

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 069**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2016 PCT/EP2016/077785**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2017 WO17085086**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2016 E 16797856 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3377632**

54 Título: **Etiqueta de epítipo y método de detección, captura y/o purificación de polipéptidos etiquetados**

30 Prioridad:

16.11.2015 EP 15194838

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

23.12.2020

73 Titular/es:

CHROMOTEK GMBH (50.0%)

Am Klopferspitz 19

82152 Martinsried-Planegg, DE y

NMI NATURWISSENSCHAFTLICHES UND

MEDIZINISCHES INSTITUT AN DER UNIVERSITÄT

TÜBINGEN (50.0%)

72 Inventor/es:

ROTHBAUER, ULRICH;

POETZ, OLIVER;

ROMER, TINA;

BUCHFELLNER, ANDREA;

YURLOVA, LARISA;

ZOLGHADR, KOUROSH;

BOGNER, JAQUELINE;

RUF, BENJAMIN;

LINKE-WINNEBECK, CHRISTIAN y

METTERLEIN, MICHAEL

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 800 069 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

Etiqueta de epítipo y método de detección, captura y/o purificación de polipéptidos etiquetados

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la investigación biomédica, de la bioquímica y de la biología celular. Se presenta un nuevo epítipo que se puede usar como etiqueta para usar en una caracterización, purificación y localización *in vivo* rápida y eficaz de polipéptidos de interés que comprenden la etiqueta. La etiqueta se reconoce específicamente por un anticuerpo específico de epítipo, que permite la interacción anticuerpo-etiqueta.

Antecedentes

En la era postgenómica, el campo de la proteómica ha crecido de forma espectacular. Para una multitud de aplicaciones, que van desde análisis de espectrometría de masas hasta imágenes de alto contenido, los ensayos basados en afinidad son indispensables. Los ensayos basados en afinidad se basan en la detección de una interacción proteína-proteína (PPI) entre un receptor y un ligando, tales como un anticuerpo y un antígeno. En el caso de la monitorización de una interacción antígeno-anticuerpo, el ensayo también se denomina ensayo de inmunoafinidad. Los ensayos de inmunoafinidad son el método de elección para probar la identidad, cantidad y/o ubicación de un polipéptido de interés. Sin embargo, hay casos en los que no se dispone de anticuerpos adecuados. Esta desventaja de los ensayos basados en inmunoafinidad puede superarse mediante un método denominado "etiquetado de epítipos", en donde una proteína se etiqueta con un epítipo, es decir, la parte de unión de una proteína antigénica.

El etiquetado de epítipos es una técnica en la que un epítipo conocido se fusiona con una proteína recombinante mediante ingeniería genética. Mediante la elección de un epítipo para el que se dispone de un anticuerpo, la técnica permite la detección de proteínas para las que no se dispone de anticuerpos. Desde finales de la década de 1980, el etiquetado de epítipos se ha convertido en un método estándar de genética molecular para permitir una caracterización, purificación y localización *in vivo* rápida y eficaz de los productos proteicos de genes clonados.

En los primeros tiempos de la proteómica, las primeras etiquetas disponibles en el mercado se diseñaron originalmente para la purificación de proteínas. Son ejemplos de estas primeras etiquetas FLAG, 6 x HIS y el sistema glutatión-S-transferasa (GST). La etiqueta 6 x HIS se basa en la afinidad de metales y el sistema GST se basa en la afinidad del GST por el glutatión. FLAG es una de las primeras etiquetas de epítipo utilizadas comercialmente.

Posteriormente, el descubrimiento de informadores proteicos fluorescentes tales como la proteína verde fluorescente (GFP) hizo posible detectar proteínas intracelularmente sin necesidad de un reactivo secundario. En este caso, las proteínas de interés se etiquetaron con la secuencia proteica de longitud completa de GFP, que hacía que la proteína etiquetada de interés fuera fluorescente.

Sin embargo, el problema con las etiquetas que comprenden proteínas de longitud completa tales como la GST proteína de unión a maltosa (MBP) o GFP, es que algunas veces interfieren estéricamente con la localización subcelular de la proteína o el plegamiento, lo cual puede comprometer o anular la función nativa de la proteína a analizar.

Por lo tanto, se han desarrollado numerosas etiquetas de epítipos basadas en péptidos pequeños tales como c-myc, V5, HA, CBP o FLAG. Dichas etiquetas tienen un origen sintético (FLAG) o derivan de proteínas virales (HA, V5) o endógenas de mamíferos (c-myc, CBP). Se caracterizan por un tamaño de 8 a 26 restos de aminoácidos y se detectan mediante IgG clásicas (poli- o monoclonales). Un problema asociado con etiquetas derivadas de proteínas endógenas es el hecho de que el anticuerpo específico de la etiqueta generalmente también se une a la proteína endógena. Si la interacción entre la etiqueta y el anticuerpo no es específica, el ensayo puede dar falsos positivos. Debido a la competencia entre la proteína etiquetada y la proteína endógena como compañeros de unión para el anticuerpo, el ensayo será menos eficaz.

Aunque se dispone de muchos sistemas de captura de inmunoafinidad que utilizan anticuerpos específicos de etiqueta, siguen existiendo graves problemas debido a la unión de baja afinidad, interacciones inespecíficas, variaciones entre lotes o funcionalidad reducida de los anticuerpos tras el acoplamiento covalente a superficies sólidas.

Asimismo, un problema específico de los sistemas conocidos de detección y/o captura por inmunoafinidad es su dependencia de anticuerpos convencionales desarrollados por el sistema inmunitario de los vertebrados para detectar la proteína etiquetada con epítipo.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención fue proporcionar un sistema de detección y/o captura por inmunoafinidad que se caracterizara por una alta afinidad, especificidad y reproducibilidad.

Además, fue un objeto de la presente invención proporcionar una etiqueta de epítipo que pudiera interactuar de forma

específica, fiable, reproducible y con una alta afinidad con un anticuerpo específico de epítipo. Otro objeto de la presente invención fue proporcionar los componentes necesarios para un ensayo basado en inmunoafinidad que fuera adecuado para detectar un polipéptido de interés de forma fiable, específica y eficaz, que pudiera usarse, por ejemplo, para la obtención de imágenes celulares o la detección directa de antígeno.

5

Otro objeto de la presente invención fue proporcionar los componentes necesarios para un ensayo basado en inmunoafinidad que fuera adecuado para purificar de forma fiable específica y eficaz un polipéptido de interés.

Asimismo, fue un objeto de la presente invención proporcionar un sistema para la captura y/o detección, en particular un sistema que pudiera usarse para diferentes tipos de análisis, para análisis combinados mediante estudios microscópicos y bioquímicos, entre otros.

Otro objeto fue proporcionar un método de purificación robusto para proteínas recombinantes que permitiera el uso de condiciones no desnaturizantes o desnaturizantes.

15

Descripción de los dibujos

La invención se explica adicionalmente con referencia a las siguientes figuras.

20 La **figura 1** muestra el análisis estructural de BC2-nanoanticuerpo (BC2-Nb) y un complejo BC2-Nb/BC2T.

(a) muestra las interacciones de la cadena principal de BC2-Nb/BC2T. El BC2-péptido (BC2T) (rosa) se pliega en una cadena β que forma parte de una estructura de lámina β formada por la región determinante de complementariedad 3 (CDR3, azul) y las regiones marco 2 y 3 (gris). Se muestran 13 enlaces de hidrógeno entre las cadenas principales (líneas discontinuas negras) de los cuales uno está mediado por agua (esfera roja). La CDR3 aporta ocho y las regiones marco cinco de estas interacciones. La CDR1 (amarillo claro) y la CDR2 (amarillo) no participan en la unión.

25

(b) muestra la llamada interacción de "bloqueo de cabeza" ("headlock"). Una interacción mediada por carga entre la Arg106 de la CDR3 (azul) y Glu44 en FR2 está estabilizando el complejo BC2-Nb/BC2T. Estas cadenas laterales de aminoácidos alcanzan al péptido (rosa), formando un puente de sal que bloquea al péptido en su sitio de unión.

30

(c) muestra interacciones específicas de BC2-Nb/BC2T. Además de las interacciones de la cadena principal, un pequeño número de interacciones mediadas por cadenas laterales generan especificidad por la secuencia del péptido BC2T. El resto W10 de BC2T está involucrado en una interacción CH- π con Cys50 (línea de puntos). Una molécula de agua (esfera roja) está unida por los aminoácidos del péptido S8 (rosa), Tyr109, dos grupos carbonilo y un grupo amina. También se muestra la interacción mediada por la carga entre la Arg106 (CDR3) y la cadena lateral de Glu44 (FR2), que alcanza al péptido.

35

40

La **figura 2** muestra la identificación de restos que median la especificidad de unión de BC2T.

Se incubaron bibliotecas de variantes de secuencia posicional de BC2T con BC2-Nb (barras negras), BC2-Nb_{R106S} (gris claro) y BC2-Nb_{R106E} (gris oscuro) inmovilizados en sepharose ($n = 3$). Después de la precipitación, los sobrenadantes se sometieron a cromatografía líquida seguida de análisis de espectrometría de masas. Se identificaron variantes de secuencia precipitadas específicamente mediante el cálculo de la relación de señales producidas por los péptidos en el sobrenadante de BC2-Nb o mutantes indicados y el sobrenadante de un Nb de control no relacionado con BC2T (Nb específico de GFP). Se muestran los resultados para las bibliotecas de variantes de secuencia de (a) BC2T_{R3X}, (b) BC2T_{A6X}, (c) BC2T_{S8XY} (d) BC2T_{W10X} (véanse los resultados completos en la **tabla 1**). Las posiciones variadas se indican como una X en la secuencia de BC2T. Los aminoácidos se agrupan de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas de su cadena lateral: no polares, polares y cargados. Se usó ácido gamma-amino butírico en lugar de cisteína en la síntesis de la biblioteca. Se muestran las medias y desviaciones típicas (sd; barras de error) de tres experimentos independientes.

45

50

La **figura 3** muestra la purificación en un solo paso de proteínas etiquetadas con BC2 utilizando el nanotrap de BC2.

55

(a) Para la inmunoprecipitación, se incubaron fracciones de proteínas solubles de lisados bacterianos que expresan GFP con una etiqueta BC2 C-terminal (GFP_{BC2T}) o únicamente GFP con BC2-Nb inmovilizado en agarosa (nanotrap de BC2). Las fracciones de entrada (I), no unidas (NB) y unidas (B) se separaron mediante SDS-PAGE y se visualizaron mediante azul de Coomassie (parte superior) o mediante análisis de inmunotransferencia (parte inferior).

60

(b) El nanotrap de BC2 une eficazmente a su epítipo en condiciones rigurosas. Se incubó GFP_{BC2T} procedente de extractos bacterianos a concentraciones crecientes de SDS (0 - 2%), Urea (0 - 4 M) o clorhidrato de guanidinio (0 - 3 M) y se precipitó como se describe en (a). Se muestran las fracciones de entrada (I) y las

65

unidas en las condiciones indicadas.

(c) Las proteínas etiquetadas con BC2 se liberan eficazmente utilizando pH alcalino o elución de péptidos. La GFP_{BC2T} unida al nanotrap de BC2 se sometió a elución con tiocianato de sodio (NaSCN, 1 - 3 M), elución ácida (glicina 0,2 M pH 1 - 2,5), elución alcalina (pH 10 - 12) o elución de péptido (0 - 1 mM). Se analizaron alícuotas de fracciones liberadas (R) y unidas (B) por inmunotransferencia con un anticuerpo anti-GFP.

(d) El nanotrap de BC2 se une a proteínas etiquetadas con BC2 procedentes de lisados de células humanas independientemente de si la etiqueta BC2 está localizada en el extremo N o C. Para la inmunoprecipitación de proteínas etiquetadas con BC2, se incubaron fracciones de proteínas solubles de células HEK293T que expresaban BC2TeGFP, eGFP_{BC2T} o únicamente eGFP con el nanotrap de BC2 como se describe en (a). Las fracciones de entrada (I), no unidas (NB) y unidas (B) se separaron mediante SDS-PAGE y se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie (parte superior) o mediante análisis de inmunotransferencia (parte inferior).

La **figura 4** muestra resultados de experimentos de inmunocitoquímica que usan un nanoanticuerpo BC2 marcado con fluorescencia.

(a) muestra una representación esquemática de proteínas de fusión etiquetadas con BC2 y BC2-Nb marcados con fluorescencia que se utilizan para estudios de colocalización. La secuencia de BC2T se fusionó genéticamente al extremo C de mCherry-Vimentina (mCherry-VIM_{BC2T}) y eGFP-PCNA (eGFP-PCNA_{BC2T})

(b) Se fijaron células HeLa que expresaban ectópicamente mCherry-VIM_{BC2T} o eGFP-PCNA_{BC2T} con metanol o PFA, respectivamente, seguido de tinción con los BC2-Nb marcados con fluorescencia y DAPI. Barra de escala de 25 µm.

La **figura 5** muestra la estructura de BC2-Nb sin ligando y el complejo BC2-Nb/BC2T correspondiente.

(a) muestra un diagrama de cintas de la estructura BC2-Nb sin ligando. Los cuatro restos de cisteína que forman dos enlaces disulfuro están marcados. La CDR3, que aporta contactos con el péptido en la estructura con ligando y experimenta un giro de aminoácidos tras la unión, está resaltada en naranja.

(b) muestra una superposición de estructuras BC2-Nb sin ligando y con ligando. La comparación de las dos estructuras revela un giro de 180 grados por dos aminoácidos. En la estructura BC2-Nb, la Arg106 está interactuando con el grupo carbonilo de Glu108, y la Tyr107 está involucrada en una interacción- π catiónica con la Arg45 (gráfico de cintas naranja). El carbono β de la Arg106 está orientado hacia el Nb y el de la Tyr107 está orientado en sentido contrario. En la estructura compleja unida al péptido, es al revés (gráfico de cintas azul). La Arg106 está involucrada en la unión de "bloqueo de cabeza" y la Tyr107 está formando un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo de la Arg104.

La **figura 6** muestra un esquema de las interacciones del BC2-péptido con el BC2-Nb.

El BC2-péptido se muestra con cadenas laterales en rosa. Su extremo N acetilado está en la parte superior y el extremo C amidado está en la parte inferior. Todas las interacciones polares dentro de 3,5 Å se representan con líneas negras de puntos, con sus compañeros de interacción del BC2-Nb en verde para la cadena principal y en amarillo para las interacciones de la cadena lateral. Las moléculas de agua se muestran en azul. Las interacciones hidrófobas relevantes dentro de 4,0 Å se representan con líneas grises de puntos.

La **figura 7** muestra que la mutación del motivo de bloqueo de cabeza conduce a mayores tasas de desactivación del nanoanticuerpo BC2. Para mediciones de afinidad basadas en espectroscopía de resonancia de plasmón superficial (SPR), se inmovilizó GFP con una etiqueta BC2 C-terminal (GFP_{BC2T}) (a - c) o únicamente GFP (d) en un chip CM5. Las mediciones cinéticas se realizaron inyectando seis concentraciones de BC2-Nb (a), BC2-Nb_{R106S} (b) o BC2-Nb_{R106E} (c) que varían de 8 nM - 250 nM. Los conjuntos de datos obtenidos se evaluaron utilizando el modelo de unión Langmuir 1:1 con transferencia de masa. Como control, se probó que BC2-Nb solo se unía a GFP (d). Las afinidades obtenidas expresadas en términos de la constante de disociación (K_D) y las constantes de velocidad de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) determinadas para BC2-Nb y los mutantes correspondientes se resumen en la **Tabla 3**.

La **Figura 8** muestra que las proteínas capturadas por el nanotrap de BC2 pueden eluirse en condiciones nativas. Se unió GFP_{BC2T} derivada del lisado bacteriano al nanotrap de BC2 y se sometió a elución usando condiciones tamponantes como se describe en la **Fig. 3 c**. La intensidad de la señal de fluorescencia de la GFP_{BC2T} liberada se visualizó y cuantificó usando un escáner láser. El panel superior muestra la intensidad fluorescente de la GFP_{BC2T} eluida en comparación con el lisado completo. Panel inferior: Cuantificación de fluorescencia de GFP obtenida para diferentes condiciones de elución. La fluorescencia de GFP obtenida del lisado no tratado se ajustó a 1. Se muestran las medias y s.d. (barras de error) de tres experimentos independientes (R1 - R3).

La **figura 9** muestra que BC2-Nb es funcional para la inmunoprecipitación y detección de proteínas etiquetadas con BC2.

(a) Para la inmunoprecipitación, se incubaron fracciones de proteína soluble de células HEK293T que expresaban eGFP-PCNA (control) o eGFP-PCNA etiquetado con BC2 (eGFP-PCNA_{BC2T}) (panel izquierdo) o mCherry-Vimentina (mCherry-VIM, control) o mCherry-VIM etiquetado con BC2 (mCherry-VIM_{BC2T}) con el nanotrap de BC2. Las fracciones de entrada (I), no unidas (NB) y unidas (B) se separaron mediante SDS-PAGE y se visualizaron mediante análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos anti-PCNA o anti-Vimentina (panel superior). Como control de carga, las manchas de transferencia se sondearon con un anticuerpo anti-GAPDH (panel inferior).

(b) Para la detección de transferencia de Western utilizando BC2-Nb marcado con fluorescencia (BC2-Nb_{AF488}), las cantidades indicadas de las fracciones de entrada (como se muestra en (a)) se sometieron a SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las transferencias de Western se sondearon con BC2-Nb₄₈₈ seguido de detección con anticuerpos anti-PCNA (panel izquierdo) o anti-Vimentina (panel derecho). Como controles de carga, se sondearon manchas de transferencia con un anticuerpo anti-GAPDH (panel inferior).

(c) Muestra que el nanotrap de BC2 precipita solo pequeñas cantidades de β -catenina endógena en comparación con las proteínas etiquetadas con BC2 sobreexpresadas. Se sometieron muestras como las descritas en (a) de la **Fig. 3 d** a análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo anti- β -catenina. Las flechas indican señales específicas de β -catenina.

La **Figura 10** muestra los resultados obtenidos por inmunocitoquímica usando nanoanticuerpo BC2 marcado con fluorescencia.

(a) Muestra imágenes confocales de mCherry-Vimentina_{BC2T} con el BC2-Nb_{AF488}. Se fijaron con metanol células HeLa que expresaban ectópicamente mCherry-VIM_{BC2T}, seguido de tinción con BC2-Nb marcado con fluorescencia y DAPI. Se muestra una imagen de proyección máxima (z-stack de 7 planos) de la celda en la esquina inferior izquierda del panel superior en la **Figura 4 b**. Barra de escala de 10 μ m.

(b) Muestra especificidad de BC2-Nb_{AF488} y BC2-Nb_{ATTO647}. Se fijaron células HeLa que expresaban ectópicamente mCherry-VIM o eGFP-PCNA sin etiquetar con metanol o PFA, respectivamente, y se tiñeron con los BC2-Nb marcados con fluorescencia indicados y DAPI. Barra de escala de 25 μ m.

La **figura 11** muestra una variación de la etiqueta BC2 de la presente invención. La secuencia original de BC2T (PDRKAAVSHWQQ; SEQ ID NO: 4) se modificó en el 50 por ciento de las posiciones, dando como resultado la secuencia PVRSAALSQWSS (BC2Tmut; SEQ ID NO: 5).

Tanto la versión original como la modificada de la etiqueta se fusionaron por el extremo C con GFP. Como control negativo se usó GFP sin la etiqueta BC2. Las proteínas se expresaron en *E. coli*. Se preparó un lisado y se inmunoprecipitaron 100 μ g de lisado total con nanoanticuerpo BC2 inmovilizado en agarosa. Las fracciones de entrada (I), no unidas (NB) y unidas (B) se analizaron mediante SDS-PAGE seguido de tinción con Coomassie (panel superior) o inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-GFP (panel inferior).

