un engarce peptídico corriente arriba de la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia polipeptídica que se da
50 en la SEQ ID NO: 1, o la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia marcadora de detección adecuada. Más particularmente, el polipéptido exógeno tiene entre 7 y 35 aminoácidos de longitud. Como otra realización particular respecto a los procedimientos mencionados anteriormente, la célula huésped bacteriana es una cepa bacteriana F⁺ tal como una célula de XL-1 blue de *E. coli* o una célula XLO de *E. coli*.

En otra realización más, la presente invención proporciona una partícula de bacteriófago M13 en el que dicha partícula comprende las secuencias de polipéptido que se dan en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 presentadas independientemente en la superficie de revestimiento de la partícula de fago. Más particularmente, la presente invención proporciona la partícula de bacteriófago M13 mencionada anteriormente en la que dicha partícula comprende adicionalmente una secuencia marcadora de detección adecuada fusionada al

extremo N de la secuencia polipeptídica que se da por la secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Más particularmente aún, la presente invención proporciona cualquiera de las partículas de bacteriófago M13 mencionadas anteriormente en la que dicha partícula comprende adicionalmente un polipéptido exógeno, y particularmente un polipéptido exógeno de hasta 35 aminoácidos de SEQ ID NO: de longitud, fusionado al extremo N de la secuencia polipeptídica que se da por la secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o al extremo N de la secuencia marcadora de detección adecuada. En otra realización particular, el polipéptido exógeno se fusiona a la secuencia polipeptídica que se da en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o la secuencia marcadora de detección adecuada, mediante un engarce peptídico fusionado al extremo N de la secuencia polipeptídica dada por la SEQ ID NO: 1, o al extremo N de la secuencia marcadora de detección adecuada, y al extremo C del polipéptido exógeno. Más particularmente, el polipéptido exógeno fusionado a la secuencia polipeptídica deseada por la SEQ ID NO: 1, o la secuencia marcadora de detección, tiene entre 7 y 35 aminoácidos de longitud.

En otra realización más, la presente invención proporciona un procedimiento para la infección de una célula huésped bacteriana que comprende poner en contacto dicha célula huésped bacteriana con una partícula de bacteriófago M13 que comprende las secuencias de polipéptido que se dan en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 presentadas independientemente sobre la superficie de revestimiento de la partícula de bacteriófago M13. Más particularmente, la presente invención proporciona el procedimiento mencionado anteriormente en el que dicha partícula de bacteriófago M13 comprende adicionalmente una secuencia marcadora de detección adecuada fusionada al extremo N de la secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1. Más particularmente aún, la presente invención proporciona cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente en los que dicha partícula del bacteriófago M13 comprende adicionalmente un polipéptido exógeno, y particularmente un polipéptido exógeno de hasta 35 aminoácidos de longitud, fusionado al extremo N de la secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1, o al extremo N de la secuencia marcadora de detección adecuada. Más particularmente, el polipéptido exógeno se fusiona a la secuencia polipeptídico que se da en la SEQ ID NO: 1, o la secuencia marcadora de detección adecuada, mediante un engarce peptídico fusionado al extremo N de la secuencia polipeptídica dada por la SEQ ID NO: 1, o al extremo N de la secuencia marcadora de detección adecuada, y al extremo C del polipéptido exógeno. Más particularmente, el polipéptido exógeno fusionado a la secuencia polipeptídica deseada por la SEQ ID NO: 1, o la secuencia marcadora de detección, tiene entre 7 y 35 aminoácidos de longitud. Como otra realización particular respecto a los procedimientos mencionados anteriormente, la célula huésped bacteriana es una cepa bacteriana F⁺ tal como una célula de XL-1 blue de *E. coli* o una célula XLO de *E. coli*.

Cuando se utiliza un vector bacteriófago M13 tipo-33 para la expresión y presentación de los productos de fusión con la proteína P.III, las proteínas P.III codificadas por los genes g.III de tipo silvestre y recombinante compiten por el ensamblaje en las partículas de fago. Los trabajos previos en el campo demostraban que la modificación del sitio de escisión en la región c y algunos restos de la región h de las secuencias de señal Sec podían dar como resultado un aumento de la expresión de fragmentos de anticuerpos presentados sobre las partículas de fago utilizando un sistema de vector 3 + 3. (Lee y col., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411 (2011); 348-353). Al contrario que en la técnica anterior, el objetivo de la presente invención es influenciar en la relación de los productos genéticos codificados por los genes g.III de tipo silvestre y recombinantes expresados en el periplasma en favor de la proteína P.III codificada por el gen g.III recombinante. Como consecuencia de la presente invención, se consigue un aumento de la expresión relativa y presentación de proteína P.III codificada por el gen g.III recombinante que, a su vez, da como resultado un aumento de la presentación de péptidos exógenos cuando las secuencias de nucleótido que codifican dichos péptidos exógenos se clonan en fase con el gen g.III recombinante.

Definiciones

"Vector", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otra secuencia de ácido nucleico (o múltiples secuencias de ácido nucleico) a la que se ha ligado en la célula huésped o genoma. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN circular, normalmente de cadena doble, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en la célula huésped en la cual se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tiene un origen de replicación bacteriano). Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes (por ejemplo, genes que codifican un péptido o proteína exógenos de interés) al que están unidos operativamente cuando se combinan con secuencias de control apropiadas tales como secuencias promotoras y operadoras y sitios de inicio de replicación. Se hace referencia comúnmente a dichos vectores como "vectores de expresión" y también pueden incluir un sitio de clonación múltiple para la inserción del gen que codifica la proteína de interés. De manera alternativa, el gen que codifica el péptido o proteína de interés puede introducirse mediante mutagénesis dirigida al sitio tal como la mutagénesis de Kunkel. (Handa y col., *Rapid and Reliable Site-Directed Mutagenesis Using Kunkel's Approach, Methods in Molecular Biology*, vol. 182: *In Vitro Mutagenesis Protocols*, 2^a Ed.).

"Vector bacteriófago M13 tipo 33", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un "Vector" capaz de transportar secuencias de ácido nucleico del genoma del bacteriófago M13 en las células o genomas huésped y comprende regiones codificantes para dos copias de la proteína de superficie P.III (es decir, un gen g.III de tipo silvestre y recombinante) además de las regiones codificantes de cada una de las proteínas restantes (P.I, P.II,

P.IV - P.XI) codificadas por el genoma del bacteriófago M13. Los vectores de bacteriófago M13 tipo 33 de la presente invención contienen mutaciones en la copia de tipo silvestre del gen g.III que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos diferentes de la proteína de superficie P.III codificada por los genes g.III de tipo silvestre (no mutado) y g.III recombinante.

Un péptido, polipéptido o proteína "exógenos" o "ajenos" se refiere a un péptido, polipéptido o proteína codificados por una secuencia de ácido nucleico que no está presente normalmente en la célula o genoma huésped a partir del cual se va a expresar el ácido nucleico. "Marcador de detección adecuado" o "secuencia marcadora de detección adecuada", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una secuencia peptídica que puede injertarse o fusionarse con otra proteína o péptido de interés mediante técnicas recombinantes. El injerto de la secuencia marcadora en la proteína de interés permite la detección de la proteína, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra la secuencia peptídica marcadora. La determinación de las secuencias marcadoras de detección adecuadas está bien en el conocimiento de los expertos en la técnica. Las secuencias de detección típicas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, marcador c-myc, marcador HA, marcador His, marcador Flag, y marcador S.

"Clonado en fase", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la inserción de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido particular de interés) en la misma fase de lectura abierta que un ácido nucleico de referencia o gen (por ejemplo, un gen que codifica una proteína separada a la que el polipéptido de interés se va a fusionar). Como apreciará un experto en la técnica, la inserción de ácido nucleico se puede insertar contigua al gen de referencia o se puede insertar en un sitio separado espacialmente mediante el uso de una secuencia que codifique un engarce que también se clona en fase. Además, la inserción de ácido nucleico se puede insertar o bien corriente arriba o corriente debajo de la secuencia de ácido nucleico de referencia. Como se utiliza en el presente documento, "corriente arriba" se refiere a la situación o localización de una secuencia de ácido nucleico de interés con respecto a un ácido nucleico o gen de referencia de manera que la secuencia de interés se traduce antes que el ácido nucleico o gen de referencia durante la traducción. De igual manera, "corriente abajo" se refiere a la situación o localización de una secuencia de ácido nucleico de interés con respecto a un ácido nucleico o gen de referencia de manera que la secuencia de interés se traduce después del ácido nucleico o gen de referencia durante la traducción.

"Engarce peptídico" como se utiliza en el presente documento se refiere a una secuencia polipeptídica que se fusiona o une un primer péptido o proteína con un segundo péptido o proteína. El extremo N de la secuencia polipeptídica del engarce se une covalentemente al extremo C del primer péptido o proteína mediante un enlace amida mientras que el extremo C de la secuencia polipeptídica del engarce se une covalentemente al extremo N del segundo péptido o proteína, también mediante un enlace amida. Los engarces peptídicos típicos para su uso en la presente invención incluyen péptidos que contienen serina tales como las secuencias peptídicas $-(G_3SG)_n-$ y $-(G_4S)_n-$, y engarces en α -hélice tales como -AEAAAKEAAAKEAAKA- (SEQ ID NO: 34), -AEAAAKEAAAKEAAKAGGGGS- (SEQ ID NO: 35), y -AEAAAKEAAAKEAAKAGPPGP- (SEQ ID NO: 36).

Las cadenas polipeptídicas que se desvelan en el presente documento se representan por su secuencia de aminoácidos a partir del extremo N hasta el extremo C, cuando se lee de izquierda a derecha, con cada aminoácido representado por su abreviatura de aminoácido de una única letra o de tres letras. El "extremo N" (o extremo amino) de un aminoácido, o una cadena polipeptídica, se refiere al grupo amina libre del aminoácido, o el grupo amina libre del primer resto de aminoácido de la cadena polipeptídica. De la misma manera, "extremo C" (o extremo carboxilo) de un aminoácido, o una cadena polipeptídica, se refiere al grupo carboxilo libre del aminoácido, o el grupo carboxilo libre del resto de aminoácido final de la cadena polipeptídica.

Modificación del vector

Utilizando la mutagénesis de Kunkel (Handa y col., Rapid and Reliable Site-Directed Mutagenesis Using Kunkel's Approach, Methods in Molecular Biology, vol. 182: In Vitro Mutagenesis Protocols, 2ª Ed.), los primeros sesenta y siete aminoácidos de la región N1 de la proteína P.III codificada por el gen g.III de tipo silvestre se aleatorizan respecto a diferentes aminoácidos mientras que se monitoriza el nivel de presentación de una secuencia marcadora de detección, por ejemplo, proteína c-myc (EQKLISEEKL: SEQ ID NO: 7), fusionada a la proteína P.III codificada por el gen g.III recombinante. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia marcadora de detección, por ejemplo, la secuencia codificante de c-myc (gagcaaaagctcattagtagaagaggatctt: SEQ ID NO: 8) se clona en fase con el gen g.III recombinante. Se utiliza la cepa RZ1032 de *Escherichia coli* (ATCC 39737) que carece de dUTPasa y uracil glicosilasa funcionales, para preparar un ADN de cadena sencilla que contiene uracilo del vector de bacteriófago M13 tipo 33 parental (SEQ ID NO: 6). Los sesenta y siete cebadores mutagénicos se dividen en cuatro reacciones de Kunkel diferentes, cubriendo tres reacciones diecisiete mutaciones y una reacción que cubre diecisiete mutaciones. Cada cebador en un grupo de reacción contiene un codón NNK que se corresponde con el aminoácido que se va a aleatorizar completamente y se diseñan para compartir la misma secuencia flanqueante con el vector parental para asegurar que todos los cebadores se hibridarán con la matriz con una eficacia comparable.

A continuación de la mutación del vector parental, se utilizan los vectores modificados como matrices para preparar un ADN de doble cadena que se transfectan entonces en células huésped bacterianas (por ejemplo, células XL1-Blue de *E. coli*) mediante electroporación para la expresión de las partículas del bacteriófago M13. Antes de la exploración de las bibliotecas de fagos M13, los fagos aleatorios de cada biblioteca se secuencian para asegurar que cada posición está completamente aleatorizada respecto a los 20 aminoácidos sin ninguna tendencia por un aminoácido en particular.

Recolección de fagos y determinación del título

Después de una amplificación durante una noche, el fago se puede recolectar de la siguiente manera: Las células huésped bacterianas infectadas (por ejemplo, células XL-1 Blue) se centrifugan a 3.000 rpm durante aproximadamente 20 minutos. Se transfieren entonces 40 ml de sobrenadante a un matraz nuevo y se precipitan los fagos por adición de 10 ml de una solución de PEG (un 20 % de PEG que incluye NH₄OAc 3,5 M) y se incuba a 4 °C durante aproximadamente 90 minutos. La mezcla se centrifuga entonces a 13.000 rpm durante aproximadamente 45 min. El aglomerado se resuspende entonces en 1 ml de PBS (solución salina tampón de fosfato, pH 7,4) y se centrifuga durante 5 minutos a 13.000 rpm para retirar los desechos celulares residuales. El sobrenadante se transfiere entonces a un tubo nuevo, se añaden 200 µl de la solución de PEG, y la mezcla se incuba sobre hielo durante aproximadamente 30 min. La mezcla se precipita por centrifugación a 13.000 rpm durante aproximadamente 45 min a 4 °C. El aglomerado resultante se resuspendió en 200-500 µl de PBS y se centrifugó a 13.000 rpm durante aproximadamente 5 min para retirar los desechos celulares residuales. El sobrenadante se transfiere entonces a un tubo nuevo y se repite el procedimiento de centrifugación hasta que no hay presente restos celulares bacterianos.

El sobrenadante se puede transferir entonces a un tubo nuevo para la determinación del título de la siguiente manera: Se preparan diluciones en serie del sobrenadante que contiene los fagos y se añaden entonces 100 µl de cada dilución a un nuevo tubo seguido por la adición de 300 µl de células bacterianas (por ejemplo, células XL1-Blue) que se han dejado en cultivo durante una noche. La mezcla se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos y luego se añaden 3 ml de agar blando a cada tubo. (El agar blando se puede preparar de la siguiente manera: Se llena una botella de 250 ml con 50 ml de caldo lisogénico (LB), se añade Bacto agar 2.08 en polvo (Fisher DF0140-01-1), luego se remueve para mezclarlo. La mezcla se lleva a 250 ml con LB adicional, se lleva al autoclave durante 45 min, y se almacena a 55 °C. La mezcla se remueve brevemente y entonces se añade a las placas LB y se incuba durante una noche a 37 °C. Las placas resultantes se cuentan entonces y se determina el título como unidades formadoras de placas (ufp).

Infección y amplificación del fago

Para la amplificación de clones de fago particulares, se pueden emplear los siguientes procedimientos: Se cultiva una única colonia de células huésped bacterianas (por ejemplo, células XL1-Blue (Stratagene)) en 50 ml de medio 2YT suplementado con tetraciclina a 37 °C mientras se agita hasta una densidad de DO₆₀₀ 0,4-0,6. Se añadieron aproximadamente 10⁸ ufp (unidades formadoras de placas) de fagos al cultivo bacteriano y la mezcla se incubó entonces a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos mientras se deja en reposo para permitir la infección del fago. El cultivo celular infectado se incuba entonces a 37 °C durante 12-15 horas mientras se agita para permitir la amplificación del fago.