La **figura 12** muestra variaciones de longitud de la etiqueta BC2. La secuencia original de BC2T (PDRKAAVSHWQQ; SEQ ID NO: 4) se acortó, dando como resultado la secuencia PDRKAAVSHW (BC2T-10; SEQ ID NO: 14) y RKAASVSHW (BC2T-8; SEQ ID NO: 3). Las versiones acortadas y originales de las etiquetas se fusionaron por el extremo C con GFP (GFP-BC2T-10; La GFPBC2T-8, GFP-BC2T). Como control negativo, se usó GFP sin la etiqueta BC2. Las proteínas se expresaron en *E. coli*. Se preparó un lisado y se inmunoprecipitaron 100 μ g de lisado total con nanoanticuerpo BC2 inmovilizado en microesferas de agarosa. Las fracciones de entrada (I), no unidas (NB) y unidas (B) se analizaron mediante SDS-PAGE seguido de transferencia de Western usando un anticuerpo anti-GFP. Los resultados muestran que la secuencia BC2T-10 (PDRKAAVSHW; SEQ ID NO: 14) o la secuencia BC2T-8 (RKAASVSHW) como etiqueta C-terminal se reconocen tan eficazmente como los 12 aminoácidos del BC2T original (PDRKAAVSHWQQ) por el nanoanticuerpo BC2 específico del epítipo.

La **Figura 13** muestra dos variaciones de la etiqueta BC2 con afinidades de unión mejoradas con respecto a la etiqueta BC2 de tipo silvestre. Se usaron mediciones de afinidad basadas en interferometría de biocapa (BLI) para evaluar dos variaciones mejoradas de la secuencia de BC2T original (a: PDRVRAVSHWSS, pTag1 SEQ ID NO: 33; b: ADRVRAVSHWSS, pTag2 SEQ ID NO: 34) en comparación con la secuencia original de BC2T (c: BC2T SEQ ID NO: 4). BC2T y sus variaciones mejoradas se sintetizaron como péptidos con una biotina N-terminal unida a través de un engarce de etilenglicol e inmovilizados en biosensores de estreptavidina. La cinética de unión se analizó incubando péptidos inmovilizados con 4-5 concentraciones de BC2-Nb (5-50 nM) y se evaluó utilizando un modelo de unión 1:1. Las constantes de disociación obtenidas (K_D) y las constantes de velocidad de asociación (k_{on}) y de velocidad de disociación (k_{off}) se resumen en la tabla 5.

La **figura 14** muestra la aplicación de dos variaciones mejoradas de la etiqueta BC2 para la purificación de

proteínas y la inmunoprecipitación.

- 5 (a) Purificación de proteínas: El nanotrap de BC2 se incubó con la proteína mCherry etiquetada por el extremo N o C con la etiqueta BC2 original BC2T (SEQ ID NO: 4) o variaciones mejoradas de la misma (pTag1 SEQ ID NO: 33 y pTag2 SEQ ID NO: 34). Posteriormente, la proteína unida se eluyó usando el péptido libre correspondiente a una concentración de 100 μ M. Las fracciones de entrada (I), proteína no unida (NB), proteína liberada por elución del péptido (R) y proteína todavía unida después de la elución (B) se analizaron usando SDS-PAGE y tinción con Coomassie.
- 10 (b) Inmunoprecipitación: el nanotrap de BC2 se usó para precipitar la proteína mCherry fusionada por el extremo N con la variación de la etiqueta BC2 pTag1 SEQ ID NO: 33 de lisados de la línea celular humana HEK293T, la línea celular de insecto *Trichoplusia ni* High5 y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Las fracciones de entrada (I) y la proteína unida (B) se analizaron usando SDS-PAGE y tinción con Coomassie.

15 Definiciones

En esta descripción y en las reivindicaciones, se hará referencia a varios términos que se definirán por tener los siguientes significados:

- 20 La expresión "péptido epítipo" o "etiqueta de epítipo" se referirán a una secuencia peptídica de la presente invención que se usa como etiqueta; ambas expresiones se usan indistintamente. Un péptido epítipo de la presente invención se define en la reivindicación 1, en donde el péptido epítipo aislado no comprende una secuencia de aminoácidos como la definida por la SEQ ID NO: 3 (RKA AVSHW). El péptido epítipo o la etiqueta de epítipo pueden ser una secuencia aislada o pueden formar parte de una secuencia.
- 25 El término "polipéptido" se refiere a cualquier tipo de polipéptido o proteína y comprende cualquier secuencia de aminoácidos en la que los aminoácidos están conectados a través de enlaces peptídicos, tal como una secuencia de aminoácidos de al menos 10 aminoácidos de longitud, con la condición de que la construcción de la etiqueta de epítipo y el polipéptido no sea β -catenina. El término polipéptido se usa en esta solicitud de manera muy general y comprenderá también péptidos, tales como oligopéptidos. Los términos polipéptido y proteína se usan indistintamente.
- 30 La expresión "polipéptido de interés" o "proteína de interés" se referirán a cualquier tipo de polipéptido o proteína que tiene una función o propiedad, tal como una molécula fisiológicamente activa, y comprende todas las variantes de estructura y variantes de secuencia que tienen una propiedad o función deseada. En particular, la expresión abarcará cualquier tipo de péptido y proteína, así como una proteína de fusión. Ambas expresiones se usan indistintamente.
- 35 La expresión "proteína de fusión" o "polipéptido de fusión" se referirán a una proteína o un polipéptido creado mediante la unión de dos o más polipéptidos o al menos un polipéptido y al menos un péptido o al menos un polipéptido y al menos un oligopéptido. Por ejemplo, una "proteína de fusión" puede referirse a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína fusionada con la secuencia de aminoácidos de un péptido epítipo. La
- 40 proteína de fusión o el polipéptido de fusión pueden comprender uno o más de un polipéptido y uno o más de un péptido epítipo. Además, los péptidos fusionados se pueden unir mediante un puente o secuencia engarce. El péptido epítipo se fusiona preferentemente al extremo N o C de la secuencia de aminoácidos de la proteína, directamente o a través de una molécula engarce.
- 45 Un engarce es cualquier unidad que conecta dos partes de una molécula, tales como dos ácidos nucleicos, dos péptidos o proteínas, una etiqueta y una proteína de interés, o un nucleótido, péptido o proteína y un portador. Se puede usar cualquier unidad conocida para este fin siempre que no interfiera con la función de la molécula. El engarce puede comprender nucleótidos cuando los miembros conectados son ácidos nucleicos, por ejemplo de 3 a 150 nucleótidos, o puede ser un aminoácido o una secuencia de aminoácidos que tiene de 2 a 50 aminoácidos, cuando al
- 50 menos una de las dos partes es un péptido o proteína, u otra molécula puente.
- Una variante de un péptido epítipo de la presente descripción es un péptido, que comprende al menos 8 aminoácidos y que en las posiciones 1, 4, 6 y 8 tiene los aminoácidos 1, 4, 6 y 8 de la SEC ID NO: 3, mientras que los aminoácidos restantes pueden ser aminoácidos de la SEC ID NO: 3 y al menos uno de ellos es otro aminoácido que, con respecto
- 55 al tamaño, polaridad y/o carga, es similar al aminoácido "original" de la SEQ ID NO: 3. En otras palabras, el término "variante" tal como se usa en esta descripción se refiere a una secuencia que deriva o corresponde a la SEC ID NO: 3 en la que al menos el 12,5% y hasta el 25 o 37,5 o 50% de los aminoácidos tienen sustituciones, tales como sustituciones conservativas. Por ejemplo, una lisina también puede sustituirse por una serina sin cambiar la función del péptido. Una variante de la presente divulgación puede ser un péptido epítipo como se ha definido anteriormente
- 60 en el que 4 de 8 aminoácidos de la secuencia de SEQ ID NO: 3 pueden sustituirse sin cambiar sustancialmente la función del péptido. En los ejemplos se ha demostrado que es activa una variante de un péptido epítipo de la presente divulgación que tiene 8 restos de aminoácidos que comprenden 3 sustituciones conservativas, obteniéndose como resultado una variante sustituida de forma conservativa en un 37,5%.

- 65 Que la etiqueta de epítipo de la presente invención se encuentre en el extremo C o N significa que ningún otro resto

de aminoácido derivado de la secuencia del polipéptido de interés precede a la secuencia de la etiqueta de epítipo en el extremo N o sigue a la secuencia de la etiqueta de epítipo en el extremo C. Sin embargo, pueden seguir o preceder a la etiqueta C- o N-terminal de la presente invención secuencias no derivadas de la secuencia original del polipéptido de interés, tales como etiquetas adicionales o secuencias engarceas.

5

Los términos "purificación" o "purificar", cuando se usen en la presente solicitud, se referirán a cualquier tipo de separación física de una entidad química o bioquímica de interés de un material, tal como un material bioquímico. Un ejemplo es la purificación de un polipéptido a partir de una masa bioquímica como un tejido o caldo. Las entidades purificadas también pueden denominarse aislados. La purificación de proteínas o polipéptidos puede comprender un paso o una serie de pasos destinados a aislar o enriquecer en una o algunas proteínas una muestra. La purificación es vital para la caracterización de la función, estructura e interacciones de la proteína de interés. La purificación puede comprender separar proteínas de partes no proteicas de una muestra o separar una proteína deseada de otras proteínas. El resultado de la purificación puede ser una proteína aislada o una muestra enriquecida en el polipéptido. En la presente solicitud, el término "purificación" abarca todos los tipos de separación y abarca tanto el aislamiento como el enriquecimiento.

El término "muestra" se refiere a una muestra o una cantidad que se utiliza para cualquier tipo de método de determinación o purificación. La muestra comprende una etiqueta y/o proteína de interés y puede ser un líquido o un sólido. En el contexto de la presente invención, una muestra puede ser a menudo una mezcla compleja que comprende la proteína de interés, tal como una célula, un tejido o lisado celular. Una muestra también puede ser un sobrenadante obtenido por centrifugación de un líquido que comprende una célula, donde la célula es capaz de secretar la proteína de interés en el líquido. Una muestra también puede ser una muestra de cualquier tipo de fluido corporal tal como sangre, orina, líquido, sudor, lágrimas, etc.

La expresión "compañero de unión secundario" se refiere a compuestos que pueden unirse específica o inespecíficamente a un polipéptido etiquetado, un ligando de afinidad específico de epítipo tal como un anticuerpo o un complejo formado por ambos como un compañero de unión primario, directamente o a través de una unidad provista en el polipéptido o el ligando de afinidad tal como un anticuerpo. Un ejemplo para un par de unión es una parte constante de un anticuerpo específico de epítipo y un anticuerpo específico de Fc. Otro ejemplo para un par de unión es un resto de biotina presente en el polipéptido marcado o el anticuerpo específico del epítipo y una estreptavidina. Otro ejemplo como compañero de unión secundario es un anticuerpo contra el complejo. El compañero de unión secundario puede usarse para aislar el complejo y/o para detectar el complejo. Para este propósito, el compañero de unión secundario puede llevar grupos inmovilizables, grupos detectables, etc.

35 Descripción de la presente invención

La presente invención se refiere a una secuencia peptídica de epítipo, que se define en las reivindicaciones.

Sorprendentemente, se ha observado que una secuencia peptídica que comprende al menos los ocho aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 (RKA AVSHW) o variantes de los mismos son útiles como etiqueta de epítipo. Esta secuencia de aminoácidos es suficiente para una unión específica ya que la afinidad de su anticuerpo al epítipo es lo suficientemente alta como para garantizar una interacción específica y confiable con la etiqueta. Asimismo, se ha observado que un sistema para captura y/o detección basado en el péptido epítipo de la presente invención tiene propiedades muy deseables. Por ejemplo, se ha demostrado que las proteínas marcadas con epítipo se unen a un anticuerpo específico de epítipo con una K_D de $\sim 1,4$ nM, que se traduce en una afinidad de ~ 10 a 100 veces mayor en comparación con los sistemas disponibles en la técnica anterior, tales como FLAG, HA, c-myc o los sistemas EPEA derivados de nanoanticuerpos. El péptido epítipo de la presente invención es muy versátil; se puede usar como etiqueta C-terminal o N-terminal y muestra una fuerte unión al anticuerpo correspondiente en condiciones suaves o rigurosas. Se pueden usar una o más etiquetas, que pueden ser iguales o diferentes siempre que al menos una de las etiquetas sea una etiqueta de epítipo de la presente invención, y que pueden estar localizadas en diferentes extremos del polipéptido o que pueden estar dispuestas en forma de tándem o en cualquier otro orden. En particular, el sistema para la detección y/o captura de la presente invención muestra una afinidad y una eficacia de unión inusualmente fuertes debido a sus características de unión específicas.

Además, sorprendentemente, se ha descubierto que solo cuatro aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 (R en la posición 1, A en la posición 4, S en la posición 6 y W en la posición 8 con referencia a los restos de aminoácidos en la SEQ ID NO: 3) son esenciales para la unión específica de un anticuerpo específico de etiqueta y que las demás posiciones pueden sustituirse, por ejemplo, por otro aminoácido que, con respecto al tamaño, polaridad y/o carga, sea similar al aminoácido "original", y preferentemente esté sustituido de forma conservativa, sin afectar significativamente de forma negativa a la especificidad y afinidad de unión. Se ha observado que una etiqueta de epítipo que comprende sustituciones, preferentemente conservativas, en hasta un 50% de los aminoácidos comprendidos en el polipéptido como se define en la SEC ID NO: 4 sigue asegurando una interacción eficaz y fiable del anticuerpo específico de etiqueta con las proteínas etiquetadas. También se ha observado que péptidos que tienen aminoácidos adicionales en uno o ambos extremos proporcionan una interacción eficaz y fiable con un anticuerpo específico de etiqueta. Como ejemplo, se usó una etiqueta modificada o un péptido epítipo que tenía la secuencia de aminoácidos

PVRSALSQWSS (SEQ ID NO: 5) para purificar eficazmente la proteína GFP etiquetada (véase la **Fig. 11**). Otros ejemplos de una etiqueta modificada o un péptido epítipo tienen una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID NO: 33 (PDRVRAVSHWSS), o una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID NO: 34 (ADRVRAVSHWSS).

5 Se ha observado que la etiqueta de epítipo de la presente invención puede comprender aminoácidos adicionales que flanquean la secuencia central de la etiqueta. Aunque podrían usarse secuencias de etiqueta con una longitud de más de 25 aminoácidos, es beneficioso proporcionar una etiqueta pequeña para minimizar la interferencia de la etiqueta con la localización subcelular, el plegamiento o la función de los polipéptidos o proteínas fusionadas con la etiqueta;
10 por lo tanto, el péptido epítipo de la presente invención que comprende la etiqueta no debe comprender más de 25 aminoácidos.

En una realización preferida, el péptido epítipo de la presente invención tiene, preferentemente consiste en, de 12 a 25 aminoácidos, en donde la secuencia de aminoácidos comprende una secuencia como se define en la SEQ ID NO:
15 32 ($X_1X_2RX_4X_5AX_7SX_9WX_{11}X_{12}$),
en donde X_1 puede ser P o A;
en donde X_2 puede ser D o una sustitución conservativa de D;
en donde X_4 puede ser K o una sustitución;
en donde X_5 puede ser A o R, o una sustitución conservativa de A o R;
20 en donde X_7 puede ser V o una sustitución conservativa de V;
en donde X_9 puede ser H o una sustitución conservativa de H; y
en donde X_{11} y X_{12} pueden ser Q o una sustitución conservativa de Q;
en donde el péptido epítipo aislado no comprende una secuencia de aminoácidos como la definida por la SEQ ID NO:
3 (RKA AVSHW).

25 En una realización preferida, X_4 puede ser una sustitución conservativa de K o serina.

Una "sustitución conservativa" se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro, en donde el reemplazo produce como resultado una alteración silenciosa. Esto significa que uno o más restos de aminoácidos dentro de la secuencia peptídica del epítipo de la presente invención pueden estar sustituidos por otro aminoácido de una polaridad similar que actúa como un equivalente funcional. Los sustitutos de un aminoácido dentro de la secuencia pueden seleccionarse de entre otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido (es decir, una sustitución conservativa). Por ejemplo, un aminoácido polar puede sustituirse por otro aminoácido polar, un aminoácido cargado positiva o negativamente, respectivamente, puede sustituirse por otro aminoácido cargado positiva o negativamente,
35 respectivamente, etcétera. Son clases de aminoácidos, por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) que incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; aminoácidos neutros polares que incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; aminoácidos cargados positivamente (básicos) que incluyen arginina, lisina e histidina; aminoácidos cargados negativamente (ácidos) que incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

40 El péptido epítipo de la presente invención se proporciona en forma aislada, lo que significa que no está comprendido dentro del cuerpo de un animal o un ser humano. El péptido epítipo puede proporcionarse como péptido aislado o puede usarse en una forma conjugada, enlazada, unida o conectada, como en una proteína de fusión en la que al menos un epítipo está fusionado con un polipéptido, en particular una proteína o polipéptido de interés, o en una
45 construcción que comprende al menos un epítipo de la presente invención y un polipéptido, opcionalmente enlazado o conectado por un engarce, espaciador u otro miembro de conexión. El engarce, espaciador u otro miembro de conexión puede ser cualquier secuencia conocida en la técnica. Puede ser, por ejemplo, una secuencia que proporciona un sitio de escisión o simplemente puede ser un espaciador, es decir, un miembro que ajusta la distancia entre el epítipo y el polipéptido, o un miembro de conexión que contribuye a una función deseable.

50 Sorprendentemente se ha observado que este péptido epítipo se puede usar de manera eficaz y fiable como una etiqueta de epítipo, que puede interactuar de manera específica y eficaz con un anticuerpo específico de etiqueta.

El "etiquetado de epítipos" es una técnica en la que un epítipo conocido se fusiona con un polipéptido, tal como una proteína recombinante, por ejemplo mediante ingeniería genética. Se puede usar una etiqueta de epítipo en
55 combinación con un anticuerpo específico para esta etiqueta de epítipo para detectar polipéptidos tales como proteínas de interés. Para ser útil como etiqueta de epítipo, un péptido debe proporcionar una región para la unión selectiva de un anticuerpo específico, la región de la etiqueta debe estar disponible para la unión aunque la etiqueta esté unida o fusionada con un polipéptido, y debe evitarse en la medida de lo posible la unión inespecífica. La unión
60 entre la etiqueta de epítipo y el anticuerpo correspondiente debe ser fuerte, fiable y selectiva. Al elegir una combinación adecuada de una etiqueta de epítipo y un anticuerpo correspondiente, la técnica permite detectar proteínas para las que no hay anticuerpos disponibles. Esto es especialmente útil para la caracterización de proteínas recientemente descubiertas y proteínas de baja inmunogenicidad. La presente invención proporciona un sistema que comprende un par de un epítipo y un anticuerpo, que se puede usar para varias aplicaciones experimentales, tales
65 como análisis de transferencia de Western, inmunoprecipitación, inmuno(histo)química, estudios de

inmunofluorescencia, estudios de interacción proteína-proteína, ELISA y purificación por afinidad.

A pesar de derivar de una proteína endógena, la β -catenina, se ha observado que, sorprendentemente, las proteínas fusionadas con la etiqueta de la presente invención se detectan de manera específica y fiable con un anticuerpo específico de etiqueta sin influencia significativa de ninguna interacción del anticuerpo con la proteína endógena. Sin apearse a esta teoría, se contempla que esto se debe a que la β -catenina endógena es parte de un complejo proteico que forma las llamadas uniones adherentes y, por lo tanto, no está disponible para una interacción eficaz con el anticuerpo específico de la etiqueta. Asimismo, se ha observado que el anticuerpo específico de etiqueta BC2-Nb tiene una mayor afinidad por la etiqueta de epítipo (1,4 nM) en comparación con la afinidad del BC2-Nb por la β -catenina endógena (3,7 nM), lo que sugiere que la unión del anticuerpo a los polipéptidos etiquetados está favorecida con respecto a la unión del anticuerpo a la β -catenina endógena.

Se pueden detectar polipéptidos, tales como polipéptidos o proteínas de interés, que se han fusionado o están unidos o están conectados con la etiqueta de epítipo de la presente invención, de forma específica y fiable usando un anticuerpo específico de etiqueta, por ejemplo, como se describe a continuación en detalle. Los polipéptidos etiquetados también pueden purificarse de manera específica, eficaz y fiable mediante un ensayo de captura basado en inmutafinidad.

Un aspecto adicional de la presente invención es una construcción que consiste en un polipéptido y al menos un péptido epítipo como se ha definido anteriormente en el extremo N o C del polipéptido. El término "construcción que consiste en un polipéptido y al menos un péptido epítipo" se refiere a un polipéptido de origen no natural, que también se puede denominar "proteína de fusión". El polipéptido comprendido en la construcción puede comprender al menos una proteína de interés y opcionalmente una secuencia de enlace; también puede comprender secuencias funcionales adicionales y/o etiquetas adicionales. La construcción puede tener una o más etiquetas de epítipo de la presente invención. Si la construcción incluye más de una etiqueta, estas se pueden disponer en tándem, puede ser consecutivas, pueden estar separadas o pueden estar en extremos opuestos. La construcción además puede comprender otras etiquetas, que pueden estar en cualquier posición útil.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica el péptido epítipo de la presente invención. El ácido nucleico puede ser ARN, ADN, APN o LNA (siglas en inglés de ácido nucleico bloqueado).

Las construcciones de ácido nucleico de la presente invención comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un péptido epítipo de la presente invención. Estas construcciones de ácido nucleico pueden ser de origen procarriota o eucariota, tal como de origen bacteriano, de mamífero, de levadura, fúngico, de nematodo, de peces, de aves, viral o de insecto. Opcionalmente, la construcción de ácido nucleico de la presente invención también comprende la secuencia de ácido nucleico del polipéptido a etiquetar, tal como la proteína de interés. La secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido epítipo de la presente invención puede estar cadena abajo y/o cadena arriba de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido a etiquetar dando como resultado un polipéptido etiquetado en el extremo C y/o N. Sorprendentemente, se ha observado que el péptido epítipo de la presente invención se puede usar tanto en el extremo C como en el extremo N. Esto permite un uso muy versátil del péptido epítipo o del ácido nucleico que lo codifica, respectivamente. La construcción de la presente invención puede comprender un ácido nucleico que codifica un péptido epítipo o más copias del péptido epítipo, tal como dos o tres copias. En caso de más de una copia, esta puede estar adyacente a la etiqueta terminal o las etiquetas pueden estar en los extremos N y C, respectivamente.

La construcción de la presente invención también puede ser una construcción de expresión de ácido nucleico, y comprende al menos un ácido nucleico que codifica una etiqueta de epítipo y al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido a etiquetar, en donde ambos se pueden colocar directamente adyacentes entre sí, o pueden estar separados por una secuencia engarce de una longitud apropiada, tal como aproximadamente 3-150 nucleobases. También se pueden incluir otras secuencias funcionales. Por ejemplo, el engarce puede comprender un sitio de reconocimiento para una endonucleasa o una secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio de reconocimiento para una proteasa. Son ejemplos de proteasas la proteasa TEV, trombina, proteasa del factor Xa o una proteasa PreScission.

La construcción de ácido nucleico o la construcción de expresión de ácido nucleico de la presente invención puede comprender además secuencias de ácido nucleico, que codifican otras etiquetas, tales como una etiqueta HIS.

La construcción de ácido nucleico o la construcción de expresión de ácido nucleico de la presente invención puede comprender una secuencia de ácido nucleico, que codifica más de una etiqueta, por ejemplo una etiqueta en tándem. Una etiqueta en tándem es la combinación de dos etiquetas en secuencia. Una etiqueta en tándem puede comprender al menos dos copias de la etiqueta de epítipo de la presente invención, o al menos una etiqueta de epítipo de la presente invención y al menos otra etiqueta. La construcción también puede comprender varias etiquetas iguales o diferentes si es apropiado.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico

o las construcciones de expresión de ácido nucleico de la presente invención. La "célula hospedadora" es una célula que comprende las secuencias de ácido nucleico que codifican la etiqueta de epítipo de la presente invención. La célula hospedadora puede ser un transfectante estable o puede transfectarse de forma transitoria con la construcción de ácido nucleico que comprende las secuencias de ácido nucleico que codifican la etiqueta de epítipo.

5

La célula hospedadora puede ser una célula procariota o eucariota. Por ejemplo, la célula hospedadora puede ser una célula bacteriana, de levadura, de insecto, de mamífero, vegetal, fúngica, de nematodo, de peces o aviar. La célula puede ser una célula primaria o una línea celular. La célula hospedadora puede ser una célula individual o puede ser una célula que forma parte de un tejido.

10

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para introducir el ácido nucleico o la construcción de expresión de ácido nucleico de la invención en una célula hospedadora. La introducción tiene como resultado que el ácido nucleico que codifica al menos una etiqueta de epítipo de la presente invención se conecte a un ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido de interés en la célula hospedadora. Por lo tanto, la célula hospedadora comprende el ácido nucleico que codifica al menos una etiqueta de epítipo de la invención y, tras la expresión, comprenderá la etiqueta de epítipo de la presente invención.

15

El método para introducir el ácido nucleico en el hospedador puede ser cualquier método conocido en la técnica para este propósito, en particular, el método puede seleccionarse del grupo que comprende la edición del genoma con CRISPR/Cas, métodos de edición del genoma utilizando nucleasas de dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras de actividad similar a activadores de la transcripción (TALEN) o meganucleasas, métodos basados en reactivos que utilizan reactivos tales como lípidos catiónicos, fosfato de calcio o DEAE-dextrano, transducción, transfección y métodos basados en instrumentos tales como la electroporación, microinyección y laserfección.

20

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso del péptido epítipo de la presente invención como una etiqueta de epítipo N-terminal o C-terminal. Las células hospedadoras que comprenden el ácido nucleico que codifica la etiqueta de epítipo de la presente invención, expresarán un polipéptido, tal como un polipéptido/proteína de interés, que está enlazado o fusionado con la etiqueta de epítipo. Dependiendo de la secuencia de la construcción de expresión de ácido nucleico y/o del método de introducción del ácido nucleico que codifica la etiqueta de epítipo, la introducción en el hospedador dará como resultado un polipéptido etiquetado en el extremo N o C. Se prefieren las etiquetas C-terminales o N-terminales a las etiquetas internas, ya que las etiquetas terminales serán más fácilmente accesibles para la interacción con un anticuerpo específico de etiqueta. Sin embargo, el péptido epítipo de la presente invención también se puede usar como una etiqueta interna, siempre que la proteína etiquetada de interés presente una conformación en la que la etiqueta interna esté accesible para la interacción con un compañero de unión. Por ejemplo, la proteína de interés puede presentar estructuras de bucle, en donde la etiqueta interna forma parte de la secuencia que forma la estructura de bucle. En este caso, la etiqueta interna estará accesible para la interacción con los compañeros de unión.

25

30

De acuerdo con la presente solicitud, la expresión "ligando de afinidad" se refiere a moléculas que son capaces de unirse con una afinidad muy alta a un resto específico para el mismo o a un anticuerpo generado contra el mismo. Los ejemplos incluyen biotina (ligando)-estreptavidina (resto), digoxigenina (ligando)-anticuerpo anti-DIG y otros anticuerpos específicos de etiqueta. Un "anticuerpo" de acuerdo con la presente invención comprende anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, particularmente anticuerpos policlonales mono-específicos (es decir, anticuerpos con diferentes regiones variables, que, sin embargo, reconocen la etiqueta específica de epítipo de la presente invención), anticuerpos quiméricos, así como un fragmento o variante de los tipos de anticuerpos enumerados anteriormente. El término "anticuerpo" en el presente documento comprende además anticuerpos manipulados genéticamente y, en una realización preferida, el término "anticuerpo" se refiere a los anticuerpos de cadena pesada tal como se encuentran en la familia *Camelidae*, tal como en camellos o llamas. Los elementos de unión de estos anticuerpos consisten en un solo dominio de polipéptido, concretamente la región variable del polipéptido de cadena pesada (VHH). Estos anticuerpos carecen naturalmente de cadenas ligeras, formando el dominio variable de la cadena pesada el sitio completo de unión al antígeno. Por el contrario, los anticuerpos convencionales tienen elementos de unión que comprenden dos dominios de polipéptido (las regiones variables de la cadena pesada (VH) y la cadena ligera (VL)). La falta de dependencia de la interacción con un dominio variable de cadena ligera para mantener la integridad estructural y funcional proporciona a estos dominios VHH una ventaja sustancial sobre otros fragmentos de anticuerpos pequeños, en términos de facilidad de producción y comportamiento en solución. En particular, los fragmentos de VHH son los tipos preferidos de moléculas para la purificación por inmunoafinidad debido a su estabilidad inusual y su capacidad para replegarse eficazmente después de la desnaturalización completa, que tiene lugar con frecuencia durante la elución del antígeno. Los anticuerpos VHH también se denominan anticuerpos de dominio único o anticuerpos de cadena sencilla. Los fragmentos de anticuerpos VHH también se denominan "nanoanticuerpos". Los fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica, y cualquier fragmento que tenga actividad de unión al epítipo puede usarse como "anticuerpo" en los sistemas o para la interacción de la presente invención.

35

40

45

50

55

60

65

El término "anticuerpo", en el significado de la presente invención, típicamente se refiere a anticuerpos de longitud completa y a fragmentos de anticuerpos de los anticuerpos mencionados anteriormente, así como a las variantes que

se definen a continuación. Los anticuerpos que no contienen todos los dominios o regiones de un anticuerpo de longitud completa, son fragmentos de anticuerpos dentro del significado de la presente invención. Por tanto, el término "anticuerpo" abarcará cualquier tipo de anticuerpo, fragmentos y variantes de los mismos, y mezclas de anticuerpos, fragmentos y/o variantes.

5

Se puede usar cualquier anticuerpo que tenga afinidad por y sea específico para el péptido epítipo de la presente invención y proporcione una elevada avidéz o afinidad. Puede ser un anticuerpo convencional o un anticuerpo de cadena pesada, o un fragmento de un anticuerpo convencional o de un anticuerpo de camélido, también puede ser una mezcla de anticuerpos, fragmentos y/o variantes. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos preferidos derivan de anticuerpos de cadena pesada, tales como anticuerpos de camélidos y fragmentos de anticuerpos de camélidos, que se denominan nanoanticuerpos o Nb.

10

Todos los anticuerpos mencionados anteriormente pueden estar presentes en forma unida o soluble y pueden comprender un resto detectable, o "marcador" (por ejemplo, marcadores de fluorescencia, isótopos radiactivos, marcador de oro coloidal, enzimas acopladas, etc.), y/o pueden portar un péptido, grupo o engarce para inmovilización en una fase sólida. El término "unido" se refiere tanto a anticuerpos unidos a la membrana como a anticuerpos inmovilizados en un soporte sólido o material de vehículo. El término "soluble" en el contexto de los anticuerpos se refiere a anticuerpos que no están unidos a una membrana o soporte sólido, como es bien sabido por un experto.

15

Una realización adicional de la presente invención es una construcción que consiste en un polipéptido y al menos un péptido epítipo en su extremo N o C como se ha definido anteriormente y en las reivindicaciones. El polipéptido puede ser cualquier polipéptido como se ha indicado anteriormente y puede comprender, por ejemplo, al menos una proteína de interés y opcionalmente secuencias funcionales adicionales, por ejemplo más etiquetas. La construcción puede incluir una o más etiquetas de epítipo, como se ha explicado anteriormente.

20

Esta construcción o polipéptido etiquetado puede capturarse y/o detectarse midiendo la interacción de un ligando de afinidad específico de etiqueta, tal como un anticuerpo específico de etiqueta, que puede comprender un resto detectable y/o puede estar unido o unirse a un soporte sólido, con el polipéptido etiquetado. La construcción o polipéptido etiquetado de interés puede capturarse con un ligando de afinidad específico de etiqueta, tal como un anticuerpo específico de etiqueta para purificación o enriquecimiento, y el polipéptido etiquetado opcionalmente puede detectarse y/o cuantificarse posteriormente por medios conocidos, tal como un ligando de detección secundario, que comprende preferentemente un resto detectable, tal como una etiqueta fluorescente, e interactúa con el polipéptido de interés o, preferentemente, con un ligando de afinidad específico de etiqueta, tal como un anticuerpo específico de etiqueta.

25

30

Para la detección, el polipéptido etiquetado y/o el ligando de afinidad específico de la etiqueta, tal como el anticuerpo específico puede comprender un resto detectable o un resto que permite introducir un resto detectable o un resto que produce algún tipo de señal. Los restos detectables y los métodos para detectar y/o cuantificar un resto/señal son bien conocidos en la técnica. También es posible enriquecer el polipéptido de interés y posteriormente analizar los compañeros de unión, la cantidad y otras propiedades de interés del polipéptido etiquetado.

35

40

Por lo tanto, la presente invención, en una realización preferida, está dirigida a un método para la detección y/o captura, por ejemplo, un método para purificar un polipéptido mediante captura y/o un método para detectar un polipéptido mediante captura y/o medición de una señal detectable, o mediante enriquecimiento en un polipéptido y análisis del polipéptido en la composición obtenida.

45

El método de detección de la presente invención es adecuado para determinar la presencia, localización subcelular y/o cantidad de un polipéptido que comprende el péptido epítipo o la etiqueta de epítipo de la presente invención, y es preferentemente un método *in vitro*.

50

El polipéptido o proteína etiquetada a detectar, localizada y/o cuantificada se puede detectar en su localización intracelular en una célula hospedadora, por ejemplo en el núcleo celular, en membranas celulares o en otro compartimento celular. El polipéptido o la proteína etiquetada a detectar y/o cuantificar también se puede detectar en una solución que comprende el polipéptido o la proteína etiquetada, por ejemplo, un lisado celular obtenido de una célula hospedadora o un tejido que comprende la célula hospedadora.

55

En un primer paso de un método de detección, un ligando de afinidad, tal como un anticuerpo que se une específicamente al péptido epítipo de la presente invención se administra a una muestra que comprende el polipéptido o proteína etiquetada. La muestra puede ser una célula hospedadora, un tejido, una solución que comprende el lisado celular de una célula hospedadora o cualquier otra muestra que comprende el polipéptido etiquetado, tal como un sobrenadante, tal como se obtiene después de la centrifugación de un líquido que comprende la célula hospedadora, en donde la célula hospedadora es capaz de secretar el polipéptido de interés en el líquido u otra muestra como un fluido corporal.

60

Este paso de administración se lleva a cabo en condiciones que permiten la interacción específica del ligando de

65

afinidad, tal como un anticuerpo y su etiqueta de epítipo. Dichas condiciones son bien conocidas por el experto en la materia. Los pasos de lavado típicamente siguen a la administración de un anticuerpo a su antígeno, y la persona experta sabe cómo y cuándo aplicar dichos pasos de lavado.

- 5 En una realización, el polipéptido o proteína etiquetada se detecta, se cuantifica y/o se localiza detectando la interacción del ligando de afinidad, tal como un anticuerpo y su etiqueta de epítipo. La detección se puede hacer como se conoce en la técnica. En una realización, al menos uno de los dos compañeros de interacción, generalmente el ligando de afinidad específico de la etiqueta de epítipo, tal como un anticuerpo, comprende un resto detectable.
- 10 Tras la administración a la muestra, tal como una célula hospedadora o solución que comprende lisado celular o sobrenadante celular, el ligando de afinidad, tal como un anticuerpo, interaccionará específicamente con la proteína etiquetada. Esta interacción se puede detectar, supervisar y cuantificar midiendo u observando la señal informadora obtenida del resto detectable. Por ejemplo, si el resto detectable es un marcador fluorescente, se puede medir y observar la fluorescencia tras la excitación.
- 15 En otra realización, el método de detección se lleva a cabo utilizando:
- un ligando de afinidad específico de epítipo, tal como un anticuerpo, que en esta realización no necesita comprender un resto detectable;
- 20 al menos un compañero de unión secundario, que puede unirse al ligando de afinidad específico de epítipo, tal como un anticuerpo, la proteína etiquetada, o al complejo construido por ambos. El compañero de unión secundario puede comprender un resto detectable y/o puede ser inmovilizable.
- 25 En un primer paso, un ligando de afinidad específico de epítipo, tal como un anticuerpo se administra a una muestra, tal como una célula hospedadora o una solución que comprende un lisado de la célula hospedadora como se ha desvelado anteriormente. En un segundo paso, se puede administrar un compañero de unión secundario a la muestra, tal como la célula hospedadora o una solución que comprende un lisado de la célula hospedadora que comprende el polipéptido etiquetado o la proteína unida al ligando de afinidad específico de epítipo, tal como un anticuerpo.
- 30 La presencia, la cantidad y/o la localización del polipéptido o proteína etiquetada puede detectarse o determinarse midiendo u observando una señal informadora obtenida de un resto detectable comprendido en el compañero de unión secundario.
- 35 La ventaja de un método de detección de dos pasos que utiliza dos tipos de compañeros de unión es que la interacción específica de la etiqueta se separa del paso de detección real. Esto permite que el ligando de afinidad específica de etiqueta, tal como un anticuerpo, permanezca sin cambios, ya que no necesita comprender un resto detectable. Esto podría mejorar su especificidad o afinidad en comparación con un ligando de afinidad específico de etiqueta, tal como un anticuerpo, que comprende un resto detectable, ya que el resto detectable podría influir en la interacción de la
- 40 etiqueta y su ligando de afinidad, tal como su anticuerpo. Por tanto, también podrían mejorarse la fiabilidad y la eficacia del método de detección. Asimismo, usando el ligando de afinidad específico de etiqueta, tal como el anticuerpo, simplemente como un ligando de afinidad de captura, tal como un anticuerpo de captura y no como un ligando de captura y detección, tal como un anticuerpo de captura y detección, es posible la separación de los pasos de captura y detección si solo se va a determinar la presencia y la cantidad de la proteína o polipéptido etiquetado. Por lo tanto,
- 45 el primer paso que usa el ligando de afinidad específico de etiqueta, tal como el anticuerpo específico de etiqueta, podría ir seguido de un paso de aislamiento o enriquecimiento, que produce la proteína o polipéptido etiquetado de interés capturado. Los pasos de aislamiento o purificación se analizarán más adelante en esta solicitud. Entonces, el paso de detección podría llevarse a cabo en la proteína etiquetada aislada y/o enriquecida, conduciendo a una mayor fiabilidad de la cuantificación obtenida y un manejo más fácil del paso de detección.
- 50 Los métodos de detección biofísicos o biomoleculares adecuados para detectar cualitativamente la interacción etiqueta de epítipo/anticuerpo comprenden cualquier método adecuado conocido en la técnica. Dichos métodos incluyen, sin estar limitados a ellos, métodos aplicados para ensayos cualitativos o cuantitativos, por ejemplo, para el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayo ELISPOT, transferencia de Western o inmunoensayos. Dichos
- 55 métodos comprenden, por ejemplo, métodos ópticos, radiactivos o cromatográficos, preferentemente cuando se usa cualquiera de los marcadores, señalizadores o engarces anteriores, más preferentemente métodos de detección de fluorescencia, métodos de detección de radiactividad,
- tinción con azul de Coomassie, tinción con plata u otros métodos de tinción de proteínas, métodos de microscopía
- 60 electrónica, métodos para teñir secciones de tejido por inmunohistoquímica o por inmunofluorescencia directa o indirecta, etc. Dichos métodos pueden aplicarse con el anticuerpo o pueden implicar el uso de herramientas adicionales, por ejemplo, el uso de un compañero de unión secundario, que se une específicamente a una parte del polipéptido etiquetado, el anticuerpo o el complejo.
- 65 Dependiendo del tamaño del anticuerpo usado, también se puede determinar la localización subcelular del polipéptido

o proteína etiquetada de interés. Por ejemplo, si el anticuerpo de detección es lo suficientemente pequeño, se pueden visualizar y supervisar distintas estructuras subcelulares tales como la red filamentosa intermedia o una parte esencial de la maquinaria de replicación.