Exploración de bacteriófagos M13

Ensayo de captura por elevación de filtro:

Para identificar las mutaciones que dan como resultado una presentación mayor de c-myc fusionado a la proteína P.III codificada por el gen g.III recombinante, se puede utilizar un ensayo de elevación de filtro (Wu, Simultaneous Humanization and Affinity Optimization of Monoclonal Antibodies, Methods in Molecular biology, Vol. 2017. Recombinant Antibodies for Cancer Therapy: Methods and Protocols, editado por Weischof y Krauss). En resumen, se revisten filtros de nitrocelulosa con 2 µg/ml de un anticuerpo anti-bacteriófago M13 (GE Biosciences 27-9420-01) y entonces se bloquea con caseína antes de elevar la placa. El nivel de presentación de c-myc se detecta mediante un anticuerpo c-myc conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA A5963) con placas que presentan un nivel de presentación más alto de proteína c-myc que aparecen con un color más oscuro. Las placas con niveles de presentación más alto del marcador c-myc se aíslan entonces para la secuenciación. El fago M13 secuenciado que tiene las mutaciones que dan como resultado una señal de c-myc más fuerte se pueden amplificar para la exploración adicional, incluyendo un ELISA dependiente de título de fago y punto único, como se describe adicionalmente posteriormente.

ELISA dependiente del título de fago y punto único:

Para el ELISA de punto único, se amplificó un bacteriófago M13 individual con un aumento de nivel de presentación de c-myc (identificado, por ejemplo, por un ensayo de elevación en filtro) durante una noche utilizando 2 ml de cultivo bacteriano de XL1-Blue. A continuación de la amplificación, el cultivo se precipita por centrifugación y el sobrenadante (que contiene el fago) se utiliza en el ensayo. En resumen, las placas de ELISA se revistieron durante una noche con un anticuerpo anti-bacteriófago M13 (GE Biosciences 27-9420-01) y se bloqueó con caseína. El sobrenadante que contiene el fago M13 se añade y se detecta la presentación de c-myc mediante un anticuerpo anti-c-myc conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA A5963). Los niveles de expresión de c-myc se determinaron por espectrofotometría midiendo la DO a la longitud de onda apropiada, utilizando un sustrato apropiado. El fago que demuestra los niveles de presentación del péptido c-myc pueden confirmarse adicionalmente en un ELISA dependiente del título del fago, donde el nivel de presentación de c-myc para los clones individuales se determina sobre un intervalo de títulos y se comparan con el nivel de presentación de c-myc de los clones obtenidos por transfección con el vector parental (es decir, el vector que contiene el gen g.III de tipo silvestre (sin mutaciones), y la

proteína c-myc clonada en fase con el gen g.III recombinante).

Ejemplo 1

Presentación de la fusión marcador c-myc-P.III sobre la superficie del bacteriófago M13

5 Utilizando un vector parental de bacteriófago M13 tipo-33 que comprendía el gen g.III tanto de tipo silvestre (SEQ ID NO: 5) y un gen g.III recombinante (SEQ ID NO: 3) bajo el control de un promotor lacZ, codificando cada gen una copia de la proteína de superficie P.III y utilizando las secuencias de nucleótido que codifican la P.III endógena y los péptidos de señal pelB, respectivamente (SEQ ID NO: 17 y 19), los aminoácidos únicos de la región N1 del g.III de tipo silvestre se aleatorizan esencialmente como se ha descrito anteriormente. Se construyen los vectores modificados que comprenderían las mutaciones que codifican las sustituciones **L8P** o **S11P** en el producto del gen g.III de tipo silvestre maduro y se transfectan en células XL1-Blue de *E. coli* para que expresen la secuencia que codifica el marcador c-myc (SEQ ID NO: 8) se clona en fase con y corriente arriba del gen g.III recombinante. La proteína de fusión P.III-c-myc resultante se presenta sobre la superficie de las partículas M13 recolectadas y se detectaron los niveles de presentación de c-myc mediante un ELISA dependiente del título de fago, esencialmente como se ha descrito anteriormente.

15 La Tabla 1 posterior, proporciona las secuencias de ácido nucleico de los genes g.III de tipo silvestre parental y mutado, el gen g.III recombinante, la secuencia que codifica el marcador c-myc, las secuencias que codifican el péptido de señal y las secuencias de aminoácidos resultantes de esta manera. La Tabla 2 proporciona los resultados del ELISA dependiente del título del fago.

Tabla 1

Secuencias de ácido nucleico			
Componente del vector	Vector parental, (gen g.III de tipo silvestre)	Vector mutado (gen g.III de tipo silvestre que codifica la sustitución L8P)	Vector mutado (gen g.III de tipo silvestre que codifica la sustitución S11P)
Gen g.III de TS	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
Gen g.III recombinante	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 3
Gen del marcador c-myc	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 8
Secuencia de señal de g.III de TS	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 17
Secuencia de señal de g.III recombinante	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 19
Secuencias de aminoácidos codificados			
Producto codificado	Vector parental, (gen g.III de tipo silvestre)	Vector mutado (gen g.III de tipo silvestre que codifica la sustitución L8P)	Vector mutado (gen g.III de tipo silvestre que codifica la sustitución S11P)
Producto del gen g.m de TS	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22
Producto del gen g.III recombinante	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 1
Marcador c-myc	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 7
Péptido de señal del g.III de TS	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 18
Péptido de señal del g.III recombinante	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 20

Tabla 2

Título del fago (ufp/pocillo)	Gen g.III parental de tipo silvestre (DO ₅₆₀)	Gen g.III mutado de tipo silvestre que codifica la sustitución L8P (DO ₅₆₀)	Gen g.III mutado de tipo silvestre que codifica la sustitución S11P (DO ₅₆₀)
0	0,1364	0,1057	0,137
7,80E+06	0,1473	0,126	0,1434
1,60E+07	0,1449	0,1356	0,1357
3,10E+07	0,1451	0,1381	0,1423
6,30E+07	0,1663	0,1422	0,159
1,30E+08	0,1505	0,1488	0,1711
2,50E+08	0,142	0,1629	0,1887
5,00E+08	0,1777	0,1949	0,2283
1,00E+09	0,1753	0,2347	0,2805
2,00E+09	0,2047	0,4117	0,4519
4,00E+09	0,3157	0,8489	0,9137

La Tabla 2 proporciona los valores de la DO₅₆₀ de un ELISA dependiente de título como se describe en general anteriormente utilizando un sustrato PMP/AMP y demuestra que cuando se utiliza un vector fago M13 tipo 33 que contiene las mutaciones que codifican las sustituciones L8P o S11P en el producto del gen g.III de tipo silvestre maduro, se obtiene un aumento de la expresión de la proteína c-myc fusionada a la proteína de superficie P.III codificada por el gen g.III recombinante.

Ejemplo 2

Presentación de fusiones del péptido de ensayo-P.III sobre la superficie del fago M13 (cuando se combina con las mutaciones 8P + 11P en el gen g.III TS)

Se construyeron los vectores del bacteriófago M13 tipo-33 modificado adicionalmente que comprende las mutaciones que codifican las sustituciones **L8P y S11P** en el producto del gen g.III de tipo silvestre maduro (SEQ ID NO: 2). Una secuencia de ácido nucleico ejemplar que codifica dicho producto genético se da en la SEQ ID NO: 4. En los mismos vectores se clonan en fase por separado, las secuencias de ácido nucleico que codifican el péptido de ensayo (como se da en la SEQ ID NO: 10, 12 y 14, posteriores), mediante secuencias que codifican un engarce peptídico, con una secuencia que codifica un marcador c-myc (SEQ ID NO: 8) que, a su vez, se clona en fase con y corriente arriba de la secuencia del gen g.III recombinante (SEQ ID NO: 3) en el vector. Las mismas secuencias de ácido nucleico que codifican el péptido de ensayo se clonaron también cada una por separado (de la misma manera y formato que se ha descrito anteriormente) en el bacteriófago M13 tipo-33 parental que no comprende las mutaciones de ácido nucleico que codifican L8P- o S11P en el gen g.III de tipo silvestre (SEQ ID NO: 5 proporciona la secuencia de ácido nucleico del gen g.III de tipo silvestre parental sin las mutaciones que codifican L8P- o S11P).

La Tabla 3 proporciona las secuencias de ácido nucleico del gen g.III de tipo silvestre parental y mutado, el gen g.III recombinante, la secuencia que codifica el marcador c-myc, las secuencias que codifican el engarce peptídico y las secuencias que codifican el péptido de ensayo de los clones de vector ejemplares preparados.

Los vectores resultantes se utilizaron para presentar las proteínas de fusión del péptido de ensayo-P.III sobre la superficie de las partículas de bacteriófago M13 recolectadas de las células bacterianas de XL-1 Blue. Los péptidos de ensayo empleados para unirse a la proteína diana IL-6 humana como se describe adicionalmente con posterioridad. La Tabla 4 proporciona las secuencias de aminoácidos correspondientes de los componentes de los productos de proteína de fusión presentados en las partículas de fago M13 recolectadas.

Tabla 3

Componente de ácido nucleico	Clon del vector		
	18-24 ^a	18-22 ^a	18-4 ^a
Gen g.III mutado de tipo silvestre	(SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 4)
Gen g.III parental de tipo silvestre	(SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 5)
Gen g.III recombinante	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 3)
Secuencia codificante de c-myc	(SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 8)
Secuencia codificante del engarce peptídico	(SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 16)
Secuencia codificante del péptido de ensayo	cgcacctttgcaaagaatttg ggcgctatgtggcggatgaa acctattgcgcggcgctg (SEQ ID NO: 10)	attagcctgtgcatcagccg tatgtgaaaagcctgaacctg ccgctgtgcccgcctggcg (SEQ ID NO: 12)	ccgccgctgtgcagctggcc ggcgctatcagaatttggcgg cccgcctgtgcaccctgggc (SEQ ID NO: 14)
^a Los clones del vector se preparan con el gen g.III de tipo silvestre mutado, que contiene las mutaciones que codifican las sustituciones L8P y S11P (es decir, SEQ ID NO: 4), o el gen g.III de tipo silvestre parental (es decir, SEQ ID NO: 5).			

Tabla 4

Componente de aminoácidos	Proteína de fusión presentada		
	18-24 ^a	18-22 ^a	18-4 ^a
Producto del gen g.III mutado de tipo silvestre maduro	(SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 2)
Producto del gen g.III de tipo silvestre parental maduro	(SEQ ID NO: 1)	(SEQ ID NO: 1)	(SEQ ID NO: 1)
Producto del gen g.III recombinante	(SEQ ID NO: 1)	(SEQ ID NO: 1)	(SEQ ID NO: 1)
Proteína marcadora c-myc de detección	(SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 7)
Secuencia del engarce peptídico	(SEQ ID NO: 33)	(SEQ ID NO: 33)	(SEQ ID NO: 33)
Secuencia del péptido de ensayo	RTFCKEFGRYVAD ETYCAAL (SEQ ID NO: 9)	ISLCDQPYVKSLNL PLCPLA (SEQ ID NO: 11)	PPLCSWPAYQKFG GPLCTLG (SEQ ID NO: 13)
^a Proteínas de fusión presentadas que contienen el producto del gen g.III de tipo silvestre mutado que contiene las sustituciones L8P y S11P (es decir, SEQ ID NO: 2), o el producto del gen g.III de tipo silvestre parental.			

El fago recolectado que presenta las proteínas de fusión péptido de ensayo-P.III se amplificaron y se llevó a cabo la determinación del título como se ha descrito en general anteriormente. Los niveles de presentación del péptido de ensayo se determinaron por ELISA dependiente de título de fago esencialmente como se describe posteriormente:

5 Las placas de ELISA (Greiner-bio-one, número de Cat.: 650061) se revistieron con 50 µl/pocillo con NeutrAvidin (Thermo Scientific, número de Cat.: 31050) a 2 µg/ml en PBS y se dejó en reposo durante una noche a 4 °C. El exceso de sitios se bloqueó añadiendo 100 µl/pocillo de Caseína (Thermo Scientific, número de Cat.: 37528) durante una hora a temperatura ambiente. Entonces se añadieron 50 µl/pocillo de IL6 humana biotinilada (R&D Systems, número de Cat. 206-IL-010/CF) en PBS a cada pocillo y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos mientras se balancea. Se añadieron entonces 50 µl/pocillo de fago a diferentes títulos y el fago diluido a una
10 concentración final de un 1 % de BSA en PBS. Las placas se incubaron entonces durante 60 minutos a temperatura ambiente mientras se balancea. Se añadieron entonces 50 µl/pocillo de anti-M13-HRP (G.E., número de Cat.: 27-9421-01), diluido 1:5.000 en un 0,1 % de tween en PBS seguido por la incubación de las placas durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron entonces 50 µl/pocillo de sustrato de Ultra tetrametilbencidina (sustrato Ultra TMB, Thermo Scientific, número de Cat.: 34029) y se determinó la DO a 650 nm.

15 La Tabla 5 posterior proporciona los valores de la DO₆₅₀ obtenidos en un intervalo de títulos de fago para los clones de fago 18-24, 18-22 y 18-4 preparados cada uno por separado con el vector de bacteriófago M13 tipo-33 que codifica las mutaciones que codifican L8P- y S11P en el gen g.III de tipo silvestre y el vector de bacteriófago M13 tipo-33 parental (sin las mutaciones que codifican L8P- y S11P en el gen g.III de tipo silvestre).

Tabla 5

Título del fago (ufp/pocillo)	Clon de fago 18-24		Clon de fago 18-22		Clon de fago 18-4	
	Parental ^a (DO ₆₅₀)	Mutado ^b (DO ₆₅₀)	Parental ^a (DO ₆₅₀)	Mutado ^b (DO ₆₅₀)	Parental ^a (DO ₆₅₀)	Mutado ^b (DO ₆₅₀)
2,3E+08	0,0735	0,3414	0,0536	0,3284	0,0879	0,4286
6,9E+08	0,0426	0,8103	0,0416	0,7749	0,1359	0,988
2,1E+09	0,049	1,4618	0,0535	1,4022	0,3378	1,5715
6,2E+09	0,0521	1,9132	0,0605	1,8236	0,8358	1,918
1,9E+10	0,0675	2,0298	0,1132	1,967	1,4314	2,0064
5,6E+10	0,1189	2,0099	0,3253	1,9578	1,756	1,8853
1,7E+11	0,2946	1,7346	0,7754	1,7187	1,8199	1,5817
5,0E+11	0,6837	1,5017	1,4298	1,4979	1,6572	1,2222

^a Clones de fagos preparados con el vector del bacteriófago M13 tipo 33 que contienen el gen g.III de tipo silvestre (que no codifica las sustituciones L8P y S11P).
^b Clones de fagos preparados con el vector de bacteriófago M13 tipo 33 que contienen el gen g.III tipo silvestre mutado que codifica las sustituciones L8P y S11P.

20 Los valores de la DO₆₅₀ de la Tabla 5 demuestran que cuando se utiliza un vector de bacteriófago M13 tipo 33 que contiene mutaciones que codifican las sustituciones L8P y S11P en el producto del gen g.III tipo silvestre maduro, se obtiene un aumento de la expresión de cada péptido de ensayo fusionado (mediante un engarce peptídico) a una proteína de superficie P.III codificada por el gen g.III recombinante.

25 **Ejemplo 3**

Presentación de fusiones Fab-P.III sobre la superficie del fago M13

Las secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias de Fab de cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) se dan en la SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, respectivamente, se clonan en un vector de bacteriófago M13 tipo-33 que comprende las mutaciones que codifican las sustituciones L8P y S11P en el producto del gen g.III de tipo silvestre maduro. La secuencia de ácido nucleico que codifica el Fab de HC (SEQ ID NO: 27), que utiliza la
30 secuencia que codifica el péptido de señal PhoA1 (SEQ ID NO: 30), se clona en fase y corriente arriba, mediante una secuencia que codifica un espaciador, a una secuencia codificante que codifica el marcador HA (SEQ ID NO: 32) y una secuencia de que codifica un marcador c-myc (SEQ ID NO: 8) que, a su vez, se clona en fase y corriente arriba de la secuencia del gen g.III recombinante (SEQ ID NO: 3) en el vector. La secuencia de ácido nucleico que
35 codifica el Fab de LC (SEQ ID NO: 28) se clona por separado en el vector utilizando la secuencia codificante del péptido de señal pelB (SEQ ID NO: 19). La transcripción de los componentes que codifican el Fab tanto de HC como de LC está bajo el control del promotor lacZ.