5 En este aspecto de la presente invención, el anticuerpo de detección es preferentemente un nanoanticuerpo, porque los nanoanticuerpos pueden interactuar con proteínas en localizaciones subcelulares, tales como estructuras profundamente incluidas en cromatina, debido a su tamaño reducido en comparación con los anticuerpos convencionales. Debido a la ausencia de la cadena ligera variable, los nanoanticuerpos solo poseen tres bucles hipervariables (regiones determinantes de complementariedad, CDR) en comparación con las seis CDR presentes en
 10 los anticuerpos convencionales. Las tres CDR están flanqueadas por 4 regiones marco (FR). Para compensar la pérdida de CDR, Los Nb presentan características distintivas con respecto a su estructura de CDR y modo de unión al antígeno. Para proporcionar una superficie de interacción con el antígeno suficientemente grande de 600 - 800 Å [1], la mayoría de los nanoanticuerpos presentan bucles de CDR3 sustancialmente alargados [2]. En algunos casos, la mayor flexibilidad de tales bucles largos se contrarresta sujetándolos al núcleo de Nb con un enlace disulfuro
 15 adicional [3].

Por lo tanto, un nanoanticuerpo típico se puede representar esquemáticamente como una secuencia de aminoácidos que comprende las siguientes regiones:

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

20 Un anticuerpo particularmente preferido es el nanoanticuerpo BC2 (BC2-Nb) que muestra propiedades favorables como una afinidad muy alta, fuerte unión y versatilidad. El BC2-Nb comprende la región variable de un anticuerpo de cadena pesada de *Camelidae* compuesto por la región marco 1, la CDR1, la región marco 2, la CDR2, la región marco 3, la CDR3 y la región marco 4, como se define por la siguiente secuencia de aminoácidos (122 aa):

25 QVQLVESGGGLVQPGGSLTAS**GFTLDHYD**IGWFRQAPGKEREGVSC**INNSDD**
TYYADSVKGRFTIFMDNAKDTVYLQMN**SLK**PEDTAI**YYCAE****ARGCKRGRY**E**DFW**GQGTQ VTVSS (SEQ ID NO: 6; las letras en negrita designan las CDR)

Tabla 1: Regiones de la secuencia de aminoácidos que definen BC2-Nb:

Región	Secuencia	Posición
FR1	QVQLVESGGGLVQPGGSLTAS (SEQ ID NO: 7)	1-25
CDR1	GFTLDHYD (SEQ ID NO: 8)	26-33
FR2	IGWFRQAPGKEREGVSC (SEQ ID NO: 9)	34-50
CDR2	INNSDDTY (SEQ ID NO: 10)	51-59
FR3	YADSVKGRFTIFMDNAKDTVYLQMN SLK PEDTAI YYCAE (SEQ ID NO: 11)	60-98
CDR3	ARGCKRGRY E DFW (SEQ ID NO: 12)	99-112
FR4	GQGTQ TVSS (SEQ ID NO: 13)	113-122

30 Se ha observado que principalmente la CDR3 es responsable de la fuerte unión del péptido epítipo de la presente invención. Otra parte importante de la secuencia de aminoácidos de BC2-Nb es la cisteína (en la posición 50 de la SEQ ID NO: 6) presente en FR2. Esta cisteína forma un puente disulfuro con la cisteína de CDR3 y, por lo tanto, es responsable del plegamiento correcto de la CDR3. Por lo tanto, cualquier nanoanticuerpo que comprenda como CDR3
 35 la secuencia de CDR3 de BC2, y que comprenda una cisteína en la región marco 2 que es capaz de formar un puente disulfuro con la cisteína de la CDR3, es adecuado como compañero de la interacción etiqueta de epítipo/nanoanticuerpo. En una realización preferida, hay aproximadamente 45 a 55, por ejemplo, aproximadamente 50 o 51 restos de aminoácidos entre la cisteína en FR2 y la cisteína en CDR3. En el caso del BC2-Nb, la cisteína de FR2 está en la posición 50 y la cisteína en CDR3 está en la posición 102 (los indicadores de posición se refieren a la
 40 posición en la SEQ ID NO: 6 como se ha mostrado anteriormente). Por lo tanto, hay 51 restos de aminoácidos localizados entre la cisteína en la región marco 2 y la cisteína en la CDR3.

El nanoanticuerpo BC2-Nb o una variante funcional del mismo que comprende al menos CDR3 de BC2-Nb y una cisteína en FR2 también es un compañero de interacción preferido con la etiqueta de epítipo de la presente invención
 45 en todos los métodos divulgados de purificación y/o detección y los usos divulgados en esta solicitud, ya que se ha demostrado que es un compañero de unión muy fiable y eficaz de los polipéptidos etiquetados con epítipo de interés. BC2-Nb y sus variantes funcionales también son un componente preferido de los kits desvelados en esta solicitud. Una realización preferida de la presente invención es también el uso del BC2-Nb o una variante funcional del mismo para detectar, cuantificar, determinar la localización subcelular de, o purificar un polipéptido que comprende la etiqueta
 50 de epítipo de la presente invención.

Una variante funcional de BC2-Nb es cualquier anticuerpo o fragmento que tenga una afinidad por la etiqueta de epítipo de la presente invención que sea al menos un 80%, más preferentemente al menos un 90% o al menos un 95% o incluso un 99% o mayor que la de BC2-Nb. La afinidad de una variante y de BC2-Nb se puede medir como se conoce en la técnica y los resultados se pueden comparar como es conocido por el experto en la materia y por ensayos bien conocidos, por ejemplo por resonancia de plasmón superficial (SPR) o por otros ensayos de supervisión de interacciones proteína-proteína.

La presente invención, en una realización preferida, está dirigida a un método de purificación, o un método de captura y purificación. El método de purificación se puede utilizar en métodos analíticos, semi-preparativos y preparativos.

Por tanto, un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para purificar un polipéptido, tal como una proteína de interés que comprende al menos una etiqueta de epítipo de la presente invención.

En este aspecto, el método comprende un paso de captura de poner en contacto una muestra, por ejemplo una solución, que comprende un polipéptido etiquetado, con un ligando de afinidad, tal como un anticuerpo capaz de unirse específicamente a la etiqueta de epítipo de la presente invención. El ligando de afinidad que se une específicamente al péptido epítipo de la presente invención es preferentemente un anticuerpo y, más preferentemente, el nanoanticuerpo BC2-Nb o una variante del mismo como se ha definido anteriormente.

La muestra a poner en contacto con el anticuerpo específico de etiqueta puede ser cualquier tipo de muestra que comprenda un polipéptido etiquetado y puede procesarse para separar el polipéptido. Preferentemente, la muestra es una solución, por ejemplo, un lisado de una célula hospedadora o un fluido corporal, que comprende el polipéptido etiquetado, o un sobrenadante, tal como un sobrenadante que puede obtenerse por centrifugación de un líquido que comprende una célula hospedadora que comprende la construcción o el polipéptido etiquetado, en donde la célula hospedadora es capaz de secretar o de transportar de otro modo el polipéptido etiquetado al líquido.

Un anticuerpo, un fragmento o una variante usada en el método de la presente invención para purificar un polipéptido, por ejemplo una proteína de interés, se puede utilizar en solución o inmovilizado. Para inmovilizar un ligando de afinidad tal como un anticuerpo contra la etiqueta de epítipo de la presente invención o un fragmento o variante del mismo, el ligando de afinidad tal como el anticuerpo, fragmento o variante, o una mezcla de los mismos, puede unirse a un portador de muestras, soporte sólido o matriz. Este paso de inmovilización puede tener lugar antes o después de la unión del ligando de afinidad tal como el anticuerpo a la etiqueta de epítipo. Los métodos para inmovilizar ligandos de afinidad tales como anticuerpos y partes de los mismos son bien conocidos por el experto en la materia y se puede usar cualquier método que permita la inmovilización sin perjudicar a las propiedades de unión.

Si el ligando de afinidad, tal como el anticuerpo capaz de unirse específicamente al péptido epítipo de la presente invención, no está inmovilizado en un soporte sólido, entonces el método opcionalmente puede comprender un paso adicional para aislar el complejo, por ejemplo, utilizando un compañero de unión para el complejo, tal como un anticuerpo secundario que es específico, por ejemplo, para el complejo o (en caso de que el anticuerpo específico de epítipo sea un anticuerpo IgG) para la parte constante del anticuerpo. El compañero de unión secundario puede estar en solución o puede estar inmovilizado o ser inmovilizable en un soporte sólido.

La expresión "soporte sólido" o "matriz" en el contexto de la presente invención se referirá a cualquier tipo de material portador que pueda usarse para la inmovilización de ligandos de afinidad tales como anticuerpos o partes de los mismos y puede referirse a un material en forma de partículas (por ejemplo, microesferas o gránulos, generalmente utilizados en columnas de extracción) o en forma de lámina (por ejemplo, membranas o filtros, portaobjetos de vidrio o plástico, placas de ensayo de microtitulación, tiras reactivas, dispositivos de llenado capilar o similares) que pueden ser fibras o tubos planos, plegados o huecos. Son matrices adecuadas y bien conocidas, sin ser exhaustivas; la sílice (sílice amorfa porosa), soportes de agarosa o poli(acrilamida) o polímeros macroporosos. Los ejemplos incluyen dextrano, colágeno, poliestireno, polipropileno, cloruro de polivinilo, poli(acrilamida), metacrilato, celulosas, alginato cálcico, vidrio de poro controlado, aluminio, titanio y cerámica porosa, polímeros y copolímeros sintéticos, látex, sílice, agarosa, metal, vidrio y carbono. Como alternativa, la superficie sólida puede comprender parte de un sensor dependiente de masa, por ejemplo, un detector de resonancia de plasmón superficial. Convenientemente, se proporciona una matriz que comprende una pluralidad de ligandos de afinidad individuales tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, que son capaces de unirse específicamente a la etiqueta de epítipo de la presente invención, unidos o inmovilizados en una superficie sólida. Esta matriz se puede usar para capturar polipéptidos etiquetados comprendidos en una solución en cuanto la solución se pone en contacto con el ligando de afinidad inmovilizado, tal como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

En otro paso que sigue al paso de captura, el soporte sólido que comprende el ligando de afinidad específico de etiqueta inmovilizado unido al polipéptido etiquetado se lava opcionalmente para eliminar los constituyentes no unidos y unidos de manera inespecífica. El complejo inmovilizado de ligando y polipéptido se puede usar de esta forma.

Opcionalmente, en un paso adicional, el polipéptido etiquetado puede eluirse para obtener el polipéptido aislado, tal como la proteína de interés. La elución de la proteína etiquetada unida al anticuerpo inmovilizado se puede lograr

mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la proteína etiquetada puede eluirse mediante elución competitiva con el péptido epítipo aislado de la presente invención. Este péptido epítipo aislado estará entonces en competencia con el polipéptido etiquetado para unirse al anticuerpo específico de etiqueta inmovilizado. Si el polipéptido aislado se añade a una concentración en exceso, el equilibrio de reacción de la unión se desplazará hacia la unión del anticuerpo inmovilizado con la etiqueta de epítipo aislada. Esto da como resultado la liberación del polipéptido etiquetado. Se pueden añadir opcionalmente pasos adicionales para purificar aún más el polipéptido liberado, tales como pasos del método bien conocidos por la persona experta.

El polipéptido etiquetado también puede permanecer inmovilizado en el soporte sólido, tal como microesferas, y procesarse adicionalmente en aplicaciones posteriores tales como espectrometría de masas, sin el paso de elución.

En otra realización preferida, una proteína etiquetada, por ejemplo, un polipéptido etiquetado que comprende un engarce con un sitio de escisión, puede escindirse con un medio apropiado, por ejemplo una proteasa, para eliminar la etiqueta, de este modo, el polipéptido se libera del anticuerpo inmovilizado, y el polipéptido se puede obtener en su forma nativa. Para esta realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido no solo debe comprender una secuencia que codifique la etiqueta de epítipo, sino también una secuencia que codifique un engarce con un sitio rompible, por ejemplo, un sitio de escisión reconocido por una proteasa. El paso de liberación por escisión enzimática puede reemplazar o seguir al paso de elución.

La presente invención también comprende kits que comprenden los componentes necesarios para llevar a cabo los métodos de la presente invención.

En una realización, se proporciona un kit para la captura y/o detección de polipéptidos etiquetados.

El kit de la presente invención adecuado para llevar a cabo un método de captura y/o detección de la presente invención comprende los siguientes componentes:

- un ácido nucleico o una construcción de expresión de ácido nucleico que codifica el péptido epítipo de la presente invención;
- un ligando de afinidad tal como un anticuerpo capaz de unirse específicamente al péptido epítipo de la presente invención;
- opcionalmente un resto detectable; y
- tampones y reactivos necesarios para los métodos de captura y/o detección de la presente invención.

El ácido nucleico o la construcción de expresión de ácido nucleico que codifica el péptido epítipo de la presente invención se debe introducir en una célula hospedadora como se ha descrito anteriormente, y como es conocido por la persona experta. A este respecto, el kit también puede comprender los tampones y reactivos necesarios para introducir el ácido nucleico o la construcción de expresión de ácido nucleico que codifica el péptido epítipo de la presente invención en una célula hospedadora.

El ligando de afinidad capaz de unirse específicamente al péptido epítipo de la presente invención es preferentemente un anticuerpo, y aún más preferentemente el nanoanticuerpo BC2-Nb o una variante del mismo como se ha definido anteriormente.

El ligando de afinidad capaz de unirse específicamente al péptido epítipo de la presente invención, tal como un anticuerpo, puede comprender al menos un resto detectable. El kit también puede comprender al menos un compañero de unión secundario, que puede unirse a una unidad provista en el complejo o uno de sus componentes, tal como avidina o estreptavidina si el complejo o uno de sus componentes está biotinilado, o anticuerpos secundarios y terciarios para capturar el complejo construido a partir del polipéptido etiquetado y el ligando de afinidad, tal como un anticuerpo, estos anticuerpos adicionales son, por ejemplo, específicos para otras partes del polipéptido o el ligando de afinidad específico de epítipo, tal como un anticuerpo, o para unidades proporcionadas en el polipéptido, el ligando de afinidad tal como un anticuerpo o el complejo, tal como la parte constante del ligando de afinidad o anticuerpo primario capaz de unirse específicamente al péptido epítipo de la presente invención. Los anticuerpos adicionales también pueden comprender un resto detectable.

Los ligandos de afinidad tales como los anticuerpos definidos en esta solicitud son particularmente útiles para detectar, capturar y/o purificar un polipéptido que comprende el péptido epítipo de la presente invención. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es el uso de un ligando de afinidad específico de epítipo tal como un anticuerpo como se define en el presente documento, en particular un nanoanticuerpo para detectar, capturar y/o purificar un polipéptido que comprende el péptido epítipo de la presente invención.

El kit puede comprender además un soporte sólido que comprende el ligando de afinidad tal como un anticuerpo que se une específicamente al péptido epítipo de la presente invención inmovilizado o adherido al soporte sólido.

El resto detectable puede ser cualquier resto detectable como se ha definido anteriormente. Preferentemente, el resto

detectable es un marcador fluorescente.

En una realización adicional, se proporciona un kit para la captura y purificación de polipéptidos etiquetados.

5 El kit para la purificación de polipéptidos etiquetados comprende los siguientes componentes.

- un ácido nucleico o una construcción de expresión de ácido nucleico que codifica el péptido epítipo de la presente invención;
- 10 - un ligando de afinidad, tal como un anticuerpo, capaz de unirse específicamente al péptido epítipo de la presente invención;
- opcionalmente un soporte sólido; y
- tampones y reactivos necesarios para los métodos de captura y purificación de la presente invención.

15 El ácido nucleico o la construcción de expresión de ácido nucleico que codifica el péptido epítipo de la presente invención se debe introducir en una célula hospedadora como se ha descrito anteriormente, y como es conocido por la persona experta. A este respecto, el kit también puede comprender los tampones y reactivos necesarios para introducir el ácido nucleico o la construcción de expresión de ácido nucleico que codifica el péptido epítipo de la presente invención en una célula hospedadora.

20 El ligando de afinidad, tal como un anticuerpo capaz de unirse específicamente al péptido epítipo de la presente invención, es preferentemente el nanoanticuerpo BC2-Nb o una variante del mismo como se ha definido anteriormente.

25 El ligando de afinidad, tal como un anticuerpo capaz de unirse específicamente al péptido epítipo de la presente invención, puede estar en solución o inmovilizado o adherido a un soporte sólido. El kit también puede comprender otros compañeros de unión como se ha indicado anteriormente. El compañero de unión adicional también puede comprender un resto detectable.

30 El soporte sólido puede ser cualquier soporte sólido como se ha definido anteriormente, y el experto en la materia puede elegir una forma adecuada de inmovilización o adhesión del ligando de afinidad, tal como un anticuerpo, al soporte sólido.

35 El kit también puede comprender reactivos adecuados para liberar el polipéptido etiquetado capturado del ligando de afinidad, tal como un anticuerpo capaz de unirse específicamente al péptido epítipo de la presente invención. Por tanto, el kit puede comprender, por ejemplo, el péptido epítipo aislado de la presente invención. También puede comprender una enzima, que es capaz de liberar el polipéptido etiquetado capturado del ligando de afinidad, tal como un anticuerpo capaz de unirse específicamente al péptido epítipo de la presente invención mediante la escisión de la etiqueta del polipéptido. Por ejemplo, la enzima puede ser una proteasa tal como la proteasa TEV, trombina, proteasa del factor Xa o una proteasa PreScission.

40 Ejemplos

En los siguientes ejemplos se presentan realizaciones preferidas de la invención.

45 Ejemplo 1: Visión general

Se generó un nanotrap de BC2 mediante el acoplamiento covalente de BC2-Nb monovalente a matrices sólidas. Esto sirve como un reactivo de *pulldown* altamente eficaz similar al nanotrap GFP descrito anteriormente [4] que se usa ampliamente para purificar complejos etiquetados con GFP de lisados celulares [5]. Las excelentes características de unión del nanotrap de BC2 son favorables para el análisis proteómico aplicando, por ejemplo, condiciones de unión 50 altamente competitivas utilizando agentes caotrópicos (urea hasta 4 M o GdmCl 1,5 M) o detergentes desnaturizantes (SDS al 2%) en la reacción de unión [6]. En contraste con el nanotrap GFP donde las proteínas unidas se liberan solo en condiciones desnaturizantes, las proteínas unidas al nanotrap de BC2 se pueden eluir en una conformación funcional simplemente por competición peptídica usando bajas cantidades de péptido-BC2 (0,1 - 1 mM). La clonación posicional reveló que la etiqueta BC2 localizada en el extremo N o C se reconoce igualmente bien 55 por el nanotrap de BC2. En el caso de GFP con etiqueta N-terminal se observó una banda adicional en la fracción no unida. Esto indica que la etiqueta BC2 podría eliminarse proteolíticamente tras la lisis celular, un fenómeno que ya se ha descrito para otras etiquetas de epítopos en sistemas de expresión de mamíferos [7].