Los vectores de cadena doble que comprende las secuencias de Fab de HC y LC como se han descrito anteriormente se preparan y utilizan para transfectar células XL1-Blue de *E. coli* esencialmente como se ha descrito previamente. La secuencia de LC (SEQ ID NO: 26) se secreta en el espacio periplásmico bacteriano donde se forma el dímero Fab con la secuencia de HC (SEQ ID NO: 25) se fusionan mediante el marcador HA (SEQ ID NO: 31) y un marcador c-myc (SEQ ID NO: 7) a la proteína P.III recombinante.

El fago recolectado que presenta las proteínas de fusión Fab-P.III se amplificaron y se llevó a cabo la determinación del título como se ha descrito en general anteriormente. Los niveles de presentación de Fab se determinaron entonces mediante un ELISA dependiente de título de fago utilizando el TNF α biotinilado como ligando diana como se describe en general en Nakayama y col., Improving the Copy Number of Antibody Fragment Expressed on the Major Coat Protein of Bacteriophage M13, Immunotechnology, Vol. 12 (1996): 197-207.

La Tabla 6 posterior proporciona los valores de la DO₆₅₀ obtenidos en un intervalo de títulos de fago para los clones de fago que presentan las construcciones de Fab, preparados por separado con el vector de bacteriófago M13 tipo-33 que codifica las mutaciones que codifican L8P- y S11P en el gen g.III de tipo silvestre y el vector de bacteriófago M13 tipo-33 parental (sin las mutaciones que codifican L8P- y S11P en el gen g.III de tipo silvestre).

Tabla 6

Título del fago ufp/pocillo	Parental ^a (DO ₆₅₀)		Título del fago ufp/pocillo	Mutado ^b (DO ₆₅₀)
0	0,0699		0	0,0548
1,69E+06	0,0791		1,69E+05	0,0846
5,08E+06	0,0857		5,08E+05	0,1067
1,52E+07	0,0913		1,52E+06	0,1791
4,57E+07	0,1092		4,57E+06	0,3578
1,37E+08	0,1712		1,37E+07	0,7649
4,12E+08	0,3803		4,12E+07	1,4751
1,23E+09	0,8396		1,23E+08	1,9562
3,70E+09	1,6574		3,70E+08	2,2079
1,11E+10	2,2358		1,11E+09	2,202
3,33E+10	2,4446		3,33E+09	2,0309
1,00E+11	2,5538		1,00E+10	1,3518

^a Clones de fagos preparados con el vector del bacteriófago M13 tipo 33 que contienen el gen g.III de tipo silvestre (que no codifica las sustituciones L8P y S11P).
^b Clones de fagos preparados con el vector de bacteriófago M13 tipo 33 que contienen el gen g.III tipo silvestre mutado que codifica las sustituciones L8P y S11P.

Los valores de la DO₆₅₀ de la Tabla 6 demuestran que cuando se utiliza un vector de bacteriófago M13 tipo 33 que contiene mutaciones que codifican las sustituciones L8P y S11P en el producto del gen g.III tipo silvestre maduro, se obtiene un aumento de la expresión de un Fab fusionado (mediante un espaciador peptídico) a una proteína de superficie P.III codificada por el gen g.III recombinante.

Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 (proteína de superficie P.III del fago M13 maduro codificada por el gen g.III recombinante y de TS (sin péptido de señal))

gcccgaactgtgaaagttgcccggcaaacccatacagaaaatcattfactaacgtctggaaagacgacaaaactffagatcggtac
gctaactatgagggcgtctgtggaatgctacagggcgtttagtttactggtagcagaaactcagtggttacgggtacatgggttcctattg
ggcttgcctaccctgaaaaatgaggggtgggtggctctgaggggtggcgggtctgaggggtggcgggtactaaacctcc
tgagtacgggatacacctattccgggctatacttatacaacctctcagcggcacttatccgctgggtactgagcaaaaccccgctaa
tccaatcctctcttgaggagctcagcctctaaactttcaatggttcagaataataggtccgaaataggcagggggcattaactgtttat
acgggcaactgttactcaaggcactgaccccgttaaaacttataccaggtacactcctgtatcatcaaaagccatgtatgacgcttactgga
acggtaaatcagagactgcgcttccattctggcttfaatgaggatttattgtttgtgaatatcaaggccaatcgtctgacctgcctcaac
ctcctgcaatgctggcggcggctctgggtgggtggtctgggtggcggctctgaggggtgggtggctctgaggggtggcgggtctgaggggtgg
cggctctgagggagggcgggtccgggtgggtctgggtccgggtgattttagattatgaaaagatggcaaacgctaataagggggctatg
accgaaaatgccgatgaaaacgcgctacagctctgacgctaaaggcaaaacttgattctgtcgtactgattacgggtgctgctatcgatgg
ttcattgggtgacgttccggccttgcataatggtaatgggtgctactgggtgatttctggcttaatcccaatggctcaagtcgggtgacgg
tgataatcaccttfaatgaataatccgcaaatattaccctccctcccaatcggtgaaatgtcgccttttcttggcgtggtaaac
atatgaatttctattgattgtgacaaaataaacttattccgtgggtcttggcgttcttataatgttccacctttatgtatgtatttctacgtt
gctaacatactgcgtaataaggagtct

SEQ ID NO: 5 (secuencia de nucleótidos del gen g.III de tipo silvestre (sin secuencia codificante del péptido de señal))

gcccgaactgtgaaagttgtagcaaaatccatacagaaaatcattfactaacgtctggaaagacgacaaaactffagatcggtacg
ctaactatgagggcgtctgtggaatgctacagggcgtttagtttactggtagcagaaactcagtggttacgggtacatgggttcctattg
gcttgcctaccctgaaaaatgaggggtgggtggctctgaggggtggcgggtctgaggggtggcgggtactaaacctcc
gagtacgggatacacctattccgggctatacttatacaacctctcagcggcacttatccgctgggtactgagcaaaaccccgctaat
cctaactcctctcttgaggagctcagcctctaaactttcaatggttcagaataataggtccgaaataggcagggggcattaactgtttata
cgggcaactgttactcaaggcactgaccccgttaaaacttataccaggtacactcctgtatcatcaaaagccatgtatgacgcttactgga
cggtaaatcagagactgcgcttccattctggcttfaatgaggatttattgtttgtgaatatcaaggccaatcgtctgacctgcctcaacct
cctgtcaatgctggcggcggctctgggtgggtggtctgggtggcggctctgaggggtgggtggctctgaggggtggcgggtctgaggggtggc
ggctctgagggagggcgggtccgggtgggtctgggtccgggtgattttagattatgaaaagatggcaaacgctaataagggggctatga
ccgaaaatgccgatgaaaacgcgctacagctctgacgctaaaggcaaaacttgattctgtcgtactgattacgggtgctgctatcgatgggt
tcaatgggtgacgttccggccttgcataatggtaatgggtgctactgggtgatttctggcttaatcccaatggctcaagtcgggtgacgg
gataatcaccttfaatgaataatccgcaaatattaccctccctcccaatcggtgaaatgtcgccttttcttggcgtggtaaac
atatgaatttctattgattgtgacaaaataaacttattccgtgggtcttggcgttcttataatgttccacctttatgtatgtatttctacgtt
gctaacatactgcgtaataaggagtct

SEQ ID NO: 6 (secuencia de nucleótidos del plásmido de tipo-33 con el gen g.III recombinante y de TS (sin mutaciones que codifiquen L8P + S11P) (incluyendo las secuencias codificantes del péptido de señal))

aatgctactactattagtagaaltgatgccacccitfcagctcgcgccccaaatgaaaatagctaaacaggttattgaccattfgcgaaa
tgtatcfaatggcctaaactaaatctactcgttcgcagaattgggaatcaactgttatatggaatgaaacttcagacaccgtactffagtgc
ataittaaaacatggtgagctacagcattatattcagcaattaagctctaagccatctgcaaaaatgacctctatcaaaaggagcaattaa
aggctactcttaatccigacctggtggaggttgcttcggctcgtggttcgcttgaagctcgaattaaaacgcgatattggaagctttcgggc
ttcctcttaatcttttgatgcaatcogcttgcctctgactataatagtcagggtaaagacctgattttgatttatggtcattctcgtttctgaa
ctgittaaagcalttgagggggatcaatgaatattatgacgattccgagctatccagctaaacatttactgttaceccct
ctggcaaaactctttgcaaaagecctcgcctatctgggtttatcgtcgtcgtgtaaacgaggggtatgatagtggtccttactatgcc
cgtaatctctttggcgttatgtatctgcattagtgatgtggtatctctaaatctcaactgatgaatctttctacctgtaataatgttgcct
agttcgtttattaacgtagattttctcccaacgtcctgactggataatgagccagttcttaaaatcgcataaggtaatcacaatgattaa
agttgaaatfaaacctcacaagcccaatttactactcgttctggtgttctcgtcagggcaagcccttactgaatgagcagctttgta
cgttgattgggtaataatccgggtctgtcaagattactctgatgaaggtcagccagcctatgcgctggtctgtacaccggtcatct
gtcctcttcaaggttggtcagttcgggtcccttatgattgaccgctcgcgctcgttccggctaagtaacatggagcaggtcgcggatttc
gacacaatttatcagggcgtatgatacaaatctcgttactttgttcgctcgttggataatcgtgggggtcaaaagatgagtggtttagt
attctttgctcttctggttaggtggcttctgtagtggcattacgtatttaccggttaatggaaacttctcatgaaaagtctttagtc
ctcaaagcctctgtagccgttctaccctcgttcgatgctgtcttctcgtcgtgagggtgacgatcccgcaaaagcggcctttaaactcc
ctgcaagcctcagcgaccgaatatactgggtatgcgtgggcgatggttgttgcattgtcggcgcaactatcggatcaagctgittaa
aaatcaccctcgaagcaagctgataaacgatacaatfaaaggctcctttggagccttttttggagatttcaacgtgaaaaaattat
attcgcaattccttagttgttcttctatctcactccgccgaaactgttgaagttggttagcaaaatccatacagaaaattcattactaa
cgtctggaaagacgacaaaacttagatcgttacgctaactatgagggctgtctgtggaatgctacaggcgtttagttgtactgggtga
cgaactcagtggttacggtacatgggttctatgggcttgcctatccctgaaaatgaggggtggtgctctgaggggtggcgggtctgagg

aaagaaaaaccacccctggcgcccaatacgcaaacccctctccccgcgctggccgattcattaatgcagctggcagcagacaggtt
cccgactggaaagcgggcagtgagcgcacgcaatfaatgtgagtgagctcactcattaggcaccacagccttgacactttatgctcc
ggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaattcacacgccaaaggagacagtcataatgaaatacctattgcctacggcagc
cgclggattgttactcgcgcccccaaccagccatggccggcggagatctggcggagcaaaagctcattagtgaaaggatcttggc
gagacagtgagagctgcctggccaagtcgcacaccgagaacagcttcaccaatggttggaaaggatgataagaccctggaccgcta
tgccaattacgaaggtgcttattggaacgcaaccgggtgtggtgtgtgacagggcgtatgagacccaatgctatggcacctgggtgccg
atcggctcggcaatccgggagaacggaaggcggaggtagcgaaggagggtggaagtgaaggcggaggatcggaaaggggtggcac
aaagccaccagaatatggagacaccccgaftccaggttacacctacattaatccgctggatggtacataccctccaggcaccgaaca
gaatccggcaaacccgaaccggagcctggaagaaaagccaaccgctgaacacattatgttccaaaacaaccgfttctgtaaccgtcaa
ggagccctgaccgtatacaccggtaacagtgacccagggtacagatccgggtgaagacctactatcaatatacaccggttagcagcaag
gcaatgtacgatgcataatggaatggcaagttcgtgattgtgcattcatagcgggttcaacgaagacctgtttgtgtcgaataccagg
gtcagagcagcgafttaccgagccaccggtaacgcaggtggtggaagcggaggggggaagtggcgggtgggtcagaaggcggga
ggatcggaaaggaggtgggagtgaaaggagggggaagcgaaggaggggagatcaggaggtggtagcggaaagtggcgaactcgaact
acgagaagatggccaatgcaaacaaaggcgaatgacagagaacgcagacgagaatgcaactgcaaaagtgatgcaaaagggtaaagc
tggacacgctgcaaccgaactatggagcagcaatgacggcttattcggagatgtcagcgggtcggcgaacggcaacggagcaaca
ggcgacttcgaggttagcaacagccagatggcacagggtggagatggcgacaacagtccgctgatgaacaacttccaggtacct
ggcagctcggcacaagcgtcagtgccgtccggttgggtggcaggaagccgtacgagttcagcatcgaactcgcataagatta
atcttttcggggagtttcgcttctgctgtacgtggcaacgttcatgtacgtttcagcaccttcgccaatattctacgcaacaaagaaa
gctaagcaatagcgaaggggcccgaccgatcgccttcccaacaggtgagcagcctgaatggcgaatggcgcttggctggtttcc
ggcaccagaagcgggtgcccgaagctggctggagtgatcttctgagggcgatactgtctgctccctcaaacggcagatgc
acggttacgatgcgccatctacaccaacgtgacctatccattacgggtcaatccgccggttggctccacggagaatccgacgggtgtt
actcgtcacatttaattgtgatgaaagctggctacaggaaggccagacgcgaattattttgatggcgttccattgggttaaaaaatgag
ctgatttaacaaaaatfaatgcgaatttaacaaaatattaacgtttacaatttaaatattgctatacaacttctgttttggggctttctg
attatcaacgggggtacatatgattgacatgctagttttacgattaccgttcagattctctgtttgctcagactcaggaatgaactg
atagcctttgtagatctcicaaaaatagctacccctcggcattatfatcagctagaacgggtgaaatcatattgatgggtgattgactg
tctccggccttctaccctttgaatctttacttacacattactcaggcattgcatttaaaatataatgagggttctaaaaatttttatccttgcgt
tgaataaaggcttctccgcaaaagtattacagggtcataatggtttggfacaaccgatttagctttatgctctgaggccttattgcttaatt
ttgctaattcttggcctgctgtatgattattggacgtt

SEQ ID NO: 7 (secuencia de aminoácidos del marcador c-myc de detección)
EQKLISEEDL

SEQ ID NO: 8 (secuencia de nucleótidos que codifican el marcador c-myc de detección)
gagcaaaagctcattatggaagagatctt

SEQ ID NO: 9 (secuencia del péptido de ensayo de unión al clon 18-24 de IL-6)
RTFCKEFGRYVADETYCAAL

SEQ ID NO: 10 (secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de ensayo de unión al clon 18-24 de IL-6)
aggacttttgaaggagttggcggtatggtgagcagcattgctgctgctt

SEQ ID NO: 11 (secuencia del péptido de ensayo de unión al clon 18-22 de IL-6)
ISLCDQPYVKSLLPLCPLA

SEQ ID NO: 12 (secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de ensayo de unión al clon 18-22 de IL-6)
atftcttgtgtgatcagccgtatgtaagagcttaacttccggtgtgctccgtgct

SEQ ID NO: 13 (secuencia del péptido de ensayo de unión al clon 18-4 de IL-6)
PPLCSWPAYQKFGGPLCTLG

SEQ ID NO: 14 (secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de ensayo de unión al clon 18-4 de IL-6)
cctccgctgttcttggcctgctatcagaagttggtggtccgctgtgacgcttgg