60 El sistema de captura y detección basado en BC2 descrito en este estudio es una alternativa atractiva a los sistemas de etiqueta de epítipo disponibles actualmente. Los solicitantes de la presente invención han demostrado que el BC2-Nb se une a proteínas con etiqueta de epítipo BC2 con una K_D de $\sim 1,4$ nM y, por lo tanto, muestra una afinidad de - 10 a 100 veces mayor en comparación con los sistemas FLAG, HA, c-myc o los sistemas EPEA derivados de nanoanticuerpos [8-10].

65 Recientemente, se generaron nanoanticuerpos contra β -catenina que reconocían diferentes epítopos dentro de la

secuencia de aminoácidos de la β -catenina. Estos anticuerpos se utilizaron para supervisar la β -catenina endógena dentro de las células [11]. Uno de estos Nb, denominado BC2-Nb, reconoce un epítipo lineal corto correspondiente a los aa 16-27 de la β -catenina.

5 En el presente documento, se proporciona un análisis estructural y bioquímico detallado del BC2-Nb y sus interacciones con el epítipo peptídico, denominado en lo sucesivo etiqueta BC2 (BC2T). Los datos revelan un mecanismo de unión inusual mediado por la CDR3 extendida y el marco de BC2-Nb, que se denomina "unión de bloqueo de cabeza". Basándose en las propiedades de unión de alta afinidad de BC2-Nb, se desarrolló y caracterizó un nuevo sistema de purificación y detección de la etiqueta BC2. Se demuestra que el BC2-Nb inmovilizado captura y
10 purifica eficazmente proteínas etiquetadas con BC2 de extractos de células bacterianas y de mamífero en un estado plegado de forma nativa. Mediante análisis de colocalización, por primera vez se pudo demostrar la detección de proteínas celulares etiquetadas con péptido usando un nanoanticuerpo marcado con fluorescencia. Este sistema versátil de captura y detección ahora permite una combinación única de análisis bioquímicos y microscópicos de una gran diversidad de proteínas que comprenden esta pequeña etiqueta peptídica inerte.

15 Se generó un nanoanticuerpo que une un péptido lineal corto con una afinidad muy alta ($K_D \sim 1,4$ nM). El análisis de la estructura del complejo BC2-Nb/péptido-BC2 reveló un modo de unión inusual en el que el péptido BC2 forma una cadena p antiparalela adicional que se inserta en una estructura de lámina β formada por la CDR3 y las regiones marco. Numerosos enlaces de hidrógeno de la cadena principal proporcionan afinidad, y un puente de sal entre la
20 Arg106 de la CDR3 y la Glu44 de FR2 estabiliza al péptido unido de forma similar a un bloqueo de tipo "bloqueo de cabeza". Una comparación con todos los complejos de nanoanticuerpos disponibles en el Protein Data Bank (PDB) muestra que tal modo de unión no se ha observado previamente en ninguno de los 81 complejos cristalizados conocidos. Las mediciones de afinidad de BC2-Nb con mutación del motivo de bloqueo de cabeza muestran afinidades de unión reducidas ~ 10 veces y tasas de desactivación más altas. Estos datos sugieren claramente que la función
25 principal del bloqueo de cabeza es la fijación del péptido ya unido al nanoanticuerpo.

El análisis de epítopos utilizando bibliotecas de péptidos de exploración posicional reveló un pequeño conjunto de cuatro restos determinantes de especificidad, siendo el más crítico W10. En contraposición, los otros restos no contribuyen a la especificidad de unión, principalmente porque no están involucrados en contactos. La dependencia
30 de muchas interacciones de la cadena principal para generar afinidad y solo cuatro cadenas laterales de aminoácidos para la especificidad hace que el sistema BC2T/BC2-Nb sea especialmente versátil. La mayoría de los restos de BC2T se pueden reemplazar sin sacrificar la eficacia de unión, y esto permite una adaptación directa de la etiqueta para aplicaciones individuales, incluyendo modificaciones de carga, adición de restos de triptófano para aumentar la absorbancia a 280 nm o introducción de un sitio de escisión de proteasa o incluso un aminoácido inusual para fines
35 de marcaje.

Finalmente, un estudio demuestra que el BC2-Nb ofrece nuevas oportunidades para la obtención de imágenes celulares. Básicamente, los nanoanticuerpos pueden modificarse fácilmente mediante marcaje dirigido a un sitio con la gama completa de colorantes orgánicos disponibles y aplicarse para obtener imágenes directas de las estructuras
40 celulares sin la necesidad de un anticuerpo secundario para la detección. Recientemente, se demostró que los nanoanticuerpos específicos de GFP y RFP marcados con colorantes orgánicos compatibles con microscopía de localización fotoactivada (PALM) tales como AlexaFluor 647 (AF647) visualizan eficazmente proteínas de fusión fluorescentes en microscopía de alta resolución. Todavía existe una demanda continua de nanoanticuerpos que reconozcan un epítipo más pequeño para minimizar los impedimentos estéricos o los posibles errores de enlace
45 asociados con etiquetas grandes tales como GFP o RFP. En este estudio se demostró por primera vez que un nanoanticuerpo específico de péptido marcado con fluorescencia se puede utilizar para la visualización de distintas estructuras subcelulares, tales como la red filamentosa intermedia o una parte esencial de la maquinaria de replicación. Basándose en estos hallazgos, los inventores propusieron que un sistema de detección mediado por BC2 proporciona ventajas únicas en comparación con los enfoques disponibles actualmente. En primer lugar, debido a su pequeño
50 tamaño (12 aa, 1,4 kDa), la etiqueta BC2 no interfiere con la localización subcelular o el plegamiento de proteínas expresadas ectópicamente. En segundo lugar, el uso de un nanoanticuerpo pequeño (2 x 4 nm) enlaza directamente la señal de detección con el antígeno correspondiente. En tercer lugar, el nanoanticuerpo BC2 se puede modificar fácilmente, por ejemplo, para el marcaje dirigido a un sitio con colorantes compatibles de alta resolución apropiados. En resumen, el marcaje mediado por nanoanticuerpos de construcciones etiquetadas con BC2 ahora combina una
55 etiqueta mínima de epítipo con el alto el rendimiento de fotones de colorantes orgánicos y un error mínimo de enlace.

Ejemplo 2: Base estructural de la unión del epítipo

Como la mayoría de los Nb descritos tienen epítopos conformacionales, se investigó el mecanismo molecular
60 subyacente a la unión de alta afinidad observada resolviendo estructuras cristalinas de alta resolución de BC2-Nb solo (a una resolución de 1.8 Å) y en complejo con BC2T (1.0 Å). A partir de aquí, los aminoácidos de BC2T se mencionarán en código de una letra y los aminoácidos de BC2-Nb en código de tres letras para facilitar la presentación y análisis de los resultados. Las posiciones de aminoácidos se refieren a las posiciones de restos de aminoácidos en la etiqueta de epítipo que consta de 12 aminoácidos, como se define en la SEQ ID NO: 4 (PDRKAA VSHWQQ).

65

El BC2-Nb adopta el típico pliegue de inmunoglobulina, que consiste en nueve cadenas β que forman dos láminas β conectadas por bucles y por un enlace disulfuro conservado entre Cys22 y Cys96 (**Fig. 5 a**). De forma similar a otras estructuras de nanoanticuerpos, BC2-Nb presenta una CDR3 especialmente larga, que contiene 14 aminoácidos y se estabiliza mediante un enlace disulfuro adicional formado entre la Cys102 (localizada en la CDR3) y la Cys50 (localizada en la región marco 2 (FR2)) (**Fig. 5 a**). El BC2T se une a BC2-Nb en una conformación alargada, insertándose en una ranura entre la CDR3 y la FR2 y FR3 de BC2-Nb. El péptido se integra en la estructura BC2-Nb, formando una cadena en una lámina β (**Fig. 1 a**). Esto produce una gran cantidad de enlaces de hidrógeno en la cadena principal que anclan el péptido a elementos de estructura secundaria vecinos. Notablemente, ni la CDR1 ni la CDR2 participan en la interacción con BC2T (**Fig. 1 a, tabla 2 a continuación**).

10

Tabla 2

	BC2-Nb	Complejo BC2-Nb-BC2T*
Recogida de datos		
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	C2 (5)
Dimensiones de la celda		
<i>a, b, c</i> (Å)	31,77, 47,74, 67,97	106,01, 31,53, 35,88
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 107,54, 90
Resolución (Å)	39,07-1,80 (1,85-1,80)	50,55-1,00 (1,03-1,00)
<i>R</i> _{medición} (%)	8,8 (94,6)	6,4 (99,7)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	13,06 (1,45)	18,42 (2,05)
CC _{1/2} (%)	99,8 (52,0)	100 (52,4)
Complejitud (%)	99,6 (99,6)	99,6 (98,1)
Redundancia	14,4 (3,6)	9,5 (8,0)
Wilson B (Å ²)	27,7	11,5
Refinado		
Resolución (Å)	39,07-1,80	50,55-1,00
N.º de reflejos	70062	580345
<i>R</i> _{trabajo} / <i>R</i> _{libre} (%)	19,1 / 21,7	12,8 / 14,9
N.º de átomos		
BC2-Nb	902	1037
BC2T	-	115
Agua	36	134
MPD	8	-

(continuación)

Recogida de datos		
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	C2 (5)
	BC2-Nb	Complejo BC2-Nb-BC2T*
factores- <i>B</i> (Å ²)		
BC2-Nb	27,8	11,2
BC2T	-	14,3
Agua	32,6	24,3
MPD	38,6	-
Desviaciones R.m.s.		
Longitudes del enlace (Å)	0,011	0,020
Desviaciones R.m.s.		
Ángulos del enlace (°)	1,107	1,452

Las estructuras BC2-Nb no unidas y unidas son similares, y se pueden superponer con una pequeña desviación del valor cuadrático medio (RMSD) general de las posiciones atómicas 0,4 Å (comparación de estructura de Phenix). Los bucles de la CDR3 en particular tienen orientaciones similares, con la excepción de dos aminoácidos (Arg106 y Tyr107) que se giran casi 180 grados (**Fig. 5 b**). En el BC2-Nb sin ligando, el carbono β de la Arg106 está orientado hacia la estructura central del Nb, mientras que la cadena lateral de la Arg106 interacciona con el grupo carbonilo de la cadena principal de Glu108 y con el sistema de electrones π de Tyr109. El carbono β de Tyr107 apunta lejos del Nb y el anillo aromático está involucrado en una interacción catión-π con Arg45. En el complejo, los restos Arg106 y Tyr107 están girados, ya que sus carbonos β y sus cadenas laterales se enfrentan en direcciones opuestas. La Arg106 ahora está involucrada en una interacción mediada por carga con la cadena lateral de Glu44 situada en FR2 (**Fig. 1 b**). Esta interacción inusual, que los inventores denominan "bloqueo de cabeza", alcanza el péptido unido y lo bloquea firmemente en su sitio. Varias interacciones directas y mediadas por agua sujetan el péptido en su sitio de unión (**Fig. 1 c**). Sin embargo, solo un pequeño subconjunto de restos de BC2T está involucrado en estos contactos: R3 forma un puente de sal con Asp110, S8 participa en un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo de Lys103 y también forma un complejo de una molécula de agua junto con Tyr109, y W10 está enterrado en una bolsa hidrófoba donde forma tanto una interacción CH-π con Cys50 como un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo de Cys102 (se muestra una visión general completa de todas las interacciones **Fig. 6**).

Se investigó el impacto de mutaciones puntuales en las propiedades de unión del BC2-Nb. En primer lugar, el enlace disulfuro adicional que conecta CDR3 y FR2 se eliminó reemplazando la Cys50 por una alanina y la Cys102 por una serina (BC2-Nb_{C50A_C102S}). Los estudios de unión realizados utilizando GFP modificada que contiene BC2T como etiqueta peptídica C-terminal (GFP_{BC2T}) reveló que esta mutación conduce a la pérdida completa de la unión (datos no mostrados). La explicación más probable para este resultado es que se requiere el puente disulfuro para mantener la estructura de la CDR3, que aporta la mayoría de los contactos con BC2T. A continuación, se analizó la contribución del motivo de "bloqueo de cabeza" a la unión. La Arg106 se reemplazó por una serina (BC2-Nb_{R106S}) o un glutamato (BC2-Nb_{R106E}) y las mediciones de resonancia de plasmón superficial (SPR) se realizaron usando la construcción GFP_{BC2T}. Ambas proteínas mutantes producen valores de K_D de ~ 11 nM, que son aproximadamente 10 veces más bajos en comparación con BC2-Nb (K_D : 1,4 nM) (**Tabla 3** a continuación, **Fig. 7**). Curiosamente, las proteínas wt (de tipo silvestre) y mutantes mostraron tasas de activación similares, mientras que se observaron tasas de desactivación significativamente más altas en ambos mutantes (**Tabla 3**). En resumen, los modestos cambios en las afinidades son coherentes con el análisis estructural. Las trece interacciones de la cadena principal del péptido extendido contribuyen claramente a la alta afinidad de la interacción. El "bloqueo de cabeza" probablemente ayuda a asegurar el péptido unido, como se indica por la menor tasa de disociación de la proteína wt.

35

Tabla 3

Nbs	R _{máx} [UR]	K _d [nM]	kon [M ⁻¹ s ⁻¹]	k _{off} [s ⁻¹]	χ ²
BC2-Nb	170 ± 0,34	1,4 ± 0,06	4,6 ± 0,04 × 10 ⁵	6,4 ± 0,27 × 10 ⁻⁴	3,5
BC2-Nb _{R106E}	160 ± 0,48	12,0 ± 0,15	2,8 ± 0,01 × 10 ⁵	3,4 ± 0,04 × 10 ⁻³	3,8
BC2-Nb _{R106S}	160 ± 0,43	9,7 ± 0,13	3,3 ± 0,03 × 10 ⁵	3,2 ± 0,03 × 10 ⁻³	3,1

Ejemplo 3: Análisis detallado del epítipo utilizando bibliotecas de péptidos de exploración posicional sintéticos

Aunque la unión de alta afinidad y la cinética se pueden explicar por las características estructurales observadas, la especificidad de la formación del complejo debe estar en otra parte. Como solo un subconjunto de restos de BC2T están involucrados en contactos mediados por cadenas laterales con el Nb, se examinaron las contribuciones de estos aminoácidos individuales para la unión usando bibliotecas de péptidos de exploración posicional. En total, se usaron 12 bibliotecas de BC2T diferentes que muestran los 20 aminoácidos proteínogénicos en una sola posición del péptido en experimentos de inmunoprecipitación. Las bibliotecas de BC2T se sometieron a cromatografía líquida seguida de análisis de espectrometría de masas antes y después de la inmunoprecipitación con BC2-Nb inmovilizado, BC2-Nb_{R106S} o BC2-Nb_{R106E}. Mediante la determinación de los péptidos que quedan en la fracción no unida después del pulldown, la composición de péptidos no unidos y, en consecuencia, se mapearon las posiciones de aminoácidos invariables (**Tabla 4, a continuación**). Los péptidos precipitados específicamente se identificaron mediante un análisis comparativo de los péptidos en el sobrenadante de BC2-Nb o mutantes de los mismos y el sobrenadante de un Nb de control no relacionado con BC2T (Nb específico de GFP). La comparación directa con el GFP-Nb hizo posible determinar el grado cuantitativo de captura de péptidos sin la necesidad de patrones marcados. Por tanto, si ningún péptido fuera capturado por el BC2-Nb, la proporción dada en la **Figura 2** sería uno o cerca de uno. Cuanto más péptido se capture, más se aproxima el valor a 0. No fue posible discriminar entre las versiones de péptidos de isoleucina (I) y leucina (L) ya que estos péptidos son isobáricos. Sin embargo, pudieron resolverse dos versiones de péptidos que contenían I / l y, por lo tanto, se proporcionan dos valores como resultado.

El análisis muestra que los restos de BC2T en las posiciones 1, 2, 4, 5, 7, 9, 11 y 12 de la SEQ ID NO: 4 pueden reemplazarse sin afectar a las propiedades de unión del epítipo (**Tabla 4, a continuación**). Estos resultados están de acuerdo con la estructura, lo que demuestra que las cadenas laterales de los ocho restos se encuentran alejadas del Nb. Sin embargo, el análisis de los sobrenadantes de las bibliotecas de BC2T R3, A6, S8 y W10 revelaron poca reactividad cruzada de los nanoanticuerpos con otros aminoácidos en estas posiciones (**Figura 2 a - d**). Notablemente, los péptidos unidos de la biblioteca de BC2T R3 (BC2T_{R3X}) tienen restos con propiedades básicas, es decir, K3 o H3 o restos que comprenden cadenas laterales más pequeñas, es decir, T3 o V3 (**Fig. 2 a**). Esta observación está de acuerdo con la estructura cristalina, ya que el puente de sal entre R3 y Asp110 también podría estar formado por H3 o K3. El análisis de la biblioteca de BC2T_{A6X} reveló las preferencias de BC2-Nb por aminoácidos pequeños en la posición 6, ya que se sacaron eficazmente de la biblioteca permutantes de cisteína, valina y serina. Los péptidos que contenían glicina, leucina o isoleucina en esta posición se sacaron en cantidades más pequeñas (**Fig. 2 b**). Estos resultados son coherentes con la estructura cristalina, donde la cadena lateral de A6 apunta hacia una pequeña bolsa hidrófoba del BC2-Nb. La unión de aminoácidos más grandes (es decir, leucina, isoleucina) requeriría reorganizaciones conformacionales, y una glicina introduciría flexibilidad adicional. Se observó un efecto similar para la biblioteca de BC2T_{S8X}. La alanina, cisteína, treonina y valina pueden reemplazar a S8, mientras que otros restos fueron capturados en menor grado (**Fig. 2 c**). El grupo hidroxilo de S8 forma un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo de Lys103 del nanoanticuerpo. La cisteína y la treonina podrían participar en algunas interacciones productivas similares, mientras que la valina al menos podría acomodarse. El triptófano en la posición 10 parece ser un aminoácido que determina la especificidad invariable en nuestro estudio de exploración de péptidos, ya que ninguno de los permutantes W10 fueron capturados por BC2-Nb (**Fig. 2 d**). Esto coincide de manera excelente con el análisis estructural, lo que demuestra que la cadena lateral de W10 se inserta en una profunda bolsa hidrófoba en el nanoanticuerpo.

Los resultados de la exploración del epítipo para los mutantes BC2-Nb_{R106S} y BC2-Nb_{R106E} son casi idénticos a los del BC2-Nb, con una notable excepción. El análisis de la biblioteca de BC2T_{A6X} reveló que, en contraste con BC2-Nb, los Nb mutados precipitaron en pequeña medida también variantes de BC2T que portaban una lisina o arginina en la posición 6 (**Fig. 2 b**). Esta observación sugiere que la mutación de la Arg45 que forma el bloqueo de cabeza por Ser o Glu da como resultado una especificidad de péptido algo menor. En resumen, se identificaron cuatro posiciones en BC2T con variabilidad de aminoácidos limitada o nula. Los resultados están de acuerdo con la estructura, lo que demuestra que las cadenas laterales de R3, S8 y W10 están directamente involucradas en las interacciones de BC2-Nb, mientras que los permutantes de A6 probablemente están desfavorecidos estéricamente y pueden evitar la formación de la unión de bloqueo de cabeza. Considerado en conjunto, este análisis confirma que un pequeño subconjunto de interacciones de cadena lateral ayuda a determinar la especificidad de BC2-Nb por la secuencia de BC2T.