SEQ ID NO: 15 (secuencia de nucleótidos del plásmido de tipo-33 con el gen g.III recombinante y el gen g.III de TS mutado (con las mutaciones que codifiquen L8P + S11P) (incluyendo las secuencias codificantes del péptido de señal)

aatgctactactattagtagaattgatgccacccttcagctcgcgccccaaatgaaaatataagctaaacaggttattgaccatttgcgaaa
tgtatcfaatggfcaaaactaaatctactcgttcgcagaattgggaatcaactgttatatggaaatgaaactccagacaaccgtactttagttgc
atattfaaaacatggttagctacagcattatattcagcaattaagctctaagccatctgcaaaaatgacctctatcaaaaggagcaattaa
aggctactcttaatcctgacctgttggaggttgcctccggtctggttcgcttgaagctcgaatfaaaacgcgataattgaagcttccgggc
ttcctctaatcttttgatgcaatcogcttgcctctgactataatagtcagggtaaagacctgattttgatttaggtcattctcgtttctgaa
ctgtttaaagcatttggggggatcaatgaataattatgacgattccgagtaattggacgctatccagictaaacatttactgttaccocct
ctggcaaaaactctttgcaaaagcctctcgtattttggttttatcgtcgtctggtaaacgaggggtatgatagtggttctctactatgect
cgtaattccttttggcgttatgtaictgcaatfagtgaatgtggtatfctcaaatcfaactgatgaactcttctacctgtaataatgttctccgt
agttcgtttattaacgtagattttctcccaacgctcctgactggataatgagccagttcttaaaatcgcataaggtaattcacaatgattaa
agttgaaattaaaccatctcaagcccaatttactactcgttctgggtttctcgtcagggcgaagcccttactgaatgagcagcttggta
cgttgatttgggtaatgaalatccgggtcttgcgaagatfcttctgatgaaggtcagccagcctatgcgctgggtctgtacaccgttcaict
gtcctcttcaaggttggcagttcggttccctatgattgacctctcgcctcgttccggctaagtaacatggagcaggtcgcggatttc
gacacaatttatcagggcagatgatacaaatctccgttactttgttcgcgcttggataatcgttgggggtaaaagatgagtggtttatgtg
attctttgctcttctgttttaggttgggtcctctgtagtggcattacgtatfctaccggttaattgaaaacttctcatgaaaagctttagtc
ctcaaaagcctctgtagccgttgcctaccctcgttcgatgctgtcttctcgtcgtgagggtgacgatcccgcataaaagcggcctttaaactcc
ctgcaagcctcagcgaccgaatalatcgggtatgcgtggggcaggttgggtctatctggcgcaactatcggatcaagctgtttaag
aaatcaccctcgaagcaagctgataaacgatacaatfaaaggctccttttggagcccttttttggagatttcaacgtgaaaaaattat
attcgcaattccttttagtttctcttctattctcactccgcgaaactgttgaaggttgcggcaaaaaccatacagaaaattcattact
aacgtctggaaagacgacaaaactttagatcgttacgctaactatgagggtcgtctgtggaalctacagggcgtttagtttactgggt
gacgaaactcagtgtagcggfcatgggttctattgggcttgcctatccctgaaaatgaggggtggtgctctgaggggtggcggtctga
gggtggcggtctgaggggtggcggtactaaacctcctgagtacgggtgatacacctattccgggctatactatatacaacctctcgaag
gcactatccgctggfctgagcaaaaccctgtaatcctaactctctctttagggagtctcagcccttaatacttcatgttccagaata
ataggtccgaaataggcagggggcattaactgtttatcgggcaactgttactcaaggeactgaccocgttaaaacttattaccagtaca
ctcctgtatcatcaaaagccatgtatgaccttactggaacggtaaatcagagactgcgcttccattctggctttaatgaggattatittgt
ttgtgaalatcaaggccaatcgtctgacctgcctcaacctcctgcaatgctggcgggcgtctggtgggtggttctggtggcggtctga
gggtggtggtctgaggggtggcggttctgaggggtggcggtctgagggagggcgggtccgggtgggtggtctggtccgggtgattttagt
tatgaaaagatggcaaacgctaataagggggctatgaccgaaaatccgatgaaaacgcgctacagctctgacgctaaggcaactt
gattctgtcgtactigattacgggtcgtctatcgaatggttcttgggtgacgttccggccttgcataatggtaatgggtcactgggtgattt
ctggcttaattcccaaatggctcaagtcgggtgacgggtgataatcacttfaatgaataattccgtcaatattaccctccctccctcaatc
gggtgaatgtcggccctttgtcttggcgtggtaaacctatgaatttctattgattgtgacaaaataaacttattccgtgggtgcttctgctt

tctttatagttgccacctttatgfatglattttctacgfttgtaacatactgcgtaalaaggagtcifaai catgccagttctfttgggtatfcc
 gttattattgctttccctcggttccctctggtaactttgttcggctatctgcttactttcttaaaaagggttcggtaagatagctattgctattt
 cattgtttcttgccttattattgggcttaactcaattcttgggggtatctctctgatattagcgcctcaattaccctctgactttgtcagggtgtt
 cagftaattctcccgctaaatgcgcttccctgtttttatgfatctctctgtaaaaggctgclatttttcatftttgacgttaaacaaaaaatcgtttc
 ttatttggattgggataaataataggetgtttattttgtaacttggcaaaattaggctctggaaagacgctcgttagcgttggttaagatcagg
 ataaaattgtagctgggtgcaaaatagcaactaatcttgalttaaggcttcaaaacctcccgcaagtcgggagggttcgctaaaaacgctc
 gcgttctagaataaccggataagccttctatctgatttgccttattggggcgggtaaatgattcctacgatgaaaataaaaacggcttg
 ctgttctcgtatgagtgccgtacttggfttaataaccgcttcttgaatgataaggaaagacagccgattattgattggtttctacatgctcgt
 aaattaggatgggatatttttcttctggtcaggacttactattgttgataaacaggcgcgcttctgcatlagctgaacatggttattgtcgt
 cgtctggacagaataactttacttttgcgtactttatattcttattactggctcgaaaatgcctctgcctaaattacatgttggcgttgtt
 aaatatggcgatttcaattaagccctactgttgagcgttggctttactggtaagaattgtataacgcatatgatactaaacaggctttt
 ctatgaattatgattccgggtgtttattcttatttaacgccttatttatcacacggctcggattttcaaaccaataaaattaggctcagaagatgaag
 ctactaaaataatattgaaaaagtttccacgcgttctttgtcttggcgttggatttgcacagcatttccatatagttatataaccaacctaag
 ccggaggltaaaaaggtagtctctcagacctatgatitfgalaaaticacttattgacttctcagcgtctiaatctaaagctatgcctatgttt
 caaggattctaaaggaaaaitaaitaagcgcagatfacagaagcaaggatttactcacaatattgattatgactgtttccattaaa
 aaaggtaaitcaaatgaaattgttaaatgtaaitaaitttgtttcttgatgtttgttccatcttctttgtcaggttaattgaaatgaaatc
 gcctctgcgcgattttgtaacttggattcaaaagcaatcagggcaatccgttattgtttcctccgatgaaaaggactgttactgtatattca
 tctgacgttaaacctgaaaatctacgcaatttcttatttctgtttactgtgcaaatgattttgataggttaggttctaaccttccattattcaga
 agtataatccaaacaatcaggattatattgatgaattgccatcatctgataatcaggaatatgatgataatccgctcctctggtgggttcttt
 gttccgcaaaatgataatgttactcaaacitttaaaitaataacgttcgggcaaaaggatttaatacaggttctcgaattgttgaaggctca
 atacttctaaatcccaaatgtaattatctattgacggctctaatctattagtgttagtctcctaaagatattttagataaccttcccaattctt
 tcaactgttatttccaactgaccagatattgattgagggttggatitgagggtcagcaagggtgatgcttiagattttcatttctgctgg
 ctctcagcgttggcaactgttgcaggcgggtgtaatactgaccgcctcactctgtttatcttctgctggtggttcgttgggtattttaatggc
 gatgttttagggctatcagttcgcgcaitaaagactaatagccattcaaaaataattgtctgtgccacgtattcttaccgtttcagggtcagaag
 ggttctatctctgttggccagaatgtcccttttattactggtcgttgcactggtgaaatctgccaatgtaataatccatttcagacgattgagc
 gtcaaaatgtaggattttccatgagcgttttctgttgaatggctggcggtaaatattgtctggatattaccagcaaggccgatagtttga
 gttcttactcaggcaagtgtattactaatcaagaagtatttctacaacgggttaatttgcgtgatggacagactcttttactcgggtg
 gcctcactgattataaaaacacttctcaggattctggcgtaccgttccctgtctaaaatcccttfaatcggcctccgtttagctcccgtctg
 attctaacgaggaaaagcagttatcgtgctcgtcaaaagcaaccatagtaacgcgcctgtagcggcgcattaaagcggcggcgggtgtg
 gtggttacgcgcagcgtaccgctacacttgcagcgccttagcgcctccttctccttcccttcccttccctcgcacgttccgcg
 gcttccccgtcaagctcaaaatcgggggtcctcttttaggggtccgatttagtctttaccggcaacctgacccccaaaaaacttgattggg
 tgatgggtcactgtagtgggcatcgcctgatagacggttttccgctttagcgttggagtcacgttcttaatagtggactcttgttcca
 aactggaaacaactcaacctatctcgggtattctttgattataagggttttgcgatttcgggaaccacatcacacaggattttc
 cctgctggggcaaacaccagcgtggaccgttctgcaactctcaggggcaggcgggtgaagggaatcagctgttcccgtctcgt
 ggtgaaaagaaaaaccacctggcgcaccaatcgcaaaaccgctctccccgcgcttggccgattcattaatgcagctggcagcagc
 aggttcccgaactggaaaagcgggcagtgagcgcacgcaaitaaitgtgagttagctcactcattaggcaccaccaggcttgacactttat
 gcttccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacgccaaggagacagtcataatgaaatacctattgacctag
 gcagccgctggattgttattactcgtgcccacaccagccatggccggcggaggatctggcagcaaaaagctcattagtgaaaggat
 ctggccgagacagttggagagctgcctggccaagctgcacacegagaacagcttccaatgtttggaaggatgataagaccttggga
 ccgctatgccaattacgaagggtgcttattggaacgcaaccgggtgtggttgtgtgcacaggcgtgagaccacaatgctatggcacctgg
 gtgccgatcggctcggcaattccggagaacgaaggcggaggtagcgaaggagggtggaagtgaaggcggaggatcgggaaggggg
 tggcacaaggccaccagaatagggagacaccgattccagggttaacctacatfaatccgetggatggatgataacctccaggcacc
 gaacagaatccggcaaacccgaaccggcctgggaagaaagccaaccgctgaacacattatgttccaaaacaaccgtttctgtaac
 cgtcaaggagccctgaccgtatcacccggctacagtgaccagggtacagalccgggtgaagacctactatcaatatacaccgggttagc

agcaaggcaatgtacgatgcatattggaatggcaagtttcgtgattgtgcaittcatagcggtttcaacgaagacctgtttgtgtcgaat
accagggtcagagcagcgatttaccgcagccaccggtaacgcaggtgggtggaagcggagggggaagtggcgggtgggtcagaag
gaggaggatcggaaaggaggtgggagtgaaaggagggggaagcgaaggagggggatcaggagggtgtagcggaaagtggcgactt
cgactacgagaagatggccaatgcaaacaaaggcgcaatgacagagaacgcagacgagaatgcaactgcaaaagtgatgcaaaagg
taagctggacagcgttggcaaccgactatggagcagcaattgacggcfttatcggagatgtcagcggctgtgcaaacggcaacggag
caacaggcgacttcgcaggtagcaacagccagatggcacaggttgagatggcgacaacagtcgcctgatgaacaactttgccag
tacctgccgagctgccacaaagegtcgagtgccgttcgtttgtttcgggtgcaggcaagecgtacgagttcagcatcgactgcgataa
gattaatcttttcgggagtttcgcaatcctgtctgtacgtggcaacggtcatgtacgtttcagcaccttcgccaatacttacgcaacaaa
gaaagctaagcaatagegaaggcccgcaccgatcgccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgctttgccctgg
tttcggcaccagaagcgggtgccggaaagctggctggagtggcgtatctcctgaggccgatactgtcgtgtccctcaaaactggcag
atgcacggftacgatgccccatctacaccaacgtgacatcccaatcgggtcaatccgctttgttccacggagaatccgacggg
ttgttactcgtcacatttaattgtgatgaaagctggctacaggaaggccagacgcgaattattttgatggcgttccctattgttataaaat
gagctgatttaacaaaaaftaatgcaatttaacaaaatataacgtttacaatttaaatatttgcctatacaatcttctgttttggggcttt
ctgattatcaaccggggtacataatgattgacatgctagtttacgattaccgttcacgtatctctgtttgtctccagactctcaggcaatgac
ctgatagcctttgtagatctctcaaaaatagctaccctctccggcattaattatcagctagaacgggtgaatacatattgatgggattga
ctgtctccggcctttctcaccctttgaatctttacctacacattactcaggcattgcafttaaaatataatgaggggtctaaaaattttatcctg
cgttgaaataaaggcttctcccgcaaaagtattacaggggtcataatgttttgggtacaaccgatttagctttatgctctgaggctttatgctt
aattttgctaattctttgectfgectgtatgatttattggacgtt

SEQ ID NO: 16 (secuencia de nucleótidos que codifica el engarce peptídico del clon 18-24, 18-22, 18-4)
ggcggaggatctggc

SEQ ID NO: 17 (secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de señal endógeno de la P.III del bacteriófago M13)
gtgaaaaaattattatcgcaattccttagttgtcctttctattctactcc

SEQ ID NO: 18 (aminoácidos del péptido de señal endógeno de la P.III del bacteriófago M13)
VKLLFAIPLWPFYSHS

SEQ ID NO: 19 (secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de señal peIB)
atgaaatacctatgctctacgcagccgctgattgtattactcgtgccaaccagccatggcc

SEQ ID NO: 20 (péptido de señal peIB)
MKYLLPTAAAGLLLLAAQP AMA

SEQ ID NO: 21 (secuencia de aminoácidos del producto del gen g.III de TS maduro que comprende la sustitución L8P) (sin péptido de señal))

AETVESCPAKSHTEÑFTNÑWKDDKTLDRYANYEGCLWNATGVVVCTGDETQCYG
TWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGKTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYP
TEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQALTVYTGTVTQGTDPVKTYQYT
PVSSKAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDLFVCEYQGSDDLPPVNAAGGGSGGG
SGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGGDFDYEKMANANKGAMTENADEN
ALQSDAKGKLDVATDYGA AIDGFIGDVSGLANGNGATGDFAGSNSQMAQVGDGD

NSPLMNNFRQYLPSPQSVECRPFVFGAGKPYEFSIDCDKINLFRGVFAFLLYVATFM
YVFSTFANILRNKES

SEQ ID NO: 22 (secuencia de aminoácidos del producto del gen g.III de TS maduro que comprende la sustitución S11P) (sin péptido de señal))

AETVESCLAKPHTENSFTNVKDDKTLDRYANYEGCLWNAATGVVVCTGDETQCY
 GTWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGKTPPEYGD/PIPGYTYINPLDGTYP
 GTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQALTVYTGTVTQGTDPVKTYYYQY
 TPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDLFVCEYQGGSSDLPQPPVNAGGGGSGG
 GSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGDFDYKMANANKGAMTENADE
 NALQSDAKGKLDVATDYGAAIDGFIGDVSGLANGNGATGDFAGSNSQMAQVGDG
 DNSPLMNNFRQYLPQLPQSVFCRPFVFGAGKPYEFSIDCDKINLFRGVFAFLLYVATF
 MYVFSTFANILRNKES

SEQ ID NO: 23 (secuencia de nucleótidos que codifica el producto del gen g.III de TS maduro que comprende la sustitución L8P) (sin péptido de señal))

gccgaaactgttgaaagtgtccggcaaaatccatacagaaaatcatttactaacgtctggaaagacgacaaaactttagatcggtac
 gctaactatgagggctgtctgtggaatgctacagggctgtgagttgtactggtagcagaaactcagtggtacggtaacatgggttctattg
 ggcttctatccctgaaaatgaggggtggtggctctgaggggtggcgggttctgaggggtggcgggtactaaacctcc
 tgagtacgggtgatacacctattccgggtatactatatacaacctctcgcagcggcacttatccgcctgggtactgagcaaaaccccgctaa
 tccaatccttctcttgaggagctcagcctcttaatactttcatgtttcagaataataggttccgaaataggcagggggcattaactgtttat
 accggcactgttactcaaggcactgaccccgtaaaacttattaccagtaacactcctgtatcatcaaaaagccaigtatgacgcttactgga
 acggtaaatcagagactgcgctttccattctggccttaatgaggaittattgtttgtgaatacaaggccaatcgtctgacctgacctcaac
 ctctgtcaatgctggcggcggctctggtggtggttctggtggcggctctgaggggtggtggctctgaggggtggcgggttctgaggggtgg
 cggctctgagggagggcgggtccgggtggtggctctggttccgggtgattttgattatgaaaagatggcaaacgctaataagggggctatg
 accgaaaatgccgatgaaaacgcgctacagctgacgctaaaggcaacttgattctgtcgtactgattacgggtgctgctatcgatgg
 ttctattggtgacgtttccggccttgctaattggtaatggtgctactggtgattttgctggctctaattcccaaatggctcaagtcgggtgacgg
 tgataatcaccitaaatgaataatccgctcaatattaccttccctccctcaatcgggtgaatgtgcccttttctttggcctggtgaaacc
 atatgaattttctattgattgtgacaaaataaactattccgtgggtgcttttgcggttctttatattgttggccacctttatgtatgtattttctacgttt
 gctaacatactgcgtaataaggagtct

SEQ ID NO: 24 (secuencia de nucleótidos que codifica el producto del gen g.III de TS maduro que comprende la sustitución S11P) (sin péptido de señal))

gccgaaactgttgaaagtgttttagcaaaacccatacagaaaatcatttactaacgtctggaaagacgacaaaactttagatcggtacg
 ctaactatgagggctgtctgtggaatgctacagggctgtgagttgtactggtagcagaaactcagtggtacggtaacatgggttctattgg
 gcttctatccctgaaaatgaggggtggtggctctgaggggtggcgggttctgaggggtggcgggtactaaacctcc
 gagtacgggtgatacacctattccgggtatactatatacaacctctcgcagcggcacttatccgcctgggtactgagcaaaaccccgctaat
 ctaatccttctcttgaggagctcagcctcttaatactttcatgtttcagaataataggttccgaaataggcagggggcattaactgtttata
 cgggcaactgttactcaaggcactgaccccgtaaaacttattaccagtaacactcctgtatcatcaaaaagccaigtatgacgcttactgga
 cggtaaatcagagactgcgctttccattctggccttaatgaggaittattgtttgtgaatacaaggccaatcgtctgacctgacctcaacct
 cctgtcaatgctggcggcggctctggtggtggttctggtggcggctctgaggggtggtggctctgaggggtggcgggttctgaggggtggc

ggctctgagggagggcgggtccgggtggtggctcgggtccgggtgattttgattatgaaaagatggcaaacgctaataagggggctatga
 ccgaaaatgccgatgaaaacgcgctacagctgacgctaaaggcaacttgattctgtcgtactgattacgggtgctgctatcgatggtt
 tcattggtgacgtttccggccttgctaattggtaatggtgctactggtgattttgctggctctaattcccaaatggctcaagtcgggtgacgggt
 gataatcaccitaaatgaataatccgctcaatattaccttccctccctcaatcgggtgaatgtgcccttttctttggcctggtgaaacc
 atatgaattttctattgattgtgacaaaataaactattccgtgggtgcttttgcggttctttatattgttggccacctttatgtatgtattttctacgttt
 gctaacatactgcgtaataaggagtct

SEQ ID NO: 25 (Secuencia de aminoácidos de Fab_HC)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNS
GHIDYADSVTEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSC

SEQ ID NO: 26 (Secuencia de aminoácidos de Fab_{LC})

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSG
VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSST
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 27 (secuencia de nucleótidos que codifica el Fab_{HC})

gaggtgcagctggtggagctctgggggaggcttgggtacagcctgggaggctcctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttg
atgactatgccatgcactgggtccgccaggctccaggggaaggggctggagtggtgtcagctattacttggaaatagtggtcacataga
ctacgcagactccgtggaggccgggtcaccatctccagagacaatgccaaactcctgtatctgcaaatgaacagcctgagagc
cgaggacacggccgtatattactgtgcgaaagtgagctacctgagtagctccagcctggactactggggccaaggaacctgggt
caccgtctcctcagcctccaccaaggggccatcgggtcttccccctggcaccctctccaagagcacctctgggggcacagcggccct
gggctgcttggcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaactcagggccctgaccagcggcgtgcacaccttcc
cggctgtctacagctcctcaggactctactcctcagcagcgtgggtgacctgcccctccagcagcttgggcaccagactacatctg
caacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagaaagcagagcccacaatcttgc

SEQ ID NO: 28 (secuencia de nucleótidos que codifica el Fab_{LC})

gacatccagatgaccagctcctcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttggcgggcgagtcagggcattc
gcaattatitagcctgggtatcageagaaaccagggaaagctcctaagctcctgatctatgctgcatcacttggcaatcaggggtccat
ctcgggtcagtgagcagtgatctgggacagattcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatgttgcaacttattactgtcaac
gtataaccgtgccccttacagcttggccaagggaaccaaggtggaaatcaaacgaaactgtgctgcaccatctgtctctccttccg
ccatctgatgagcagtgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataacttctatccagagaggccaaagtacagtggaag
gtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagca
ccctgacgtgagcaagcagactacgagaaacacaaagctctacgcctgcgaaagtcaccatcagggcctgagctcggcctcaca
aagagcttcaacaggggagagtgctc

SEQ ID NO: 29 (péptido de señal Pho A) VKQSTIALALLPLLFTPVAKA

SEQ ID NO: 30 (secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de señal Pho A)

gtgaaacaaagcactattgcactggcactcttaccgttactgtttaccctgtcgcaaaagcc

SEQ ID NO: 31 (péptido marcador HA)

YPYDVPDYAS

SEQ ID NO: 32 (secuencia de nucleótidos que codifica el péptido marcador HA)

taccgtacgacgttccggattatgccagc

SEQ ID NO: 33 (secuencia de aminoácidos del engarce peptídico de los clones 18-24, 18-22, y 18-4)

GGGS

SEQ ID NO: 34 (engarce peptídico)

AEAAAKEAAAKEAAKA

SEQ ID NO: 35 (engarce peptídico)

AEAAAKEAAAKEAAKAGGGGS

SEQ ID NO: 36 (engarce peptídico)

AEAAAKEAAAKEAAKAGPPGP

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Eli Lilly and Company
Afshar, Sepideh
- <120> Vectores fagos de presentación y procedimientos de uso
- 5 <130> X20314
- <150> 62/259801
- <151> 25-11-2015
- <160> 36
- <170> Patentín versión 3.5
- 10 <210> 1
- <211> 406
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> Construcción sintética
- <400> 1

```

Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Ser His Thr Glu Asn Ser
 1                               5                               10                               15

Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu Asp Arg Tyr Ala Asn
                               20                               25                               30

Tyr Glu Gly Cys Leu Trp Asn Ala Thr Gly Val Val Val Cys Thr Gly
                               35                               40                               45

Asp Glu Thr Gln Cys Tyr Gly Thr Trp Val Pro Ile Gly Leu Ala Ile
 50                               55                               60

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

Gly Ser Glu Gly Gly Gly Thr Lys Pro Pro Glu Tyr Gly Asp Thr Pro
                               85                               90                               95

Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr Ile Asn Pro Leu Asp Gly Thr Tyr Pro Pro
                               100                              105                              110

Gly Thr Glu Gln Asn Pro Ala Asn Pro Asn Pro Ser Leu Glu Glu Ser
                               115                              120                              125

Gln Pro Leu Asn Thr Phe Met Phe Gln Asn Asn Arg Phe Arg Asn Arg
 130                               135                               140

Gln Gly Ala Leu Thr Val Tyr Thr Gly Thr Val Thr Gln Gly Thr Asp

```


ES 2 751 378 T3

<210> 2
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 2

Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Pro Ala Lys Pro His Thr Glu Asn Ser
 1 5 10 15

Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu Asp Arg Tyr Ala Asn
 20 25 30

Tyr Glu Gly Cys Leu Trp Asn Ala Thr Gly Val Val Val Cys Thr Gly
 35 40 45

Asp Glu Thr Gln Cys Tyr Gly Thr Trp Val Pro Ile Gly Leu Ala Ile
 50 55 60

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

Gly Ser Glu Gly Gly Gly Thr Lys Pro Pro Glu Tyr Gly Asp Thr Pro
 85 90 95

Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr Ile Asn Pro Leu Asp Gly Thr Tyr Pro Pro
 100 105 110

Gly Thr Glu Gln Asn Pro Ala Asn Pro Asn Pro Ser Leu Glu Glu Ser
 115 120 125

Gln Pro Leu Asn Thr Phe Met Phe Gln Asn Asn Arg Phe Arg Asn Arg
 130 135 140

Gln Gly Ala Leu Thr Val Tyr Thr Gly Thr Val Thr Gln Gly Thr Asp
 145 150 155 160

Pro Val Lys Thr Tyr Tyr Gln Tyr Thr Pro Val Ser Ser Lys Ala Met
 165 170 175

Tyr Asp Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Phe Arg Asp Cys Ala Phe His Ser
 180 185 190

Gly Phe Asn Glu Asp Leu Phe Val Cys Glu Tyr Gln Gly Gln Ser Ser

ES 2 751 378 T3

195		200		205											
Asp 210	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Val 215	Asn	Ala	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
Ser 225	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu 230	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu 235	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu 240
Gly	Gly	Gly	Ser	Glu 245	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly 250	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly 255
Asp	Phe	Asp	Tyr 260	Glu	Lys	Met	Ala	Asn 265	Ala	Asn	Lys	Gly	Ala	Met	Thr 270
Glu	Asn	Ala	Asp	Glu	Asn	Ala	Leu 280	Gln	Ser	Asp	Ala	Lys	Gly	Lys	Leu 285
Asp 290	Ser	Val	Ala	Thr	Asp	Tyr 295	Gly	Ala	Ala	Ile	Asp 300	Gly	Phe	Ile	Gly
Asp 305	Val	Ser	Gly	Leu	Ala	Asn 310	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Gly	Asp	Phe	Ala 320
Gly	Ser	Asn	Ser	Gln 325	Met	Ala	Gln	Val	Gly 330	Asp	Gly	Asp	Asn	Ser	Pro 335
Leu	Met	Asn	Asn 340	Phe	Arg	Gln	Tyr	Leu 345	Pro	Ser	Leu	Pro	Gln	Ser	Val 350
Glu	Cys	Arg 355	Pro	Phe	Val	Phe	Gly 360	Ala	Gly	Lys	Pro	Tyr 365	Glu	Phe	Ser
Ile 370	Asp	Cys	Asp	Lys	Ile	Asn 375	Leu	Phe	Arg	Gly	Val 380	Phe	Ala	Phe	Leu
Leu 385	Tyr	Val	Ala	Thr	Phe 390	Met	Tyr	Val	Phe	Ser 395	Thr	Phe	Ala	Asn	Ile 400
Leu	Arg	Asn	Lys	Glu	Ser										

<210> 3
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

ES 2 751 378 T3

<400> 3

gccgagacag tggagagctg cctggccaag togcacaccg agaacagctt caccaatgtt	60
tggaaggatg ataagaccct ggaccgctat gccaattacg aaggttgctt atggaacgca	120
accggtgtgg ttgtgtgcac aggcgatgag acccaatgct atggcacctg ggtgccgatc	180
ggtctggcaa ttccggagaa cgaaggcgga ggtagcgaag gaggtggaag tgaaggcgga	240
ggatcggaag ggggtggcac aaagccacca gaatatggag acaccccgat tccaggttac	300
acctacatta atccgctgga tggtagacatac cctccaggca ccgaacagaa tccggcaaac	360
ccgaaccgga gcctggaaga aagccaaccg ctgaacacat ttatgttcca aaacaaccgt	420
tttcgtaacc gtcaaggagc cctgaccgta tacaccggta cagtgaccca ggttacagat	480
ccggtgaaga cctactatca atatacaccg gttagcagca aggcaatgta cgatgcatat	540
tggaatggca agtttcgtga ttgtgcattt catagcggtt tcaacgaaga cctgtttgtg	600
tgcaataacc agggtcagag cagcgattta ccgcagccac cggttaacgc aggtggtgga	660
agcggagggg gaagtggcgg tgggtcagaa ggcggaggat cgggaaggagg tgggagtgaa	720
ggagggggaa gcgaaggagg gggatcagga ggtggtagcg gaagtggcga cttcgactac	780
gagaagatgg ccaatgcaaa caaaggcgca atgacagaga acgcagacga gaatgcaactg	840
caaagtgatg caaagggtaa gctggacagc gttgcaaccg actatggagc agcaattgac	900
ggctttatcg gagatgtcag cggctctggcg aacggcaacg gagcaacagg cgacttcgca	960
ggtagcaaca gccagatggc acaggttggga gatggcgaca acagtccgct gatgaacaac	1020
tttcgccagt acctgccgag tctgccacaa agcgtcgagt gccgtccgtt tgttttcggt	1080
gcaggcaagc cgtacgagtt cagcatcgac tgcgataaga ttaatctttt tcgcggagtt	1140
ttcgcattcc tgctgtacgt ggcaacgttc atgtacgttt tcagcacctt cgccaatatc	1200
ttacgcaaca aagaaagc	1218

<210> 4

<211> 1218

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 4

5

ES 2 751 378 T3

gccgaaactg ttgaaagttg tccggcaaaa ccccatcacag aaaattcatt tactaacgtc 60
 tggaaagacg acaaaacttt agatcgttac gctaactatg agggctgtct gtggaatgct 120
 acaggcgttg tagtttgtac tgggtgacgaa actcagtgtt acggtacatg ggttcctatt 180
 gggcttgcta tccctgaaaa tgagggtggt ggctctgagg gtggcggttc tgagggtggc 240
 ggttctgagg gtggcggtac taaacctcct gagtacggtg atacacctat tccgggctat 300

 acttatatca accctctcga cggcacttat cgcctggta ctgagcaaaa ccccgctaat 360
 cctaactcctt ctcttgagga gtctcagcct cttaatactt tcatgtttca gaataatagg 420
 ttccgaaata ggcagggggc attaactggt tatacgggca ctgttactca aggactgac 480
 cccgttaaaa cttattacca gtacactcct gtatcatcaa aagccatgta tgacgcttac 540
 tggaacggta aattcagaga ctgcgctttc cattctggct ttaatgagga tttatttgtt 600
 tgtgaatatac aaggccaatc gtctgacctg cctcaacctc ctgtcaatgc tggcgggcggc 660
 tctggtggtg gttctggtgg cggctctgag ggtggtggct ctgagggtgg cggttctgag 720
 ggtggcggct ctgagggagg cggttccggt ggtggctctg gttccggtga ttttgattat 780
 gaaaagatgg caaacgctaa taagggggct atgaccgaaa atgccgatga aaacgcgcta 840
 cagtctgacg ctaaaggcaa acttgattct gtcgctactg attacggtgc tgctatcgat 900
 ggtttcattg gtgacgtttc cggccttgct aatggtaatg gtgctactgg tgattttgct 960
 ggctctaatt cccaaatggc tcaagtcggt gacggtgata attcaccttt aatgaataat 1020
 ttccgtcaat atttaccttc cctccctcaa tccggtgaat gtcgcccttt tgtctttggc 1080
 gctggtaaac catatgaatt ttctattgat tgtgacaaaa taaacttatt ccgtggtgtc 1140
 tttgcgtttc ttttatatgt tgccaccttt atgtatgtat tttctacgtt tgctaacata 1200
 ctgcgtaata aggagtct 1218