55

Tabla 4-1: BQ2-Nb (r: relación; e: error)

	P		D		R		K		A		A		V		S		H		W		Q		Q		
	relación	error																							
A	0,1	0,0	0,2	0,0	0,7	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	1,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0
G	0,4	0,0	0,3	0,0	0,9	0,1	0,6	0,0	0,3	0,1	0,7	0,1	0,7	0,1	0,5	0,2	0,4	0,0	1,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0
V	0,2	0,0	0,1	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	1,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
L11	0,4	0,1	0,1	0,0	0,5	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,7	0,0	0,1	0,0	0,4	0,1	0,3	0,0	1,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
L12	0,3	0,1	0,2	0,0	0,5	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,9	0,0	0,2	0,0	0,7	0,2	0,1	0,0	1,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
M	0,2	0,0	0,1	0,0	0,7	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	1,0	0,1	0,3	0,0	0,6	0,2	0,1	0,0	1,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
P	0,1	0,0	0,6	0,1	0,8	0,1	1,0	0,1	0,1	0,0	1,1	0,1	1,0	0,1	0,7	0,2	0,8	0,1	1,1	0,1	0,8	0,4	0,1	0,0	0,0
F	0,2	0,0	0,2	0,0	0,8	0,1	0,3	0,0	0,1	0,0	1,0	0,1	0,2	0,0	0,6	0,3	0,1	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0
W	0,1	0,0	0,2	0,0	0,8	0,1	0,3	0,0	0,0	0,0	1,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1
S	0,3	0,0	0,1	0,0	0,6	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	0,5	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	1,1	0,2	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
T	0,5	0,1	0,1	0,0	0,3	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	1,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
N	0,6	0,1	0,2	0,0	0,7	0,0	0,5	0,0	0,3	0,1	1,0	0,0	0,2	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	1,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1
Q	0,6	0,0	0,1	0,0	0,5	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	1,0	0,0	0,4	0,0	0,6	0,2	0,2	0,0	1,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
Y	0,1	0,0	0,1	0,0	0,7	0,1	0,2	0,0	0,1	0,0	1,0	0,0	0,1	0,0	0,7	0,2	0,1	0,0	1,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0
C(Abu)	0,1	0,0	0,1	0,0	0,5	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	1,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0
K	0,3	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,2	0,1	1,0	0,1	0,3	0,0	0,8	0,2	0,2	0,0	1,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R	0,2	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,2	0,2	1,1	0,1	0,2	0,0	0,5	0,3	0,1	0,0	1,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
H	0,3	0,1	0,1	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	1,1	0,1	0,3	0,0	0,7	0,2	0,2	0,0	1,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1
D	1,0	0,1	0,1	0,0	1,0	0,1	1,0	0,0	0,5	0,1	1,0	0,1	0,5	0,0	0,8	0,2	0,1	0,0	1,0	0,1	0,2	0,1	0,0	0,1	0,0
E	0,9	0,1	0,2	0,0	1,0	0,1	0,5	0,0	0,2	0,0	1,1	0,1	0,4	0,0	0,7	0,2	0,2	0,0	1,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,4	0,1

Tabla 4-2: BC2(N)per(α) (r: relación; e: error)

	P		D		R		K		A		A		V		S		H		W		Q		Q	
	Relación	error																						
A	0,3	0,0	0,4	0,1	0,9	0,1	0,6	0,0	0,4	0,0	0,2	0,0	0,7	0,0	0,1	0,0	0,5	0,0	1,0	0,1	0,4	0,1	0,4	0,1
G	0,6	0,1	0,5	0,1	1,0	0,1	0,9	0,1	0,5	0,0	0,9	0,1	0,8	0,0	0,9	0,1	0,6	0,0	1,1	0,2	0,5	0,0	0,4	0,1
V	0,4	0,0	0,2	0,0	0,7	0,1	0,2	0,0	0,2	0,0	0,6	0,0	0,3	0,0	0,3	0,0	0,6	0,0	1,0	0,1	0,2	0,0	0,2	0,1
III	0,7	0,1	0,2	0,0	0,9	0,1	0,4	0,1	0,2	0,0	0,8	0,1	0,3	0,0	0,6	0,0	0,5	0,0	1,1	0,1	0,2	0,0	0,2	0,1
II2	0,6	0,4	0,3	0,0	0,9	0,1	0,6	0,1	0,2	0,0	0,9	0,1	0,4	0,0	0,9	0,1	0,3	0,0	1,1	0,1	0,4	0,0	0,2	0,1
M	0,5	0,1	0,2	0,0	0,9	0,1	0,5	0,0	0,2	0,0	0,9	0,1	0,5	0,1	1,0	0,1	0,4	0,0	1,1	0,1	0,3	0,0	0,3	0,1
P	0,2	0,0	0,8	0,1	1,0	0,1	1,0	0,1	0,4	0,0	1,0	0,1	1,0	0,1	1,0	0,1	1,0	0,0	1,1	0,1	0,9	0,1	0,2	0,1
F	0,3	0,1	0,3	0,1	1,0	0,1	0,7	0,1	0,2	0,0	0,9	0,1	0,4	0,0	0,9	0,1	0,3	0,0	1,1	0,1	0,3	0,0	0,4	0,1
W	0,3	0,0	0,3	0,1	1,0	0,1	0,8	0,1	0,1	0,0	1,0	0,1	0,3	0,0	0,9	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,3	0,1
S	0,6	0,1	0,3	0,1	0,9	0,1	0,7	0,0	0,4	0,0	0,8	0,0	0,4	0,0	0,2	0,0	0,5	0,0	1,1	0,2	0,2	0,0	0,2	0,1
T	0,7	0,1	0,2	0,1	0,8	0,1	0,7	0,0	0,3	0,0	0,4	0,1	0,3	0,0	0,7	0,1	0,3	0,0	1,0	0,0	0,2	0,0	0,3	0,1
N	0,7	0,1	0,3	0,1	1,0	0,0	0,9	0,1	0,5	0,0	1,0	0,1	0,4	0,0	0,9	0,1	0,3	0,0	1,1	0,1	0,3	0,0	0,3	0,1
Q	0,7	0,1	0,2	0,0	0,9	0,1	0,4	0,0	0,3	0,0	0,9	0,1	0,5	0,0	0,9	0,0	0,4	0,0	1,1	0,2	0,3	0,0	0,2	0,1
Y	0,3	0,0	0,2	0,0	1,0	0,1	0,5	0,0	0,2	0,0	0,9	0,1	0,3	0,0	0,9	0,0	0,2	0,0	1,0	0,0	0,1	0,0	0,3	0,1
C-	0,3	0,0	0,3	0,1	0,9	0,2	0,3	0,0	0,3	0,0	0,3	0,0	0,3	0,1	0,1	0,0	0,5	0,0	1,0	0,1	0,3	0,0	0,2	0,1
K	0,5	0,1	0,2	0,1	0,5	0,1	0,2	0,0	0,2	0,0	0,8	0,1	0,3	0,0	0,9	0,1	0,3	0,0	1,1	0,1	0,3	0,0	0,1	0,0
R	0,4	0,1	0,2	0,0	0,7	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,7	0,1	0,2	0,0	0,9	0,1	0,2	0,0	1,1	0,2	0,2	0,0	0,1	0,0
H	0,6	0,1	0,2	0,0	0,7	0,1	0,3	0,0	0,3	0,0	0,9	0,1	0,4	0,0	0,9	0,1	0,3	0,0	1,1	0,1	0,2	0,0	0,3	0,1
D	0,8	0,1	0,3	0,1	1,0	0,0	1,0	0,0	0,9	0,1	1,0	0,1	0,9	0,1	0,9	0,1	0,5	0,0	1,0	0,1	0,2	0,0	0,3	0,1
E	0,8	0,1	0,4	0,1	1,0	0,0	0,9	0,0	0,7	0,0	1,0	0,1	0,8	0,0	1,0	0,1	0,6	0,1	1,1	0,0	0,5	0,0	0,9	0,1

Tabla 4-3: BC2-Nb(ries) (r: relación; e: error)

	P		D		R		K		A		A		V		S		H		W		Q		Q	
	Relación	error																						
A	0,2	0,0	0,2	0,1	1,0	0,1	0,4	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0	0,5	0,0	0,1	0,0	0,3	0,0	1,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,0
G	0,5	0,0	0,4	0,1	1,0	0,1	0,9	0,1	0,4	0,1	0,8	0,1	0,7	0,0	0,8	0,1	0,7	0,0	1,2	0,2	0,4	0,1	0,2	0,0
V	0,3	0,0	0,1	0,0	0,5	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,3	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0	0,5	0,0	1,0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0
L/H	0,6	0,1	0,1	0,0	0,9	0,2	0,3	0,1	0,1	0,0	0,7	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,4	0,0	1,0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0
L/Z	0,5	0,2	0,2	0,1	0,9	0,2	0,5	0,0	0,1	0,0	0,8	0,1	0,2	0,0	0,9	0,1	0,2	0,0	1,0	0,0	0,4	0,2	0,1	0,0
M	0,4	0,1	0,1	0,0	0,9	0,1	0,3	0,1	0,1	0,0	1,0	0,1	0,3	0,0	1,0	0,1	0,2	0,0	1,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,0
P	0,1	0,0	0,8	0,1	1,0	0,1	1,0	0,1	0,2	0,0	1,1	0,1	0,9	0,0	0,9	0,1	0,9	0,1	1,1	0,1	0,9	0,1	0,1	0,0
F	0,3	0,0	0,2	0,0	1,0	0,1	0,6	0,1	0,1	0,0	1,0	0,1	0,2	0,0	0,9	0,1	0,2	0,0	1,0	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1
W	0,2	0,0	0,1	0,0	1,1	0,2	0,7	0,1	0,0	0,0	1,0	0,1	0,2	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	1,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,0
S	0,4	0,0	0,2	0,0	0,8	0,1	0,6	0,1	0,2	0,0	0,6	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	0,4	0,0	1,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0
T	0,6	0,1	0,1	0,0	0,6	0,0	0,5	0,1	0,1	0,0	0,3	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,4	0,0	1,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0
N	0,7	0,1	0,2	0,1	0,9	0,0	0,8	0,1	0,3	0,1	1,0	0,1	0,4	0,0	0,5	0,1	0,2	0,0	1,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0
Q	0,6	0,1	0,1	0,0	0,8	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0	1,0	0,1	0,4	0,0	0,9	0,1	0,3	0,0	1,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0
Y	0,2	0,0	0,1	0,0	0,9	0,1	0,3	0,1	0,1	0,0	1,0	0,1	0,2	0,0	0,9	0,1	0,1	0,0	1,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0
C+	0,2	0,0	0,2	0,1	0,9	0,1	0,2	0,0	0,1	0,0	1,0	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	0,3	0,0	1,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0
K	0,3	0,1	0,1	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,9	0,1	0,1	0,0	0,9	0,1	0,2	0,0	1,3	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0
R	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,7	0,3	0,1	0,0	0,9	0,1	0,1	0,0	1,3	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0
H	0,4	0,0	0,1	0,0	0,5	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0	1,0	0,1	0,3	0,0	0,9	0,1	0,2	0,0	1,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,0
D	0,8	0,1	0,2	0,1	1,0	0,0	1,0	0,1	0,9	0,0	1,1	0,1	0,9	0,0	1,0	0,1	0,4	0,0	1,1	0,1	0,5	0,1	0,3	0,1
E	0,8	0,1	0,2	0,1	1,0	0,0	0,9	0,1	0,8	0,0	1,1	0,1	0,9	0,0	1,0	0,1	0,5	0,0	1,2	0,1	0,4	0,1	0,5	0,0

Ejemplo 4: Generación de un sistema de captura basado en BC2T

Basándose en el modo de unión de ligando inusual del BC2-Nb, se intentó desarrollar un sistema de afinidad basado en BC2T. Se acoplaron covalentemente BC2-Nb purificados a microesferas de Sepharose y se generó una matriz de afinidad que se denomina "nanotrap de BC2". En primer lugar, se probó la capacidad del nanotrap de BC2 para precipitar proteínas etiquetadas con BC2T directamente del lisado en bruto. Por lo tanto, Las fracciones de proteínas solubles de células *E. coli* que expresan GFP con etiqueta C-terminal (GFP_{BC2T}) o wtGFP (control) se incubaron con el nanotrap de BC2 y se analizaron las fracciones de entrada, no unidas y unidas mediante SDS-PAGE seguido de tinción con coomassie e inmunotransferencia (**Fig. 3 a**). Los datos obtenidos muestran que el nanotrap de BC2 precipita cuantitativamente GFP_{BC2T}. A continuación, se realizó la purificación de BC2T en presencia de varios detergentes no desnaturizantes (NP-40, Triton X100, CHAPS o Tween 20, 0,1 - 1% p/v) o concentraciones crecientes de sal (NaCl 0 - 500 mM, KCl 2 - 50 mM, MgCl₂ 2 - 20 mM). Ninguno de estos reactivos parecía tener un impacto en la eficacia de la unión (datos no mostrados). Adicionalmente, se probó la unión al antígeno en condiciones desnaturizantes aumentando las concentraciones de dodecil sulfato de sodio (SDS) o agentes caotrópicos (GdmCl; Urea) en el tampón de unión. Se observó que el nanotrap de BC2 precipita eficazmente su antígeno en presencia de SDS al 2%, Urea 4 M o una concentración de hasta 1,5 M de GdmCl (**Fig. 3 b**). Esto indica que el nanotrap de BC2 permanece funcionalmente activo en condiciones rigurosas.

Aunque en algunos casos estas condiciones rigurosas de unión y elución pueden ser favorables para obtener proteínas altamente puras, la mayor parte de la proteína unida presumiblemente se desnaturiza y no conserva la actividad biológica. Por tanto, se probaron condiciones de elución más suaves usando MgCl₂ (0,5 M - 4 M), tiocianato de sodio (NaSCN, 1 - 3 M) o liberación mediada por el pH (ácido; pH 1 - 2,5 o alcalino; pH 10 - 12). También se probó la liberación de GFP_{BC2T} unida mediante elución competitiva añadiendo concentraciones crecientes de péptido BC2 (PDRKAAVSHWQQ, 0,01 - 1 mM). La incubación con MgCl₂ no eluye GFP_{BC2T} (datos no mostrados), mientras que el tratamiento con altas concentraciones de NaSCN o elución ácida (pH 1,5) dio como resultado la liberación del 30% - 40% de la proteína unida (**Fig. 3 c, paneles superiores**). Por el contrario, la elución alcalina usando un pH más alto (pH 11 y 12) reveló una liberación más eficaz de 40 - 80%. Notablemente, la elución competitiva fue altamente eficaz, ya que se detectó un -60% y -80% de GFP_{BC2T} en las fracciones de elución después de la adición de péptido BC2 0,1 mM y 1 mM, respectivamente (**Fig. 3 c, panel inferior**). Además, mientras que la fluorescencia de GFP se vio afectada drásticamente tras el tratamiento con NaSCN o pH ácido, el pH alcalino o la elución de péptido produjo GFP totalmente fluorescente (**Fig. 8**). Estos resultados demuestran que el péptido BC2 puede desplazar eficazmente las proteínas unidas a BC2 en su estado plegado de forma nativa.

El sistema de captura BC2 se analizó adicionalmente para la purificación en un solo paso de proteínas recombinantes derivadas de células humanas. Específicamente, se investigó si la posición terminal de la etiqueta BC2 tiene un impacto en la unión. Con este fin, se expresó una GFP modificada que comprendía la etiqueta BC2 en el extremo N (BC2TeGFP) o C (eGFP_{BC2T}) en células 293T de riñón embrionario humano (HEK) usando eGFP sin etiqueta como control negativo. Dos días después de la transfección, se generaron fracciones de proteínas solubles y se sometieron a inmunoprecipitación usando el nanotrap de BC2. Se analizaron las fracciones de entrada, no unidas y unidas mediante SDS-PAGE seguido de tinción de Coomassie e inmunotransferencia (**Fig. 3 d**). Los resultados muestran que las construcciones de GFP etiquetadas con BC2 en los extremos N y C se precipitaron eficazmente por el nanotrap de BC2 mientras que no se detectó GFP en el control negativo. En la fracción no unida de BC2TeGFP apareció un fragmento de GFP ligeramente más pequeño. Dado que esta banda no aparece en la calle unida, se propone la hipótesis de que aparece debido a la eliminación mediada por proteasa de la etiqueta BC2 N-terminal durante el procedimiento de lisis celular.

A continuación, se probó si el nanotrap de BC2 puede precipitar componentes celulares etiquetados con BC2 de los filamentos intermedios o la maquinaria de replicación nuclear. BC2T se fusionó genéticamente con mCherry-vimentina (mCherry-VIM_{BC2T}) o eGFP-PCNA (eGFP-PCNA_{BC2T}) y ambas construcciones se expresaron en células HEK293T. Como controles, se utilizaron construcciones correspondientes sin la etiqueta BC2. Los extractos de proteínas solubles se incubaron con el nanotrap de BC2 y las fracciones de lisado completo (entrada), no unidas y unidas se analizaron por inmunotransferencia usando anticuerpos anti-vimentina o anti-PCNA. Los resultados demuestran que tanto mCherry-VIM_{BC2T} como eGFP-PCNA_{BC2T} precipitaron eficazmente con el nanotrap de BC2, mientras que no se detectó señal en las fracciones unidas de las proteínas no etiquetadas (**Fig. 9 a**). La siguiente pregunta era si el BC2-Nb también puede detectar proteínas etiquetadas con BC2 en la inmunotransferencia. Por tanto, se generaron BC2-Nb marcados con fluorescencia mediante el acoplamiento químico del nanoanticuerpo purificado al colorante orgánico AlexaFluor488 (BC2-Nb_{AF488}) y se utilizó para sondear inmunotransferencias con fracciones de proteínas solubles de células que expresaban eGFP-PCNA, eGFP-PCNA_{BC2T}, mCherry-VIM o mCherry-VIM_{BC2T}. Los resultados muestran que BC2-Nb_{AF488} es altamente específico para proteínas etiquetadas con BC2, mientras que no se detectaron proteínas sin etiquetar (**Fig. 9 b**). Finalmente, surgió la pregunta de si el BC2-Nb también reconoce la β -catenina endógena en presencia de proteínas etiquetadas con BC2. Aunque no se detectó señal para β -catenina en la transferencia de Western con BC2-Nb_{AF488} (**Fig. 9 b**), se encontraron cantidades minoritarias de β -catenina en comparación con las proteínas marcadas con BC2 sobreexpresadas en las fracciones unidas después de la precipitación con el nanotrap de BC2 (**Fig. 9 c**).

65

En resumen, los resultados demuestran que el sistema de afinidad BC2T/BC2-Nb permite una purificación robusta y conveniente en un solo paso de proteínas recombinantes etiquetadas con BC2 de diferentes sistemas de expresión en condiciones tanto nativas (es decir, no desnaturalizantes) como desnaturalizantes. En combinación con la funcionalidad observada en la detección de inmunotransferencia, el sistema cubre la gama completa de captura y
5 detección de proteínas etiquetadas con BC2 para una amplia gama de análisis bioquímicos.

Ejemplo 5: Inmunocitoquímica utilizando BC2-Nb marcado con fluorescencia

Se han descrito numerosos nanoanticuerpos para la obtención de imágenes moleculares de antígenos relevantes para enfermedades localizados en las superficies celulares [12-14]. Hasta el momento hay muy pocos estudios que hayan
10 utilizado nanoanticuerpos para la obtención de imágenes celulares [15]. Por lo tanto, se probó si el BC2-Nb marcado con fluorescencia (acoplado a los colorantes orgánicos AlexaFluor488 o ATTO647 (BC2-NbAF488; BC2-NbATTO647)) es adecuado para visualizar proteínas celulares etiquetadas con BC2. Para generar estructuras diana celulares relevantes, las construcciones de fusión descritas anteriormente mCherry-VIMBC2T o GFP-PCNABC2T se
15 expresaron en células humanas (Fig. 4 a). Las construcciones fluorescentes de vimentina se incorporan a la red de filamentos intermedios celulares y visualizan las fibras de vimentina en el citoplasma tras la expresión celular transitoria [16], mientras que GFP-PCNA se encuentra en sitios de replicación de ADN, formando estructuras características similares a manchas en el núcleo durante la fase S del ciclo celular [17]. El patrón característico de las proteínas de fusión aplicadas permite realizar estudios de colocalización utilizando inmunocitoquímica con BC2-Nb marcados con
20 colorante.

Mediante la tinción de células HeLa que expresaban mCherry-VIM_{BC2T} con el BC2-Nb_{AF488}, se observó una fuerte colocalización de la señal verde del nanoanticuerpo a lo largo de las estructuras citoplasmáticas de vimentina mostradas en el canal rojo (Fig. 4 b, Fig. 10 a). De forma correspondiente, el BC2-Nb_{ATTO647} reveló una clara
25 colocalización con GFP-PCNA_{BC2T} en focos de replicación durante la fase S. Las señales tanto de GFP-PCNA_{BC2T} como de BC2-Nb_{ATTO647} se encontraron exclusivamente en el núcleo, demostrando la especificidad de unión de BC2-Nb. No se detectó señal de nanoanticuerpo en las células que expresaban construcciones mCherry-VIM o GFP-PCNA que carecían de la etiqueta BC2 (Fig. 10 b). Estos datos demuestran que el BC2-Nb marcado con fluorescencia se une específicamente a las proteínas de fusión de BC2T expresadas ectópicamente y, por lo tanto, puede aplicarse
30 para la detección directa de antígeno en inmunocitoquímica.

Ejemplo 6: Análisis del impacto de múltiples mutaciones o truncamientos dentro de la etiqueta BC2 en la eficacia de unión del BC2-Nb en los ensayos pulldown

Como se indica en el ejemplo 3, se demostró que los restos de BC2T en las posiciones 1, 2, 4, 5, 7, 9, 11 y 12 de la SEQ ID NO: 4 pueden reemplazarse. Esto se mostró utilizando bibliotecas de péptidos de exploración posicional que presentan los 20 aminoácidos proteinogénicos en una sola posición del péptido.

Para estudiar el impacto de múltiples intercambios de restos de aminoácidos dentro del BC2T en el rendimiento de
40 unión con más detalle, se generó una versión mutada del BC2T intercambiando seis restos de aminoácidos simultáneamente. Por tanto, se reemplazaron la Asp (D) en la posición 2 por una Val (V), la Lys (K) en la posición 4 por una Ser (S); la Val (V) en la posición 7 por Leu (L); la His (H) en la posición 9 por Gln (Q); la Gln (Q) en la posición 11 por Ser (S) y la Gln (Q) en la posición 12 por Ser (S). De esta manera, en total se cambiaron el 50% de los restos de aminoácidos identificados originalmente como la secuencia de BC2T (SEQ ID NO: 5). La secuencia de aminoácidos
45 resultante se denomina BC2Tmut. Para probar si el intercambio simultáneo de estos restos de aminoácidos afecta a la eficacia de pulldown de proteínas que comprenden la etiqueta BC2 mutada (BC2mut), el BC2Tmut se fusionó genéticamente a GFP (GFPBC2Tmut). Para el análisis pulldown, las fracciones proteicas solubles de las células *E. coli* que expresaban wtGFP (control), GFP con etiqueta BC2 C-terminal (GFPBC2T) o GFPBC2Tmut se incubaron con el nanotrap de BC2 y se analizaron las fracciones de entrada, no unidas y unidas mediante SDS-PAGE seguido de
50 tinción con Coomassie e inmunotransferencia (véase la Fig. 11). Los datos obtenidos muestran que el nanotrap de BC2 precipita cuantitativamente GFPBC2T así como GFPBC2Tmut. A partir de eso, se puede concluir que un intercambio múltiple de restos de aminoácidos en las posiciones indicadas no afecta a la interacción y la capacidad de unión de BC2T mutado al nanotrap de BC2.

A continuación, se analizó si el truncamiento N o C-terminal del BC2T afecta a las propiedades de unión al BC2-Nb. Por lo tanto, se generaron dos construcciones. En la primera construcción (denominada BC2T-10), se eliminaron los dos últimos restos de Gln (Q) localizados en el extremo C del BC2T, dando como resultado la secuencia PDRKAAVSHW. Para la segunda construcción, se eliminaron adicionalmente los dos primeros restos de aminoácidos Pro (P) y Asp (D) localizados en el extremo N del BC2T (BC2T-8; RKA AVSHW). Para los estudios de unión, BC2T-10
60 y BC2T-8 se fusionaron genéticamente con GFP (GFPBC2T-10; GFPBC2T-8). Para el análisis pulldown, las fracciones de proteínas solubles de células *E. coli* que expresaban wtGFP (control), GFP con etiqueta BC2 C-terminal (GFPBC2T), GFPBC2T-10 o GFPBC2T-8 se incubaron con el nanotrap de BC2, y se analizaron las fracciones de entrada, no unidas y unidas mediante SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia usando anticuerpos anti-GFP (véase la Fig. 12). Los datos obtenidos muestran que el nanotrap de BC2 precipita GFPBC2T-10 así como GFPBC2T-
65 8 de una manera comparable a la GFP etiquetada con el BC2T original (GFPBC2T). Esto demuestra que la eliminación

de los dos restos de aminoácidos que flanquean el BC2T en el extremo N o C no afecta a la interacción y la capacidad de unión del BC2T truncado al nanotrap de BC2T.

Ejemplo 7: Desarrollo de variaciones mejoradas de BC2T

5 Usando un enfoque de diseño racional, se desarrollaron variaciones de BC2T con el objetivo de mejorar aún más la afinidad de la etiqueta BC2 con el BC2-Nb. Con este fin, se sustituyeron restos de BC2T en las posiciones 1, 4, 5, 11 y 12 de la SEQ ID NO: 4 basándose en datos estructurales y bioquímicos presentados en la **Figura 1** y la **Tabla 4** y en modelado molecular.

10 Se diseñaron dos variaciones de BC2T, denominadas pTag1 SEQ ID NO: 33 y pTag2 SEQ ID NO: 34, para presentar una mayor afinidad por BC2-Nb que la secuencia original de BC2T (**Tabla 5**, **Fig. 13**). Usando interferometría de biocapa, se determinó que la constante de disociación K_D era 0,7 nM y 1,9 nM para la interacción entre BC2-Nb y pTag1 SEQ ID NO: 33 y pTag2 SEQ ID NO: 34, respectivamente. Por el contrario, para BC2T original (SEQ ID NO: 4), la K_D para la interacción con BC2-Nb es 2,6 nM (según lo determinado usando interferometría de biocapa). En particular, la constante de la tasa de disociación k_{off} es 7 veces más lenta para pTag1 SEQ ID NO: 33 que para BC2T original (**Tabla 5**), lo que explica la afinidad inusualmente alta de BC2-Nb por pTag1 SEQ ID NO: 34.

20 Estas variaciones mejoradas de BC2T se validaron para la aplicación en purificación de proteínas e inmunoprecipitación. (**Fig. 14**). La proteína mCherry se fusionó con las variaciones de BC2T pTag1 SEQ ID NO: 33 y pTag2 SEQ ID NO: 34 (y también con el BC2T original SEQ ID NO: 4 con fines comparativos) en el extremo N-terminal o C-terminal y se incubó con el nanotrap de BC2 (**Fig. 14 a**). Posteriormente, la proteína de fusión capturada se eluyó usando el péptido correspondiente a una concentración de 100 μ M. El análisis SDS-PAGE de las fracciones de entrada, proteína no unida, proteína eluida y proteína aún unida a nanotrap de BC2 después de la elución (**Fig. 14 a**) muestra que las etiquetas BC2 mejoradas permiten la captura de una proteína de fusión independientemente de la localización de la etiqueta. Además, la proteína capturada puede eluirse usando péptido libre, es decir, en condiciones no desnaturizantes, nativas. Por tanto, las variaciones mejoradas de BC2T pueden aplicarse a la purificación de proteínas en un solo paso de una proteína de interés fusionada a dicha variación de BC2T. En comparación con el BC2T original, la mayor afinidad de las variaciones mejoradas de BC2T por BC2-NB conduce a una captura más eficaz de la proteína etiquetada, con hasta un 100% de proteína unida (**Fig. 14 a**).

En una diversidad de organismos puede precipitarse una proteína de interés fusionada con una variación mejorada de BC2T usando el nanotrap de BC2. Como se muestra en la **Fig. 14 b**, la fusión N-terminal de pTag1 SEQ ID NO: 33 a la proteína mCherry permite la recuperación altamente específica de esta proteína de fusión a partir de lisados de la línea celular humana HEK293T, la línea celular de insecto *Trichoplusia ni* High5 y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando el nanotrap de BC2. Este experimento (**Fig. 14 b**) usa líneas celulares comunes en la técnica, lo que ejemplifica la aplicabilidad del nanotrap de BC2 junto con el etiquetado de la proteína mediante el uso de la variación de BC2T pTag1 SEQ ID NO: 33 para la purificación y precipitación de proteínas a partir de sistemas relevantes de expresión recombinante.

40

Tabla 5: Cinética de unión de dos variaciones mejoradas de BC2T en comparación con BC2T de tipo silvestre

Secuencia	K_d (nM)	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	X^2	R^2
pTag1	0,7	$9,2 \pm 0,5 \times 10^4$	$6,8 \pm 0,4 \times 10^{-5}$	0,09	0,9997
pTag2	1,9	$1,1 \pm 0,1 \times 10^5$	$2,0 \pm 0,1 \times 10^{-4}$	0,17	0,9992
BC2T	2,6	$1,9 \pm 0,1 \times 10^5$	$5,0 \pm 0,1 \times 10^{-4}$	0,18	0,9987

45 **Leyenda de la tabla:** La unión de BC2-Nb a BC2T (SEQ ID NO: 4) y las dos variaciones mejoradas (pTag1 SEQ ID NO: 33 y pTag2 SEQ ID NO: 34) se analizaron mediante interferometría de biocapa (véanse los datos de partida en la **Fig. 13**). Se presentan la constante de disociación (K_D), las constantes de velocidad de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) y los marcadores de la calidad de ajuste de un modelo de unión 1:1 (X^2 , R^2). Las constantes presentadas para BC2T original difieren de las presentadas en la **Tabla 1** porque la cinética se analizó utilizando un método diferente.

50 En resumen, un enfoque de diseño racional permitió el desarrollo de variaciones mejoradas de BC2T que se caracterizan por una mayor afinidad por BC2-Nb. Estas variaciones mejoradas pueden fusionarse con el extremo N o el extremo C de una proteína de interés y permitir la purificación eficaz de dicha proteína de fusión a partir de una diversidad de organismos. Además, al igual que BC2T original, estas etiquetas BC2T mejoradas se pueden eluir del nanotrap de BC2 usando condiciones no desnaturizantes nativas.

55

Ejemplo 8: Materiales y métodos

plásmidos de expresión

Para la expresión bacteriana de GFP con etiqueta BC2 C-terminal (GFP_{BC2T}) se usó pEGFP-C1 (Clontech) como molde. La secuencia que codifica GFP_{BC2T} se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores oligonucleotídicos GFP_{BC2T_dir} (5'-GCA CCA TGG ATG GTG AGC AAG GGC GAG G-3'; SEQ ID NO: 15) y GFP_{BC2T_rev} (5'-GAC GTC GAC TTA CTG CTG CCA GTG ACT AAC A-3'; SEQ ID NO: 16). El fragmento de PCR se clonó en los sitios de restricción NcoI/SalI de pTRC2A (Life Technologies). Para la expresión de la GFP etiquetada con BC2 C-terminal con una etiqueta His₆ C-terminal (His₆-GFP_{BC2T}), la secuencia que codificaba GFP_{BC2T} se amplificó por PCR usando los cebadores oligonucleotídicos His₆-GFP_{BC2T_dir} (5'-CAG GGA TCC GAG TGA GCA AGG GC -3'; SEQ ID NO: 17) e His₆-GFP_{BC2T_inv} (5'-CAG GGT ACC TTA CTG CTG CCA GTG ACT AA -3'; SEQ ID NO: 18). El fragmento de PCR se clonó en sitios de restricción BamHI/KpnI de pRSET B (Invitrogen) añadiendo una etiqueta His₆ N-terminal.

Para generar una construcción de fusión de GFP que comprendía un 50% de etiqueta BC2 modificada, se usó pEGFP-C1 (Clontech) como molde. La secuencia que codificaba GFP_{BC2Tmut} se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores oligonucleotídicos GFP_{BC2Tmut_dir} (5'-GGA TCC GAT GGT GAG CAA GGG CGA G-3'; SEQ ID NO: 19) y GFP_{BC2Tmut_inv} (5'-GGT ACC TTA GCT GCT CCA CTG GCT CAG CGC CGC GCT CCG GAC CGG CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC-3'; SEQ ID NO: 20). El fragmento de PCR se clonó en los sitios de restricción BamHI/KpnI de la construcción de expresión de GFP_{BC2T} generada previamente.

Para generar un vector de expresión bacteriana que codificara GFP con una etiqueta His₆ N-terminal y una versión acortada C-terminal del BC2T (BC2T-10 o BC2T-8), la secuencia que codificaba GFP_{BC2T-10} o GFP_{BC2T-8} se amplificó por PCR usando pEGFP-C1 (Clontech) como molde. Para la PCR se usaron los siguientes cebadores oligonucleotídicos: His₆-GFP_{BC2T-10_dir} (5'-cccc GGA TCC GAT GGT GAG CAA GGG CGA GG-3'; SEQ ID NO: 21) e His₆-GFP_{BC2T-10_inv} (5'-cccc GGT ACC TTA CCA ATG TGA CAC CGC TGC TTT GCG GTC AGG CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC-3'; SEQ ID NO: 22) o His₆-GFP_{BC2T-8_dir} (5'-cccc GGA TCC GAT GGT GAG CAA GGG CGA GG-3'; SEQ ID NO: 23) e His₆-GFP_{BC2T-8_inv} (5'-cccc GGT ACC TTA CCA GTG GGA AAC GGC TGC TTT ACG CTT GTA CAG CTC GTC CAT G-3'; SEQ ID NO: 24).

Para la expresión en mamíferos de la GFP etiquetada con BC2 C-terminal, se usó pEGFP-C1 como molde. La secuencia que codificaba la construcción de eGFP_{BC2T} de mamífero se amplificó por PCR usando los cebadores oligonucleotídicos eGFP_{BC2T_dir} (5'-AAG CTA GCG CTA CCG GTC GCC ACC ATG -3'; SEQ ID NO: 25) y eGFP_{BC2T_inv} (5'-AAG GTA CCT TAT TGC TGC CAG TGA CTA ACA GCC GCT TTT CTG TCT GGC TTG TAC AGC TCG TC -3'; SEQ ID NO: 26). El fragmento de PCR se clonó en el sitio NheI/KpnI del vector pEGFP-C1.

Para la expresión en mamíferos de GFP con etiqueta BC2 N-terminal (BC2T_{GFP}), se sintetizó la secuencia de nucleótidos que codificaba la etiqueta BC2 (5'-GCT AGC ATG CCC GAT CGT AAG GCT GCG GTC TCT CAT TGG CAA CAG AGA TCT-3'; SEQ ID NO: 27) que portaba sitios de restricción NheI y BglII (MWG). Posteriormente, la etiqueta se clonó en sitios NheI/BglII de pEGFP-N1 (Clontech). El plásmido obtenido se digirió con XhoI y NheI, los extremos se hicieron romos usando la enzima Klenow (Roche) y se volvieron a unir dando como resultado la construcción deseada.

Para la expresión de mCherry-Vimentina_{BC2T} en mamíferos, se utilizó una construcción mCherry-Vimentina [18] como molde. La secuencia de nucleótidos que codificaba mCherry-Vimentina_{BC2T} se amplificó por PCR usando los cebadores oligonucleotídicos mCherry-Vimentina_{BC2T_dir} (5'-AAA AGC TTA GGT GGA GGA GGT TCT TCC ACC AGG TCC GTG TC-3'; SEQ ID NO: 28) y mCherry-Vimentina_{BC2T_inv} (5'-AAG GTA CCC TAT TGC TGC CAG TGA CTA ACA GCC GCT TTT CTG TCT GGT TCA AGG TCA TCG TG-3'; SEQ ID NO: 29). El fragmento de PCR se clonó en los sitios HindIII/KpnI del vector mCherry-Vimentina.

Para la expresión en mamíferos de GFP-PCNA_{BC2T}, se usó GFP-PCNA [17] como molde. La secuencia que codificaba GFP-PCNA_{BC2T} se amplificó por PCR usando los cebadores oligonucleotídicos GFP-PCNA_{BC2T_dir} (5'-GTA TGG CTT CGT GGG GAT CCC CG-3'; SEQ ID NO: 30) y GFP-PCNA_{BC2T_inv} (5'-GGG GTC TAG ACT AAA GGT ACC CTA TTG CTG CCA GTG ACT AAC AGC CGC TTT TCT GTC TGG AGA TCC TTC TTC ATC CTC-3'; SEQ ID NO: 31). El fragmento de PCR se clonó en los sitios de restricción BamHI/XbaI del vector GFP-PCNA.

Para generar un vector de expresión bacteriana que codificara mCherry con una etiqueta His₆ N-terminal y un BC2T C-terminal o variaciones del mismo, se sintetizaron como oligonucleótidos las secuencias que codificaban BC2T (SEQ ID NO: 4) y las variaciones pTag1 SEQ ID NO: 33 y pTag2 SEQ ID NO: 34, se hibridaron y se clonaron en los sitios de restricción BrsGI e HindIII del vector plasmídico pRSET-B_{mCherry} (ThermoFisher Scientific). Con este fin, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: mCherry_{BC2T_dir} (5'-GTA CAG TGG TCC GGA TCG CAA AGC GGC GGT GAG CCA TTG GCA GCA GTA AA-3'; SEQ ID NO: 35) y mCherry_{BC2T_inv} (5'-AGC TTT TAC TGC TGC CAA TGG CTC ACC GCC GCT TTG CGA TCC GGA CCA CT-3'; SEQ ID NO: 36); mCherry_{SEQ33_dir} (5'-GTA CAG TGG TCC GGA TCG CGT GCG CGC GGT GAG CCA TTG GAG CAG CTA AA-3'; SEQ ID NO: 37) y mCherry_{SEQ33_inv} (5'-AGC TTT TAG CTG CTC CAA TGG CTC ACC GCG CGC ACG CGA TCC GGA CCA CT-3'; SEQ ID NO: 38); mCherry_{SEQ34_dir} (5'-GTA CAGT GGT GCG GATCGG GTG CGC GCG GTG AGC CATTGG AGC AGC TAAA-3'; SEQ ID NO: 39) y mCherry_{SEQ34_inv} (5'-AGC TTT TAG CTG CTC CAA TGG CTC ACC GCG CGC ACG CGA TCC

GCA CCA CT-3': SEQ ID NO: 40).

Para generar un vector de expresión bacteriana que codificara mCherry con una etiqueta His₆ C-terminal y un BC2T N-terminal o variaciones del mismo, se sintetizaron como oligonucleótidos las secuencias que codificaban BC2T (SEQ ID NO: 4) y las variaciones pTag1 SEQ ID NO: 33 y pTag2 SEQ ID NO: 34, se hibridaron y se clonaron en los sitios de restricción NdeI y BamHI de una variación modificada del vector plasmídico pRSET-B_mCherry (ThermoFisher Scientific) que codificaba una etiqueta His₆ C-terminal. Con este fin, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: mCherry_BC2T_dir2 (5'-TAT G CC GGA TCG CAA AGC GGC GGT GAG CCA TTG GCA GCA GGG CTC G-3'; SEQ ID NO: 41) y mCherry_BC2T_inv2 (5'-GAT CCG AGC CCT GCT GCC AAT GGC TCA CCG CCG CTT TGC GAT CCG GCA-3'; SEQ ID NO: 42); mCherry_SEQ33_dir2 (5'-TAT GCC GGA TCG CGT GCG CGC GGT GAG CCA TTG GAG CAG CGG CTC G-3'; SEQ ID NO: 43) y mCherry_SEQ33_inv2 (5'-GAT CCG AGC CGC TGC TCC AAT GGC TCA CCG CGC GCA CGC GAT CCG GCA-3'; SEQ ID NO: 44); mCherry_SEQ34_dir2 (5'-TAT GGC GGA TCG CGT GCG CGC GGT GAG CCA TTG GAG CAG CGG CTC G-3'; SEQ ID NO: 45) y mCherry_SEQ34_inv2 (5'-GAT CCG AGC CGC TGC TCC AAT GGC TCA CCG CGC GCA CGC GAT CCG CCA-3'; SEQ ID NO: 46).