<210> 5
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 5

ES 2 751 378 T3

gccgaaactg ttgaaagttg tttagcaaaa tcccatcacag aaaattcatt tactaacgtc 60
 tggaaagacg acaaaacttt agatcgttac gctaactatg agggctgtct gtggaatgct 120
 acaggcgttg tagtttgtagc tggtgacgaa actcagtggt acggtacatg ggttcctatt 180
 gggcttgcta tccctgaaaa tgagggtggt ggctctgagg gtggcggttc tgagggtggc 240
 ggttctgagg gtggcggtac taaacctcct gagtacgggtg atacacctat tccgggctat 300
 acttatatca accctctcga cggcacttat ccgctggta ctgagcaaaa ccccgctaata 360
 cctaatacctt ctcttgagga gtctcagcct ctttaactt tcatgtttca gaataatagg 420
 ttccgaaata ggcagggggc attaactggt tatacgggca ctggtactca aggcactgac 480
 cccgttaaaa cttattacca gtacactcct gtatcatcaa aagccatgta tgacgcttac 540
 tggaaacggtg aattcagaga ctgcgctttc cattctggct ttaatgagga tttatgtgtt 600
 tgtgaatata aaggccaata gtctgacctg cctcaacctc ctgtcaatgc tggcgcgggc 660
 tctggtggtg gttctggtgg cggctctgag ggtggtggct ctgagggtgg cggttctgag 720
 ggtggcggtc ctgaggggagg cggttccggt ggtggctctg gttccggtga ttttgattat 780
 gaaaagatgg caaacgctaa taagggggct atgaccgaaa atgccgatga aaacgcgcta 840
 cagtctgacg ctaaaggcaa acttgattct gtcgctactg attacggtgc tgctatcgat 900
 ggtttcattg gtgacgtttc cggccttgct aatggtaatg gtgctactgg tgatgttctg 960
 ggctctaatt cccaaatggc tcaagtcggt gacggtgata attcaccttt aatgaataat 1020
 ttccgtcaat atttaccttc cctccctcaa tcggttgaat gtcgcccttt tgtctttggc 1080
 gctggtaaac catatgaatt ttctattgat tgtgacaaaa taaacttatt ccgtggtgtc 1140
 tttgcgtttc ttttatatgt tgccaccttt atgtatgtat tttctacggt tgctaacata 1200
 ctgcgtaata aggagtct 1218

<210> 6
 <211> 8422
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 6

ES 2 751 378 T3

aatgctacta ctattagtag aattgatgcc accttttcag ctcgcgcccc aaatgaaaat	60
atagctaaac aggttattga ccatttgcca aatgtatcta atggtcaaac taaatctact	120
cgttcgcaga attgggaatc aactgttata tggaatgaaa cttccagaca ccgtacttta	180
gttgcatatt taaaacatgt tgagctacag catttatctc agcaattaag ctctaagcca	240
tctgcaaaaa tgacctctta tcaaaaggag caattaaagg tactctctaa tcoctgacctg	300
ttggagtttg cttccggtct ggttcgcttt gaagctcgaa ttaaaacgcg atatattgaag	360
tctttcgggc ttcctcttaa tctttttgat gcaatccgct ttgcttctga ctataatagt	420
cagggtaaag acctgatttt tgatttatgg tcattctcgt tttctgaact gtttaaagca	480
tttgaggggg attcaatgaa tatttatgac gattccgcag tattggacgc tatccagtct	540
aaacatttta ctgttaccce ctctggcaaa acttcttttg caaaagcctc tcgctatfff	600
ggtttttatc gtcgtctggt aaacgagggt tatgatagtg ttgctcttac tatgcctcgt	660
aattcctfff ggcgttatgt atctgcatta gttgaatgtg gtattcctaa atctcaactg	720
atgaatctff ctacctgtaa taatgttggt ccggttagttc gttttattaa cgtagatfff	780
tcttcccaac gtcctgactg gtataatgag ccagttctta aaatcgcata aggtaattca	840
caatgattaa agttgaaatt aaaccatctc aagcccaatt tactactcgt tctgggtgfff	900
ctcgtcaggg caagccttat tcaactgaatg agcagctfff ttacgttgat ttgggtaatg	960

ES 2 751 378 T3

aatatccggg tcttgtcaag attactcttg atgaagggtca gccagcctat ggcgctgggc 1020
tgtacaccgt tcatctgtcc tctttcaaag ttgggtcagtt cggttccctt atgattgacc 1080
gtctgcgccct cgttccggct aagtaacatg gagcagggtcg cggatttcga cacaatttat 1140
caggcgatga tacaaatctc cgttgtactt tgtttcgcgc ttggtataat cgctgggggt 1200
caaagatgag tgttttagtg tattcttttg cctctttcgt tttaggttg tgccttcgta 1260
gtggcattac gtattttacc cgtttaatgg aaacttcctc atgaaaaagt ctttagtcct 1320
caaagcctct gtagccgttg ctaccctcgt tccgatgctg tctttcgcgt ctgagggtga 1380
cgatcccgca aaagcggcct ttaactccct gcaagcctca gcgaccgaat atatcggtta 1440
tgcgtggggcg atggttggtg tcattgtcgg cgcaactatc ggtatcaagc tgtttaagaa 1500
attcacctcg aaagcaagct gataaacgca tacaattaa ggctcctttt ggagcctttt 1560
ttttggagat tttcaacgtg aaaaaattat tattcgcgat tccttttagt gttcctttct 1620
attctcactc cgccgaaact gttgaaagt gtttagcaaa atcccataca gaaaattcat 1680
ttactaacgt ctggaaagac gacaaaactt tagatcgta cgtaactat gagggctgtc 1740
tgtggaatgc tacaggcgtt gtagtttgta ctgggtgacga aactcagtgt tacggtagat 1800
gggttctat tgggcttgct atccctgaaa atgagggtgg tggctctgag ggtggcgggt 1860
ctgagggtgg cggttctgag ggtggcggta ctaaaccctc tgagtacggt gatacaccta 1920
ttccgggcta tacttatatc aaccctctcg acggcactta tccgcctggt actgagcaaa 1980
accccgctaa tcctaactct tctcttgagg agtctcagcc tcttaatact tcatgtttc 2040
agaataatag gttccgaaat aggcaggggg cattaactgt ttatacgggc actgttactc 2100
aaggcactga ccccggtaaa acttattacc agtacactcc tgtatcatca aaagccatgt 2160
atgacgctta ctggaacggt aaattcagag actgcgcttt ccattctggc tttaatgagg 2220
atattttgt ttgtgaatat caaggccaat cgtctgacct gcctcaacct cctgtcaatg 2280
ctggcggcgg ctctgggtgt ggtctcgtg gcggctctga ggggtgtggc tctgagggtg 2340
gcggttctga ggggtggcggc tctgagggag gcggttccgg tgggtggctct ggttccgggtg 2400
atthtgatta tgaaaagatg gcaaacgcta ataagggggc tatgaccgaa aatgccgatg 2460
aaaacgcgct acagtctgac gctaaaggca aacttgattc tctcgtact gattacgggtg 2520
ctgctatcga tggtttcatt ggtgacgttt ccggccttgc taatggtaat ggtgctactg 2580
gtgattttgc tggctctaata tcccaaattg ctcaagtcgg tgacggtgat aattcacctt 2640
taatgaataa tttccgtcaa tatttacctt ccctccctca atcggttgaa tctcgcctt 2700
ttgtctttgg cgctggtaaa ccatatgaat tttctattga ttgtgacaaa ataaacttat 2760
tccgtggtgt ctttgcgttt cttttatatg ttgccacctt tatgtatgta ttttctacgt 2820
ttgctaacat actgcgtaat aaggagtctt aatcatgcca gttcttttgg gtattccggt 2880

ES 2 751 378 T3

attattgcgt	ttcctcgggt	tccttctggt	aactttgttc	ggctatctgc	ttacttttct	2940
taaaaagggc	ttcggtaaga	tagctattgc	tatttcattg	tttcttgctc	ttattattgg	3000
gcttaactca	attccttggt	gttatctctc	tgatattagc	gctcaattac	cctctgactt	3060
tggtcagggt	gttcagttaa	ttctcccgtc	taatgcgctt	ccctgttttt	atgttattct	3120
ctctgtaaag	gctgctattt	tcatttttga	cgtaaaca	aaaatcgttt	cttatttgga	3180
ttgggataaa	taatatggct	gtttattttg	taactggcaa	attaggctct	ggaaagacgc	3240
tcgttagcgt	tggtaaagatt	caggataaaa	ttgtagctgg	gtgcaaaata	gcaactaatc	3300
ttgatttaag	gcttcaaaac	ctcccgcaag	tcgggaggtt	cgctaaaacg	cctcgcgttc	3360
ttagaatacc	ggataagcct	tctatatctg	atgtgcttgc	tattgggcgc	ggtaatgatt	3420
cctacgatga	aaataaaaac	ggcttgcttg	ttctcgatga	gtgcgggtact	tggtttaata	3480
cccgttcttg	gaatgataag	gaaagacagc	cgattattga	ttggtttcta	catgctcgta	3540
aattaggatg	ggatattatt	tttcttgctc	aggacttata	tattggtgat	aaacaggcgc	3600
gttctgcatt	agctgaacat	gttgtttatt	gtcgtcgtct	ggacagaatt	actttacctt	3660
ttgtcggtag	tttatattct	cttattactg	gctcgaaaat	gcctctgcct	aaattacatg	3720
ttggcgttgt	taaataatggc	gattctcaat	taagccctac	tggtgagcgt	tggttttata	3780
ctggtaaaga	tttgataaac	gcatatgata	ctaaacaggc	tttttctagt	aattatgatt	3840
ccggtgttta	ttcttattta	acgccttatt	tatcacacgg	tcggatattc	aaaccattaa	3900
atthaggtca	gaagatgaag	cttactaaaa	tatatttgaa	aaagttttca	cgcgttcttt	3960
gtcttgcat	tggtattgca	tcagcattta	catatagtta	tataacccaa	cctaagccgg	4020
aggttaaaa	ggtagtctct	cagacctatg	attttgataa	attcactatt	gactcttctc	4080
agcgtcttaa	tctaagctat	cgctatgttt	tcaaggattc	taagggaaaa	ttaattaata	4140
gcgacgattt	acagaagcaa	ggttattcac	tcacatatat	tgatttatgt	actggttcca	4200
ttaaaaaag	taattcaaat	gaaattgtta	aatgtaatta	attttgtttt	cttgatgttt	4260
gtttcatcat	cttcttttgc	tcaggtaatt	gaaatgaata	attcgcctct	gcgcgatttt	4320
gtaacttgg	attcaaagca	atcaggcgaa	tccgttattg	tttctccoga	tgtaaaagg	4380
actgttactg	tatattcatc	tgacgttaaa	cctgaaaatc	tacgcaattt	ctttatttct	4440
gttttacgtg	caaataatgt	tgatattgga	ggttctaacc	cttccattat	tcagaagtat	4500
aatccaaaca	atcaggatta	tattgatgaa	ttgccatcat	ctgataatca	ggaatatgat	4560
gataattccg	ctccttctgg	tggtttcttt	gttccgcaaa	atgataatgt	tactcaaact	4620
tttaaaatta	ataacgttcg	ggcaaaggat	ttaatacgag	ttgtcgaatt	gtttgtaaag	4680
tctaatactt	ctaaatcctc	aaatgtatta	tctattgacg	gctctaactc	attagttggt	4740

ES 2 751 378 T3

agtgctccta aagatatttt agataacctt cctcaattcc tttcaactgt tgatttgcca 4800
 actgaccaga tattgattga gggtttgata tttgaggttc agcaaggta tgcttttagat 4860
 ttttcatttg ctgctggctc tcagcgtggc actggttcag gcggtgttaa tactgaccgc 4920
 ctcacctctg ttttatcttc tgctggtggg tcgttcggta tttttaatgg cgatgtttta 4980
 gggctatcag ttcgcgcatt aaagactaat agccattcaa aatattgtc tgtgccacgt 5040
 attcttacgc tttcaggta gaagggttct atctctgttg gccagaatgt cccttttatt 5100
 actggtcgtg tgactggtga atctgccaat gtaaataatc catttcagac gattgagcgt 5160
 caaaatgtag gtatttccat gagcgttttt cctggtgcaa tggctggcgg taatattggt 5220
 ctggatatta ccagcaaggc cgatagtttg agttcttcta ctcaggcaag tgatgttatt 5280
 actaatcaaa gaagtattgc tacaacggtt aatttgctg atggacagac tcttttactc 5340
 ggtggcctca ctgattataa aaacacttct caggattctg gcgtagcgtt cctgtctaaa 5400
 atccctttaa tcggcctcct gtttagctcc cgctctgatt ctaacgagga aagcacgtta 5460
 tacgtgctcg tcaaagcaac catagtacgc gccctgtagc ggcgcatata gcgggcgggg 5520
 tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc cgcctccttt 5580
 cgctttcttc ccttcctttc tcgccacggt cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg 5640
 ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctcgaccca aaaaacttga 5700
 tttgggtgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gcccttgac 5760
 gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttcaa actggaacaa cactcaacc 5820
 tatctggggc tattcttttg atttataagg gattttgccg atttcggaac caccatcaca 5880
 caggattttc gcctgctggg gcaaaccagc gtggaccgct tgctgcaact ctctcagggc 5940
 caggcgtgga agggcaatca gctgttccc gtctcgtgg tgaaaagaaa aaccaccctg 6000
 gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcggtggccg attcattaat gcagctggca 6060
 cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 6120
 cactcattag gcacccagc cttgacactt tatgcttccg gctcgtataa tgtgtggaat 6180
 tgtgagcggg taacaatttc acacgccaag gagacagtca taatgaaata cctattgcct 6240
 acggcagccg ctggattggt attactcgt gcccaaccag ccatggccgg cggaggatct 6300
 ggcgagcaaa agctcattag tgaagaggat cttgccgaga cagtggagag ctgcctggcc 6360
 aagtgcgaca ccgagaacag cttaccaat gtttgaagg atgataagac cctggaccgc 6420
 tatgccaatt acgaaggtg cttatggaac gcaaccggtg tggttgtgtg cacaggcgat 6480
 gagaccaat gctatggcac ctgggtgccg atcggctctg caattccgga gaacgaaggc 6540
 ggaggtagcg aaggagggtg aagtgaaggc ggaggatcgg aaggggtgg cacaagcca 6600
 ccagaatatg gagacacccc gattccaggt tacacctaca ttaatccgct ggatggtaca 6660

ES 2 751 378 T3

taccctccag gcaccgaaca gaatccggca aacccgaacc cgagcctgga agaaagccaa 6720
 ccgctgaaca cattedatggt ccaaaacaac cgttttcgta accgtcaagg agccctgacc 6780
 gtatacaccg gtacagtgac ccagggtaca gatccgggtga agacctacta tcaatataca 6840
 ccggtttagca gcaaggcaat gtacgatgca tattggaatg gcaagtttcg tgattgtgca 6900
 tttcatagcg gtttcaacga agacctgttt gtgtgcgaat accagggtca gagcagcgat 6960
 ttaccgcagc caccggttaa cgcaggtggt ggaagcggag ggggaagtgg cgggtgggtca 7020
 gaaggcggag gatcgggaagg aggtgggagt gaaggagggg gaagcgaagg agggggatca 7080
 ggaggtggta gcggaagtgg cgacttcgac tacgagaaga tggccaatgc aaacaaaggc 7140
 gcaatgacag agaacgcaga cgagaatgca ctgcaaagtg atgcaaaggg taagctggac 7200
 agcgttgcaa ccgactatgg agcagcaatt gacggcttta tcggagatgt cagcggctctg 7260
 gcgaacggca acggagcaac aggcgacttc gcaggtagca acagccagat ggcacaggtt 7320
 ggagatggcg acaacagtcc gctgatgaac aactttcgcc agtacctgcc gagtctgcca 7380
 caaagcgtcg agtgccgtcc gtttgttttc ggtgcaggca agccgtacga gttcagcatc 7440
 gactgcgata agattaatct ttttcgcgga gttttcgcac tcctgctgta cgtggcaacg 7500
 ttcattgtacg ttttcagcac cttcgccaat atcttacgca acaaagaaag ctaagcaata 7560
 gcgaagaggc ccgcaccgat cgccttccc aacagttgag cagcctgaat ggcgaatggc 7620
 gctttgcctg gtttccggca ccagaagcgg tgccggaaag ctggctggag tgcgatcttc 7680
 ctgaggccga tactgtcgtc gtcccctcaa actggcagat gcacggttac gatgcgcccc 7740
 tctacaccaa cgtgacctat cccattacgg tcaatccgcc gtttgttccc acggagaatc 7800
 cgacggggtg ttactcgtc acatttaatg ttgatgaaag ctggctacag gaaggccaga 7860
 cgcaattat ttttgatggc gttcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 7920
 taatgcgaat ttttaaaaa tattaacggt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 7980
 cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt 8040
 acgattaccg ttcattgatt ctcttggtt ctccagactc tcaggcaatg acctgatagc 8100
 ctttgtagat ctctcaaaaa tagctaccct ctccggcatt aatttatcag ctagaacggt 8160
 tgaatatcat attgatggtg atttgactgt ctccggcctt tctcaccctt ttgaatcttt 8220
 acctacacat tactcaggca ttgcatttaa aatatatgag ggttctaaaa atttttatcc 8280
 ttgcggtgaa ataaaggctt ctcccgcaa agtattacag ggtcataatg tttttggtac 8340
 aaccgattta gctttatgct ctgaggcttt attgcttaat tttgctaatt ctttgccttg 8400
 cctgtatgat ttattggacg tt 8422

<210> 7

ES 2 751 378 T3

Ile Ser Leu Cys Asp Gln Pro Tyr Val Lys Ser Leu Asn Leu Pro Leu
 1 5 10 15

Cys Pro Leu Ala
 20

5 <210> 12
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 12
 attctttgt gtagcagcc gtagttaag agtcttaac tccggttg tccgctgct 60

10 <210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 13

Pro Pro Leu Cys Ser Trp Pro Ala Tyr Gln Lys Phe Gly Gly Pro Leu
 1 5 10 15

Cys Thr Leu Gly
 20

20 <210> 14
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 14
 25 cctccgctgt gtcttgcc tgctatcag aagttggtg gtcgctgtg tacgcttgg 60

<210> 15
 <211> 8422
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 15

aatgctacta ctattagtag aattgatgcc acctttcag ctgcgcccc aatgaaaat 60

ES 2 751 378 T3

atagctaaac aggttattga ccatttgcga aatgtatcta atggtcaaac taaatctact 120
 cgttcgcaga attggaatc aactggtata tggaatgaaa cttccagaca ccgtacttta 180
 gttgcatatt taaaacatgt tgagctacag cattatattc agcaattaag ctctaagcca 240
 tctgcaaaaa tgacctotta tcaaaaggag caattaaagg tactctctaa tcctgacctg 300
 ttggagtttg cttccggtct ggttcgcttt gaagctcgaa ttaaaacgcg atatttgaag 360
 tctttcgggc ttcctotta tctttttgat gcaatccgct ttgcttctga ctataatagt 420
 cagggtaaag acctgatttt tgatttatgg tcattctcgt tttctgaact gtttaaagca 480
 tttgagggg attcaatgaa tatttatgac gattccgcag tattggacgc tatccagtct 540
 aacatttta ctgttaccoc ctctggcaaa acttcttttg caaaagcctc tcgctatttt 600
 ggtttttatc gtcgtctggt aaacgagggt tatgatagtg ttgctcttac tatgcctcgt 660
 aattcctttt ggcgttatgt atctgcatta gttgaatgtg gtattcctaa atctcaactg 720
 atgaatcttt ctacctgtaa taatggtgtt ccgtagttc gttttattaa cgtagatttt 780
 tcttcccaac gtacctgactg gtataatgag ccagttotta aaatcgcata aggtaattca 840
 caatgattaa agttgaaatt aaaccatctc aagcccaatt tactactcgt tctggtgttt 900
 ctcgtcagg caagccttat tcaactgaat agcagctttg ttacgttgat ttgggtaatg 960
 aatatccggt tcttgtcaag attactcttg atgaaggtca gccagcctat gcgcctggtc 1020
 tgtacaccgt tcatctgtcc tctttcaag ttggtcagtt cggttccctt atgattgacc 1080
 gtctgcgcct cgttccggt aagtaacatg gagcaggtcg cggatttcga cacaatttat 1140
 caggcgatga tacaatctc cgttgtactt tgtttcgcgc ttggtataat cgctgggggt 1200
 caaagatgag tgtttttagtg tattcttttg cctctttcgt tttaggttg tgcttcgta 1260
 gtggcattac gtattttacc cgtttaatgg aaacttcctc atgaaaaagt ctttagtcct 1320
 caaagcctct gtagccgttg ctaccctcgt tccgatgctg tctttcgtg ctgagggatga 1380
 cgatcccgca aaagcggcct ttaactcctc gcaagcctca gcgaccgaat atatcggtta 1440
 tgcgtgggcg atggttggtg tcattgtcgg cgcaactatc ggtatcaagc tgtttaagaa 1500
 attcacctcg aaagcaagct gataaaccga tacaattaa ggctcctttt ggagcctttt 1560
 ttttgagat tttcaacgtg aaaaaattat tattcgaat tcctttagtt gttcctttct 1620
 attctcactc cgccgaaact gttgaaagt gtccggcaaa accccataca gaaaattcat 1680
 ttactaacgt ctggaaagac gacaaaactt tagatcgta cgtaactat gagggctgtc 1740
 tgtggaatgc tacaggcgtt gtagtttgta ctggtgacga aactcagtgt tacggtacat 1800
 gggttcctat tgggcttgct atccctgaaa atgaggggtg ttgctctgag ggtggcggtt 1860
 ctgaggggtg cggttctgag ggtggcggtta ctaaaccctc tgagtacggt gatacaccta 1920
 ttccgggcta tacttatatc aaccctctcg acggcactta tccgctggt actgagcaaa 1980

ES 2 751 378 T3

accccgctaa tcctaatoct tctcttgagg agtctcagcc tcttaatact ttcattgttc 2040
 agaataatag gttccgaaat aggcaggggg cattaactgt ttatacgggc actgttactc 2100
 aaggcaactga ccccgttaaa acttattacc agtacactcc tgtatcatca aaagccatgt 2160
 atgacgctta ctggaacggc aaattcagag actgcgcttt ccattctggc tttaatgagg 2220
 atttatattgt ttgtgaatat caaggccaat cgtctgacct gcctcaacct cctgtcaatg 2280
 ctggcggcgg ctctggcggc ggttctggcg gcggctctga gggcggcggc tctgagggcg 2340
 gcggttctga gggcggcggc tctgagggcg gcggttccgg tggcggcctc ggttccggcg 2400
 attttgatta tgaaaagatg gcaaacgcta ataagggggc tatgaccgaa aatgccgatg 2460
 aaaacgcgct acagtctgac gctaaaggca aacttgattc tgtcgcctact gattacggcg 2520
 ctgctatoga tggtttcatt ggtgacgctt ccggccttgc taatggtaat ggtgctactg 2580
 gtgattttgc tggctctaata tcccaaattg ctcaagtcgg tgacggctgat aattcacctt 2640
 taatgaataa tttccgctca tatttacctt ccctccctca atcggttgaa tgtcgcctt 2700
 ttgtctttgg cgcctggtaaa ccatatgaat tttctattga ttgtgacaaa ataaacttat 2760
 tccgtggcgt ctttgcgctt cttttatatg ttgccacctt tatgtatgta ttttctacgt 2820
 ttgctaacat actgcgtaat aaggagctt aatcatgcc a gttcttttgg gtattccgctt 2880
 attattgcgt ttccctcggc tccttctggc aactttgttc ggctatctgc ttacttttct 2940
 taaaaagggc ttccgtaaga tagctattgc tatttcattg tttcttgctc ttattattgg 3000
 gcttaactca attcttctgg gttatctctc tgatattagc gctcaattac cctctgactt 3060
 tgttcagggt gttcagttaa ttctcccgtc taatgcgctt ccctgttttt atgttattct 3120
 ctctgtaaag gctgctattt tcatttttga cgttaaacaa aaaatcgctt cttatttgga 3180
 ttgggataaa taatatggct gtttattttg taactggcaa attaggctct ggaaagacgc 3240
 tcgcttagcgt tggtaagatt caggataaaa ttgtagctgg gtgcaaaata gcaactaatc 3300
 ttgatttaag gcttcaaaac ctcccgcaag tcgggaggtt cgctaaaacg cctcgcgctc 3360
 ttagaatacc ggataagcct tctatatctg atttgcttgc tattgggcgc ggtaatgatt 3420
 cctacgatga aaataaaaaac ggcttgcttg ttctcgatga gtgcggctact tggtttaata 3480
 cccgttcttg gaatgataag gaaagacagc cgattattga ttggtttcta catgctccta 3540
 aattaggatg ggatattatt tttcttgttc aggacttacc tattgttgat aaacaggcgc 3600
 gttctgcatt agctgaacat gttgtttatt gtcgctcgtc ggacagaatt actttacctt 3660
 ttgtcggctac tttatattct cttattactg gctcgaanaat gcctctgcct aaattacatg 3720
 ttggcgttgt taaatatggc gattctcaat taagccctac tgttgagcgt tggctttata 3780
 ctggtaagaa tttgtataac gcatatgata ctaaacaggc tttttctagt aattatgatt 3840

ES 2 751 378 T3

ccggtgttta ttcttattta acgccttatt tatcacacgg tcggtatttc aaaccattaa 3900
 atttaggtca gaagatgaag cttactaaaa tatatttgaa aaagttttca cgcggttcttt 3960
 gtcttgcgat tggatttgca tcagcattta catatagtta tataacccaa cctaagccgg 4020
 aggttaaaaa ggtagtctct cagacctatg attttgataa attcactatt gactcttctc 4080
 agcgtcttaa tctaagctat cgctatgttt tcaaggattc taagggaaaa ttaattaata 4140
 gcgacgattt acagaagcaa ggttattcac tcacatatat tgatttatgt actgtttcca 4200
 ttaaaaaagg taattcaaat gaaattgtta aatgtaatta attttgtttt cttgatgttt 4260
 gtttcatcat cttcttttgc tcaggttaatt gaaatgaata attcgcctct gcgcgatttt 4320
 gtaacttggg attcaaagca atcaggcgaa tccggtattg tttctcccga tgtaaaaggt 4380
 actgttactg tatattcatc tgacgttaaa cctgaaaatc tacgcaattt ctttatttct 4440
 gttttacgtg caaatgattt tgatatggta ggttctaacc cttccattat tcagaagtat 4500
 aatccaaaca atcaggatta tattgatgaa ttgccatcat ctgataatca ggaatatgat 4560
 gataattccg ctccttctgg tggtttcttt gttccgcaaa atgataatgt tactcaaact 4620
 tttaaaatta ataacgttcg ggcaaaggat ttaatacgag ttgtcgaatt gtttgtaaag 4680
 tctaatactt ctaaactctc aatgtatta tctattgacg gctctaactc attagttggt 4740
 agtgctccta aagatatttt agataacctt cctcaattcc tttcaactgt tgatttgcca 4800
 actgaccaga tattgattga gggtttgata tttgaggttc agcaaggatga tgcttttagat 4860
 ttttcatttg ctgctggctc tcagcgtggc actggttcag gcggtgttaa tactgaccgc 4920
 ctcacctctg ttttatcttc tgctgggtgt tcggttcggt tttttaatgg cgatgtttta 4980
 gggctatcag ttcgcgcatt aaagactaat agccattcaa aatattgtc tgtgccacgt 5040
 attcttacgc tttcagggtca gaagggttct atctctgttg gccagaatgt cccttttatt 5100
 actggtcgtg tgactgggtga atctgccaat gtaataatc catttcagac gattgagcgt 5160
 caaaatgtag gtatttccat gagcgttttt cctggtgcaa tggctggcgg taatattggt 5220
 ctggatatta ccagcaaggc cgatagtttg agttcttcta ctcaggcaag tgatgttatt 5280
 actaatcaaa gaagtattgc tacaacggtt aatttgcggt atggacagac tcttttactc 5340
 ggtggcctca ctgattataa aaacacttct caggattctg gcgtaccgtt cctgtctaaa 5400
 atccctttaa tcggcctcct gtttagctcc cgctctgatt ctaacgagga aagcacgtta 5460
 tacgtgctcg tcaaagcaac catagtacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcgggcggg 5520
 tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt 5580
 cgctttcttc ccttcctttc tcgccacgtt cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg 5640
 ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctcgaccca aaaaacttga 5700
 tttgggtgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac 5760

ES 2 751 378 T3

gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaaccc 5820
 tatctcgggc tattcttttg atttataagg gattttgccg atttcggaac caccatcaca 5880
 caggatthtc gcctgctggg gcaaaccagc gtggaccgct tgctgcaact ctctcagggc 5940
 caggcggtga agggcaatca gctgttgccc gtctcgctgg tgaaaagaaa aaccaccctg 6000
 gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttgccg attcattaat gcagctggca 6060
 cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 6120
 cactcattag gcacccagc cttgacactt tatgcttccg gctcgtataa tgtgtggaat 6180
 tgtgagcggg taacaatttc acacgccaaag gagacagtca taatgaaata cctattgcct 6240
 acggcagccg ctggattgtt attactcgtc gcccaaccag ccatggccgg cggaggatct 6300
 ggcgagcaaa agctcattag tgaagaggat cttgccgaga cagtggagag ctgcctggcc 6360
 aagtcgcaca ccgagaacag cttaccaat gtttgaag atgataagac cctggaccgc 6420
 tatgccaatt acgaaggttg cttatggaac gcaaccggtg tggttgtgtg cacaggcgat 6480
 gagaccaat gctatggcac ctgggtgccg atcggctctg caattccgga gaacgaaggc 6540
 ggaggtagcg aaggaggtg aagtgaaggc ggagatcgg aaggggtg caciaagcca 6600
 ccagaatatg gagacacccc gattccaggt tacacctaca ttaatccgct ggatggtaca 6660
 taccctccag gcaccgaaca gaatccgga aaccggaacc cgagcctgga agaaagccaa 6720
 ccgctgaaca ctttatgtt ccaaaacaac cgttttcgta accgtcaagg agccctgacc 6780
 gtatacaccg gtacagtgac ccagggtaca gatccggtga agacctaacta tcaatataca 6840
 ccggttagca gcaaggcaat gtacgatgca tattggaatg gcaagtttcg tgattgtgca 6900
 tttcatagcg gtttcaacga agacctgtt gtgtgcgaat accagggtca gagcagcgat 6960
 ttaccgcagc caccggttaa cgcaggtggt ggaagcggag ggggaagtgg cgggtgggtca 7020
 gaagcggag gatcgaagg aggtgggagt gaaggagggg gaagcgaagg aggggatca 7080
 ggaggtggtg gcggaagtgg cgacttcgac tacgagaaga tggccaatgc aaacaaaggc 7140
 gcaatgacag agaacgcaga cgagaatgca ctgcaaagt atgcaaagg taagctggac 7200
 agcgttgcaa ccgactatgg agcagcaatt gacggcttta tcggagatgt cagcggctctg 7260
 gcgaacggca acggagcaac aggcgacttc gcaggtagca acagccagat ggcacaggtt 7320
 ggagatggcg acaacagtcc gctgatgaac aactttcgcc agtacctgcc gactctgcca 7380
 caaagcgtcg agtgccgtcc gtttgttttc ggtgcaggca agccgtacga gttcagcatc 7440
 gactgcgata agattaatct ttttcgcgga gttttcgcac tcctgctgta cgtggcaacg 7500
 ttcattgtacg ttttcagcac cttcgccaat atcttacgca acaaagaaag ctaagcaata 7560
 gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgcg cagcctgaat ggcgaatggc 7620

ES 2 751 378 T3

gctttgcctg gtttccggca ccagaagcgg tgccggaaag ctggctggag tgcgatcttc 7680
 ctgaggccga tactgtcgtc gtcccctcaa actggcagat gcacggttac gatgcgccca 7740
 tctacaccaa cgtgacctat cccattacgg tcaatccgcc gtttgttccc acggagaatc 7800
 cgacgggttg ttactcgtc acatttaatg ttgatgaaag ctggctacag gaaggccaga 7860
 cgcgaaattat ttttgatggc gttcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 7920
 taatgcgaat ttttaacaaa tattaacggt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 7980
 cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cggggtagat atgattgaca tgctagtttt 8040
 acgattaccg ttcacogatt ctcttgtttg ctccagactc tcaggcaatg acctgatagc 8100
 ctttgtagat ctctcaaaaa tagctaccct ctccggcatt aatttatcag ctagaacggt 8160
 tgaatatcat attgatggtg atttgactgt ctccggcctt tctcacctt ttgaatcttt 8220
 acctacacat tactcaggca ttgcatttaa aatatatgag ggttctaaaa atttttatcc 8280
 ttgcgttgaa ataaaggctt ctcccgcaa agtattacag ggtcataatg tttttggtac 8340
 aaccgattta gctttatgct ctgaggcttt attgcttaat tttgctaatt ctttgccttg 8400
 cctgtatgat ttattggacg tt 8422

5 <210> 16
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 16

ggcggaggat ctggc 15

10 <210> 17
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 17

gtgaaaaat tattatcgc aattcctta gttgtcctt tctattctca ctcc 54

20 <210> 18
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 18

ES 2 751 378 T3

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

His Ser

5 <210> 19
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 19

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattggtat tactcgctgc ccaaccagcc 60

atggcc 66

10 <210> 20
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 20

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala
 20

20 <210> 21
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 21

Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Pro Ala Lys Ser His Thr Glu Asn Ser
 1 5 10 15

Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu Asp Arg Tyr Ala Asn
 20 25 30

Tyr Glu Gly Cys Leu Trp Asn Ala Thr Gly Val Val Val Cys Thr Gly
 35 40 45

Asp Glu Thr Gln Cys Tyr Gly Thr Trp Val Pro Ile Gly Leu Ala Ile

ES 2 751 378 T3

Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp Phe Ala
305 310 315 320

Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp Asn Ser Pro
325 330 335

Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Pro Gln Ser Val
340 345 350

Glu Cys Arg Pro Phe Val Phe Gly Ala Gly Lys Pro Tyr Glu Phe Ser
355 360 365

Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg Gly Val Phe Ala Phe Leu
370 375 380

Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile
385 390 395 400

Leu Arg Asn Lys Glu Ser
405

<210> 22

<211> 406

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 22

Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro His Thr Glu Asn Ser
1 5 10 15

Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu Asp Arg Tyr Ala Asn
20 25 30

Tyr Glu Gly Cys Leu Trp Asn Ala Thr Gly Val Val Val Cys Thr Gly
35 40 45

Asp Glu Thr Gln Cys Tyr Gly Thr Trp Val Pro Ile Gly Leu Ala Ile
50 55 60

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

Gly Ser Glu Gly Gly Gly Thr Lys Pro Pro Glu Tyr Gly Asp Thr Pro
85 90 95

Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr Ile Asn Pro Leu Asp Gly Thr Tyr Pro Pro

ES 2 751 378 T3

Glu Cys Arg Pro Phe Val Phe Gly Ala Gly Lys Pro Tyr Glu Phe Ser
 355 360 365

Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg Gly Val Phe Ala Phe Leu
 370 375 380

Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile
 385 390 395 400

Leu Arg Asn Lys Glu Ser
 405

- <210> 23
- <211> 1218
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Construcción sintética

<400> 23

```

gccgaaactg ttgaaagttg tccggcaaaa tcccatacag aaaattcatt tactaacgtc      60
tggaagacg acaaaacttt agatcgttac gtaactatg agggctgtct gtggaatgct      120
acaggcgttg tagttgtac tggtgacgaa actcagtgtt acggtacatg ggttcctatt      180
gggcttgcta tccctgaaaa tgagggtggt ggctctgagg gtggcggttc tgagggtggc      240
ggttctgagg gtggcggtac taaacctcct gagtacgggt atacacctat tccgggctat      300
acttatatca accctctcga cggcacttat ccgcctggta ctgagcaaaa ccccgctaata      360
cctaatacctt ctcttgagga gtctcagcct cttaataactt tcatgtttca gaataatagg      420
ttccgaaata ggcagggggc attaactggt tatacgggca ctgttactca aggcaactgac      480
cccgttaaaa cttattacca gtacactcct gtatcatcaa aagccatgta tgacgcttac      540
tggaacggta aattcagaga ctgcgctttc cattctggct ttaatgagga tttatttgtt      600
tgtgaatatc aaggccaatc gtctgacctg cctcaacctc ctgtcaatgc tggcggcggc      660
tctggtggtg gttctggtgg cggctctgag ggtggtggct ctgagggtgg cggttctgag      720
ggtggcggct ctgagggagg cggttccggt ggtggctctg gttccggtga ttttgattat      780
gaaaagatgg caaacgctaa taagggggct atgaccgaaa atgccgatga aaacgcgcta      840
cagtctgacg ctaaaggcaa acttgattct gtcgctactg attacggtgc tgctatcgat      900
ggtttcattg gtgacgtttc cggccttgct aatggtaatg gtgctactgg tgattttgct      960
ggctctaatt cccaaatggc tcaagtcggt gacggtgata attcaccttt aatgaataat     1020
ttccgtcaat atttaccttc cctccctcaa toggttgaat gtgcaccttt tgtctttggc     1080
gctggtaaac catatgaatt ttctattgat tgtgacaaaa taaacttatt ccgtgggtgct     1140
tttgcgtttc ttttatatgt tgccaccttt atgtatgtat tttctacggt tgctaacata     1200
ctgcgtaata aggagtct
    
```

ES 2 751 378 T3

<210> 24
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 24

```

gccgaaactg ttgaaagttg tttagcaaaa cccatacag aaaattcatt tactaacgtc      60
tggaaagacg acaaaacttt agatcgttac gctaactatg agggctgtct gtggaatgct      120
acaggcgttg tagtttgtag tggtgacgaa actcagtgtt acggtacatg ggttcctatt      180
gggcttgcta tccctgaaaa tgagggtggt ggctctgagg gtggcggttc tgagggtggc      240
ggttctgagg gtggcggtac taaacctcct gagtacggtg atacacctat tccgggctat      300
acttatatca accctctcga cggcacttat ccgcctggta ctgagcaaaa ccccgctaata      360
cctaatacctt ctcttgagga gtctcagcct cttaataactt tcatgtttca gaataatagg      420
ttccgaaata ggaggggggc attaactggt tatacgggca ctgttactca aggcactgac      480
cccgttaaaa cttattacca gtacactcct gtatcatcaa aagccatgta tgacgcttac      540
tggaacggta aattcagaga ctgcgctttc cattctggct ttaatgagga tttatttggt      600
tgtgaatata aaggccaatc gtctgacctg cctcaacctc ctgtcaatgc tggcggcggc      660
tctggtgggt gttctggtgg cggctctgag ggtggtggct ctgaggggtg cggttctgag      720
ggtggcggtc ctgagggagg cggttccggt ggtggctctg gttccggtga ttttgattat      780
gaaaagatgg caaacgctaa taagggggct atgaccgaaa atgccgatga aaacgcgcta      840
cagtctgacg ctaaaggcaa acttgattct gtcgctactg attacggtgc tgctatcgat      900
ggtttcattg gtgacgtttc cggccttgct aatggtaatg gtgctactgg tgattttgct      960
ggctctaatt cccaaatggc tcaagtcggt gacggtgata attcaccttt aatgaataat     1020
ttccgtcaat atttaccttc cctccctcaa tcggttgaat gtcgcccttt tgtctttggc     1080
gctggtaaac catatgaatt ttctattgat tgtgacaaaa taaacttatt ccgtgggtgtc     1140
tttgcgtttc ttttatatgt tgccaccttt atgtatgtat tttctacggt tgctaacata     1200
ctgcgtaata aggagtct                                     1218
    
```

10 <210> 25
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

15 <400> 25

ES 2 751 378 T3

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

<210> 26

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

ES 2 751 378 T3

<400> 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 27

<211> 672

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5

ES 2 751 378 T3

<223> Construcción sintética

<400> 27

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gactatgcc a tgactgggt ccgccaggct      120
ccaggaagg ggctggagtg ggtgtcagct attacttga atagtgtca catagactac      180
gcagactccg tggagggccg gttcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagtgagc      300
tacctgagta ctgcctccag cctggactac tggggccaag gaaccctggt caccgtctcc      360
tcagcctcca ccaagggccc atcggctctc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct      420
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg      480
tcgtggaact caggcgcct gaccagcggc gtgcacacct tcccgctgt cctacagtcc      540
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag      600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggaaa gaaagcagag      660
cccaaatctt gc                                                              672

```

5 <210> 28
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

10 <400> 28

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcgagtca gggcattcgc aattatttag cctggtatca gcagaaacca      120
gggaaagctc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct      180
cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct      240
gaagatggtg caacttatta ctgtcaacgc tataaccgtg ccccttacac gttcggccaa      300
gggaccaagg tggaaatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc      360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc                                                              642

```

15 <210> 29
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 751 378 T3

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 29

Val Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr
 1 5 10 15

Pro Val Ala Lys Ala
 20

5 <210> 30
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 30

gtgaaacaaa gcactattgc actggcactc ttaccgttac tgtttacccc tgtcgcaaaa 60

gcc 63

15 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 31

20 Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser
 1 5 10

<210> 32
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 32

taccgtacg acgtccgga ttatgccagc 30

30 <210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

35 <400> 33

Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5

<210> 34
 <211> 17
 <212> PRT

ES 2 751 378 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 34

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15

5

Ala

<210> 35

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 35

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15

Ala Gly Gly Gly Gly Ser
20

15

<210> 36

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20

<400> 36

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15

Ala Gly Pro Pro Gly Pro

20

REIVINDICACIONES

1. Un vector bacteriófago M13 tipo 33 que comprende una primera secuencia de polinucleótido que codifica una secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1 y una segunda secuencia de polinucleótido que codifica una secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 2.
- 5 2. El vector bacteriófago M13 tipo 33 de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que dicha primera secuencia de polinucleótido se da en la SEQ ID NO: 3 y dicha segunda secuencia de polinucleótido se da en la SEQ ID NO: 4.
3. El vector bacteriófago M13 tipo 33 de acuerdo con la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, que comprende adicionalmente una secuencia de polinucleótido que codifica una secuencia marcadora de detección adecuada clonada en fase con, y corriente arriba de, la primera secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1.
- 10 4. El vector bacteriófago M13 tipo 33 de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente una secuencia de polinucleótido que codifica una secuencia marcadora de detección adecuada clonada en fase con, y corriente arriba de, la secuencia de la primera secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1, en el que la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia marcadora codifica un marcador c-myc, un marcador HA, un marcador His, un marcador Flag, o un marcador S.
- 15 5. El vector bacteriófago M13 tipo 33 de acuerdo con la Reivindicación 3 o la Reivindicación 4, en el que la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia marcadora codifica un marcador c-myc.
6. El vector bacteriófago M13 tipo 33 de acuerdo con la Reivindicación 5, en el que la secuencia de polinucleótido que codifica el marcador c-myc se da en la SEQ ID NO: 8.
- 20 7. El vector bacteriófago M13 tipo 33 de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho vector comprende la secuencia de polinucleótido que se da en la SEQ ID NO: 15.
8. El vector bacteriófago M13 tipo 33 de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 3 a 7, que comprende adicionalmente una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido exógeno clonada en fase con, y corriente arriba de, la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1, o corriente arriba de la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia marcadora de detección adecuada.
- 25 9. El vector bacteriófago M13 tipo 33 de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho vector es una molécula de ADN de cadena doble.
10. El vector bacteriófago M13 tipo 33 de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho vector es un ADN plasmídico de cadena doble.
- 30 11. Un procedimiento para la producción de una partícula de bacteriófago M13 que comprende:
 - (a) la transfección de una célula huésped bacteriana con un vector bacteriófago M13 tipo 33 de cadena doble que comprende una primera secuencia de polinucleótido que codifica una secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1 y una segunda secuencia de polinucleótido que codifica una secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 2,
 - 35 (b) la incubación de dicha célula huésped bacteriana en condiciones adecuadas para la expresión de dichas primera y segunda secuencias de polinucleótido y el ensamblaje de las partículas de bacteriófago M13 en dicha célula huésped bacteriana, y
 - (c) la recuperación a partir de dicha célula huésped bacteriana de una partícula de bacteriófago M13 que comprende secuencias polipeptídicas que se dan en las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 presentadas independientemente sobre la superficie de revestimiento del bacteriófago M13.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicha primera secuencia de polinucleótido se da en la SEQ ID NO: 3 y dicha segunda secuencia de polinucleótido se da en la SEQ ID NO: 4.
13. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 11 o la Reivindicación 12, en el que el vector bacteriófago M13 de doble cadena comprende adicionalmente una secuencia de polinucleótido que codifica una secuencia marcadora de detección adecuada clonada en fase con, y corriente arriba, de la primera secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1.
- 45 14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia marcadora codifica un marcador c-myc, un marcador HA, un marcador His, un marcador Flag, o un marcador S.
- 50 15. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 13 o la Reivindicación 14, en el que la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia marcadora codifica un marcador c-myc.

16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la secuencia de polinucleótido que codifica el marcador c-myc se da en la SEQ ID NO: 8.
17. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 11 a 16, en el que dicho vector M13 de cadena doble comprende la secuencia de polinucleótido que se da en la SEQ ID NO: 15.
- 5 18. El procedimiento de acuerdo con las Reivindicaciones 13 a 17, en el que el vector M13 de doble cadena comprende adicionalmente una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido exógeno clonada en fase con, y corriente arriba de, la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1, o corriente arriba de la secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia marcadora de detección adecuada.
- 10 19. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 11 a 18 en el que la célula huésped bacteriana es una cepa bacteriana F⁺.
20. Una partícula de bacteriófago M13 en la que dicha partícula comprende los polipéptidos que se dan en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 presentadas independientemente sobre la superficie de revestimiento de la partícula del fago.
- 15 21. La partícula de bacteriófago M13 de acuerdo con la Reivindicación 20 en la que dicha partícula comprende adicionalmente una secuencia marcadora de detección adecuada fusionada al extremo N de la secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1.
22. La partícula de bacteriófago M13 de acuerdo con la Reivindicación 21, en la que la secuencia marcadora de detección adecuada se da en la SEQ ID NO: 7.
- 20 23. La partícula de bacteriófago M13 de acuerdo con la Reivindicación 21 o la Reivindicación 22, en la que dicha partícula comprende adicionalmente un polipéptido exógeno fusionado al extremo N de la secuencia polipeptídica que se da en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o al extremo N de la secuencia marcadora de detección adecuada.
- 25 24. La partícula de bacteriófago M13 de acuerdo con la Reivindicación 23, en la que el polipéptido exógeno se fusiona a la secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1, o a la secuencia marcadora de detección adecuada, mediante un engarce peptídico fusionado al extremo N de la secuencia polipeptídica que se da en la SEQ ID NO: 1, o al extremo N de la secuencia marcadora de detección adecuada, y al extremo C del polipéptido exógeno.