Producción y purificación de proteínas

La expresión y purificación del nanoanticuerpo BC2 se realizó como se describió anteriormente [11]. Se realizó la expresión y purificación de wtGFP o versiones modificadas de la misma tal como se ha descrito anteriormente [19]. Se evaluó que la pureza de todas las proteínas era de al menos un 95% basándose en el análisis de electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE). La concentración de proteína se determinó espectroscópicamente.

Formación de complejos

Para la formación de complejos, se mezcló una solución de BC2-Nb a 2 mg/ml y se incubó con un exceso molar de tres veces de péptido en tampón Tris/HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 100 mM durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de péptido se eliminó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200 Increase, GE Healthcare). La formación del complejo se confirmó por espectrometría de masas con cromatografía líquida usando un Shimadzu LCMS 2020 con una columna Phenomenex Kinetex (2,6 u C18 100 Å). El complejo se concentró a 13,7 mg/ml y se usó para experimentos de cristalización.

Cristalización

El BC2-Nb sin ligando se cristalizó usando una difusión de vapor de gota colgante mezclando una solución de proteína de 3,2 mg/ml con tampón de cristalización (MES 0,1 M/imidazol pH 6,7, 2-metil-2,4-pentanodiol al 12,5% [v/v] (MPD), PEG 1000 al 7,5% [p/v], PEG 3350 al 7,5% [p/v], mezcla de alcohol 3 mM) en una relación 1:1 a 20 ° C. El complejo BC2-Nb/BC2T se cristalizó usando difusión de vapor de gota colgante, mezclando una solución de complejo de 13,7 mg/ml con tampón de cristalización (MES/imidazol 0,1 M pH 6,5, 2-metil-2,4-pentanodiol al 12,5% [v/v] (MPD), PEG 1000 al 12,5% [p/v], PEG 3350 al 12,5% [p/v], mezcla de aminoácidos 4 mM) en una relación 1:1 a 20 ° C. En ambos casos, los cristales se transfirieron a una solución de cristalización que contenía un 30% [v/v] de MPD para la crioprotección, y se enfriaron rápidamente en nitrógeno líquido después de la incubación durante 30 s. Se recopilaron un conjunto de datos de BC2-Nb y cuatro conjuntos de datos del mismo cristal del complejo de BC2-Nb/BC2T en diferentes posiciones con una longitud de onda del haz de 0,918409 Å en la línea de haz MX 14,2 de BESSY II en el Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB).

Los datos de rayos X se redujeron y, en el caso del complejo BC2-Nb/BC2T, se fusionaron usando el paquete XDS [20]. Las fases iniciales para los datos de BC2-Nb se obtuvieron mediante reemplazo molecular utilizando PHASER [21] con un modelo modificado de CHAINSAW [22,23] de un nanoanticuerpo (PDB ID:2X1O) que contenía solo la región central. Después se resolvió la estructura del complejo BC2-Nb/BC2T utilizando la estructura BC2-Nb sin ligando como modelo de búsqueda en reemplazo molecular. Las dos estructuras se refinaron utilizando PHENIX.refine [24], REFMAC5 [25] y COOT [26]. Las dos estructuras se validaron con MOLPROBITY [27]. El diagrama de Ramachandran muestra un 100% (BC2-Nb) y un 98,1% (complejo BC2-Nb/BC2T) en regiones favorecidas y un 100% en regiones permitidas.

Visualización y análisis de estructuras

Las superposiciones de estructuras y el cálculo de los valores de RMSD se realizaron utilizando la comparación de estructuras de Phenix. Las imágenes de las estructuras cristalinas se prepararon con PyMol (<http://www.pymol.org>).

Análisis de espectrometría de masas de especificidades de unión con bibliotecas de péptidos de exploración posicional sintéticas

Para investigar la especificidad de unión de BC2T y mutantes derivados, se sintetizaron bibliotecas de péptidos para cada posición de aminoácidos de la secuencia PDRKAAVSHWQQ (SEQ ID NO: 4) con grupos acetilo y amida

localizados en los extremos N o C respectivamente (Intavis). Se llevaron a cabo estudios de precipitación incubando 60 pmol de péptido de una biblioteca de posición única con 2 μ l de BC2-Nb inmovilizado en microesferas de agarosa. Las incubaciones se realizaron en 300 μ l de PBS/CHAPS al 0,01% durante 1 h en un HulaMixer (Life Technologies). Después de una etapa de centrifugación, se analizaron 10 μ l de sobrenadante en un procedimiento de LC-MS. Los péptidos se separaron usando un sistema UltiMate3000 RSLCnano (Thermo Scientific), compuesto de una Precolumna C18 PepMap100 μ (300 μ m x 5 mm; tamaño de partícula: 5 μ m; tamaño de poro: 100 Å - Thermo Scientific) y una columna analítica C18 (Columna Acclaim Rapid Separation LC (RSLC): 150 mm x 5 mm; tamaño de partícula: 2,2 μ m; tamaño de poro: 100 Å - Thermo Scientific). Se aplicó un gradiente escalonado comenzando en 8% y terminando después de 20 minutos con 30% de eluyente B (80% de acetonitrilo, 20% de H₂O, 0,1% de ácido fórmico).

10 Los péptidos se analizaron usando una estrategia FULL-MS detectada por un espectrómetro de masas Q Exactive Plus (Thermo Scientific). Como tiempo de inyección máximo, se eligieron 100 ms al establecer el objetivo AGC en 3E6. La resolución se estableció en 70.000. Se hizo referencia a áreas de señal semimáxima para controlar los enfoques de precipitación usando un nanoanticuerpo específico de GFP inmovilizado en microesferas de agarosa. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

15

Cultivo y transfección celular

Se cultivaron células HEK293T y HeLa en DMEM (alto contenido de glucosa, piruvato) suplementado con FCS al 10%, L-glutamina 2 mM y Strep Pen (todos de Gibco, Life Technologies). Las células se cultivaron a 37 ° C en una cámara humidificada con una atmósfera con un 5% de CO₂ y se tripsinizaron para los pases. Para generar complejos de ADN/PEI para la transfección transitoria en placas P100, se mezclaron 24 μ g de ADN con 108 μ l de polietilenimina (PEI, Sigma Aldrich) prediluidos con 750 μ l de Opti-MEM (Gibco, Life Technologies) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para la transfección de células en una placa de 96 pocillos, se usaron 200 ng de ADN y 1,5 μ l de PEI.

25

Generación de fracción proteica soluble a partir de células bacterianas

Se homogeneizaron sedimentos de células *E. coli* que expresaban GFP o GFP_{BC2T} derivados de cultivo de 1 l durante 90 minutos a 4 ° C en 500 μ l de PBS que contenía 0,1 mg/ml de lisozima, 5 μ g/ml de DNasal, 50 μ g/ml de PMSF y mezcla de inhibidor de proteasa B 1x (Serva) seguido de sonicación (10 pulsos de 10 segundos). Después de un paso de centrifugación (10 min a 18.000 xg, 4 ° C), la fracción de proteína soluble se transfirió a un nuevo recipiente y se determinó la concentración de proteína de cada lisado usando Coomassie Plus de acuerdo con el protocolo del fabricante (Thermo Fisher Scientific).

35 Resonancia del plasmón superficial

Las mediciones de afinidad del nanoanticuerpo BC2 y los mutantes indicados del mismo por GFP_{BC2T} se realizaron utilizando espectroscopía de resonancia de plasmón superficial con un instrumento Biacore 3000 (GE-Healthcare). Se acopló covalentemente GFP_{BC2T} en fibras de dextrano de un chip sensor CM5 (GE Healthcare) a un nivel de respuesta de 500 UR. Se activaron y bloquearon una celda de flujo en ausencia de proteína para determinar el efecto de fondo, otra se cargó con GFP sin etiquetar como control frente a la unión inespecífica. Para las mediciones cinéticas, se inyectaron seis concentraciones que variaban de 7,8125 nM a 250 nM de BC2-Nb, BC2-Nb_{R106S} o BC2-Nb_{R106E}. Cada medición se realizó por duplicado. Como tampón de ensayo/dilución, se usó HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, tensoactivo Tween al 0,5%. Las mediciones se realizaron a 25 ° C. Para la asociación de BC2-Nb se aplicó un caudal de 50 μ l/min durante 15 s y para la disociación se aplicó un caudal de 50 μ l/min durante 600 s. La regeneración se indujo por inyección de 23 μ l de solución de regeneración a un caudal de 30 μ l/min. Como solución de regeneración se utilizó glicina-HCl 10 mM, pH 2,0. Los datos se evaluaron utilizando el software Bia evaluation 4.1 y el modelo de unión 1:1 de Langmuir con transferencia de masa.

50 SDS-PAGE e inmunotransferencia

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) desnaturante se realizó de acuerdo con procedimientos convencionales. Se hirvieron muestras de proteína en tampón de muestra-SDS 2x (Tris/HCl 60 mM, pH 6,8; SDS al 2% (p/v); 2-mercaptoetanol al 5% (v/v), glicerol al 10% (v/v), azul de bromofenol al 0,02%). Para la inmunotransferencia, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories).

Anticuerpos

Para la inmunotransferencia se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-GFP clon 3H9 (ChromoTek), anti-PCNA clon 16D10 (ChromoTek), anti-Vimentina clon V9 (Sigma Aldrich), anti-GAPDH (abcam), anti-p-catenina clon 14 (BD-Biosciences). Para la detección se usaron anticuerpos secundarios específicos de especie marcados con fluoróforo (Alexa-647, cabra-anti-conejo, cabra anti-rata; cabra-anti-ratón, Life Technologies). Las manchas de transferencia se exploraron en el escáner láser Typhoon-Trio (GE Healthcare).

65 Inmunoprecipitación de proteínas etiquetadas con BC2

Se lavaron células HEK293T que expresaban de forma transitoria eGFP, eGFP_{BC2T} o BC2TeGFP, eGFP-PCNA, eGFP-PCNA_{BC2T}, mCherry-Vimentina, mCherry-Vimentina_{BC2T} y se recogieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 ° C. Los sedimentos celulares se
 5 homogeneizaron en 200 µl de tampón de lisis (Tris/Cl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, NP40 al 0,5%, 1 µg de DNAsal, MgCl 2 mM, PMSF 2 mM, mezcla de inhibidor de proteasa M (Serva) 1x por pipeteo repetido durante 40 minutos en hielo. Después de una etapa de centrifugación (10 minutos a 18.000 xg), se determinó la concentración de proteína de cada lisado usando un kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante y las soluciones de proteína se ajustaron con tampón de dilución (Tris/Cl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM,
 10 PMSF 2 mM) a una concentración de 1 mg/ml. Se añadió un 2% del sobrenadante al tampón de muestra que contenía SDS (denominado fracción de entrada). Se añadieron 50 µl de nanotrap de BC2 (suspensión) por 100 µl de sobrenadante seguido de incubación durante 1 h en un rotor de extremo a extremo a 4 ° C. Después de una etapa de centrifugación (2 min, 2500 xg), el sobrenadante previamente limpiado se transfirió a un nuevo recipiente. Se añadió un 2% al tampón de muestra que contenía SDS (denominado fracción no unida). Después de cuatro pasos de lavado,
 15 las proteínas unidas al nanotrap de BC2 se eluyeron hirviendo las microesferas en 50 µl de tampón de muestra-SDS o mediante incubación con tampones de elución indicados. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se sondearon con los anticuerpos indicados.

20 Inmunoprecipitación en condiciones rigurosas

Para cada condición, se mezclaron 50 µl de suspensión de microesferas con 100 µl de fracción de proteína soluble de lisado de *E. coli* (c = 1 mg/ml) y 150 µl de una solución que contenía un detergente o un agente caotrópico, dando como resultado una concentración final como se indica a continuación. Como agentes caotrópicos se usaron urea (0 M, 1 M, 2 M, 4 M) y cloruro de guanidinio (0 M, 0,375 M, 0,75 M, 1,5 M, 3 M) y como detergente se usó SDS (0%,
 25 0,1 %, 0,5 %, 1%, 2%). Después de la incubación en un rotor de extremo a extremo durante una hora a 4 ° C y un paso de centrifugación (2 min, 2500 xg, 4 ° C) los sobrenadantes se descartaron y las microesferas restantes se lavaron dos veces en PBS antes de hervir en 50 µl de tampón de muestra 2x. El 10% de cada fracción unida a las microesferas (B) se analizó mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-GFP.

30 Elución de la proteína etiquetada con BC2 unida

Para los experimentos de elución, se incubaron 40 µl de nanotrap de BC2 (suspensión) con 400 µl de extracto de proteína soluble (c = 1 mg/ml) derivado de células *E. coli* que expresaban GFP_{BC2T} durante 1 h a 4 ° C en un rotor de extremo a extremo. Después de un paso de centrifugación (2500 xg, 4 ° C, 2 min), el sobrenadante se desechó y las
 35 microesferas se lavaron cuatro veces en PBS enfriado con hielo, incluyendo un cambio de recipiente después de la segunda fase de lavado. Posteriormente, las microesferas se sedimentaron y se incubaron con 80 µl de las condiciones de elución indicadas durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se han probado las siguientes condiciones de elución: elución de péptido: Péptido BC2 0 mM, 0,01 mM, 0,1 mM o 1 mM disuelto en Tris/Cl 0,2 M pH 7,4, NaCl 150 mM; elución ácida: Glicina-HCl 0,2 M ajustada a pH 1, pH 2 o pH 3; elución alcalina: NaOH 0 mM, 1 mM, 10 mM o 100 mM; elución con tiocianato de sodio: NaSCN 0 M, 1 M, 2 M o 3 M. Los materiales eluidos se recogieron y se hirvieron en tampón de muestra que contenía SDS 1x y las perlas restantes se lavaron dos veces en PBS antes de hervir en
 40 40 µl de tampón de muestra 2x. El 10% de cada fracción de elución (liberación, R) y unida a las microesferas (unida, B) se analizó mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-GFP.

45 Tinción inmunofluorescente con nanoanticuerpo marcado con fluorescencia

El nanoanticuerpo BC2 purificado (1 mg) se marcó con los colorantes fluorescentes activados por NHS Alexa488 (Life technologies) o Atto647 (Atto-Tec) de acuerdo con las directrices del fabricante. Después del acoplamiento, el colorante no unido se eliminó por separación en columnas de desalación PD-10 (GE Healthcare). Para el análisis por
 50 inmunotransferencia, se diluyeron 5 µg de BC2-Nb_{AF488} en 4 ml de BSA al 3% diluido en TBS, Tween20 al 0,05% y las transferencias de Western se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente.

Para inmunocitoquímica se transfectaron 5 - 10 x 10³ células HeLa adherentes por pocillo de una placa de 96 pocillos µClear (Greiner) con plásmidos que codificaban vimentina con etiqueta BC2 en el extremo C o PCNA. Después de
 55 24 h, las células se lavaron una vez con PBS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% p/v en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente o con metanol durante 15 minutos a -20 ° C. Después de retirar el fijador y lavar dos veces con PBS, las células se bloquearon y permeabilizaron con 3% p/v de BSA y 0,1% v/v de Triton X-100 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió nanoanticuerpo BC2 marcado con una concentración final de 10-15 µg/ml y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma Aldrich) con una concentración final de
 60 1 µg/ml para la incubación durante la noche a 4 ° C. El nanoanticuerpo no unido y el DAPI se eliminaron lavando 3 veces con una mezcla de PBS y 6% v/v de NaCl 5 M en H₂O. Las imágenes de la Fig. 4 b y la Fig. 10 b se adquirieron con un sistema Image Xpress micro XL. Las imágenes confocales de la Fig. 10 a se adquirieron con un ImageXpress Micro Confocal.

65 Espectroscopía de fluorescencia

Los ensayos de fluorescencia se realizaron mediante exploración de una microplaca de 96 pocillos (Nunc) en un Typhoon Trio (GE Healthcare Life Sciences), excitación: 488 nm, ajustes del filtro de emisión: 520 nm BP 40

5 Interferometría de biocapa

Las mediciones de afinidad de BC2-Nb por BC2T y las variaciones mejoradas pTag1 y pTag2 se realizaron mediante interferometría de biocapa usando un instrumento del sistema BLItz (forteBIO). Los péptidos biotinilados de BC2T y sus variaciones se inmovilizaron en biosensores de estreptavidina (forteBIO). El sensor cargado se sumergió
 10 secuencialmente en tampón BLItz (solución salina tamponada con fosfato, BSA al 0,1% (m/v), Tween20 al 0,02% (v/v)) durante 120 s para determinar la señal de la línea de referencia, en una solución de BC2-Nb en tampón BLItz (concentración de 5-50 nM) durante 120 s para determinar la asociación y en tampón BLItz durante 600 s para determinar la disociación. La velocidad de agitación fue de 1200 rpm. Como referencia, cada péptido también se incubó con tampón BLItz solo de acuerdo con el protocolo anterior. En un experimento de control, los biosensores de
 15 estreptavidina se incubaron con BC2-Nb sin inmovilización previa de péptido. El sensor se regeneró mediante inmersiones secuenciales en glicina 10 mM, pH 2,0 y tampón BLItz (repetido tres veces). Los datos de partida se analizaron utilizando el software BLItz Pro (forteBio) y un modelo de unión 1:1.

Referencias

- 20 1 De Genst, E. et al. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 4586-4591, doi: 10.1073/pnas.0505379103 (2006).
- 25 2 Muyldermans, S. Single domain camel antibodies: current status. *Journal of biotechnology* 74, 277-302 (2001).
- 3 3 Govaert, J. et al. Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments. *The Journal of biological chemistry* 287, 1970-1979, doi:10.1074/jbc.M111.242818 (2012).
- 4 Rothbauer, U. et al. A versatile nanotrapp for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7, 282-289, doi:10.1074/mcp.M700342-MCP200 (2008).
- 5 5 Muyldermans, S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem* 82, 775-797, doi:10.1146/annurev-biochem-063011-092449 (2013).
- 6 6 Lee, S. Y. et al. Ube3a, the E3 ubiquitin ligase causing Angelman syndrome and linked to autism, regulates protein homeostasis through the proteasomal shuttle Rpn10. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 71, 2747-2758, doi:10.1007/s00018-013-1526-7 (2014).
- 7 7 Schembri, L. et al. The HA tag is cleaved and loses immunoreactivity during apoptosis. *Nature methods* 4, 107-108, doi:10.1038/nmeth0207-107 (2007).
- 8 8 Wegner, G. J., Lee, H. J. & Corn, R. M. Characterization and optimization of peptide arrays for the study of epitopeantibody interactions using surface plasmon resonance imaging. *Analytical chemistry* 74, 5161-5168 (2002).
- 9 9 Hilpert, K. et al. Anti-c-myc antibody 9E10: epitope key positions and variability characterized using peptide spot synthesis on cellulose. *Protein Eng* 14, 803-806 (2001).
- 10 10 De Genst, E. J. et al. Structure and properties of a complex of alpha-synuclein and a single-domain camelid antibody. *Journal of molecular biology* 402, 326-343, doi:10.1016/j.jmb.2010.07.001 (2010).
- 11 11 Traenkle, B. et al. Monitoring interactions and dynamics of endogenous beta-catenin with intracellular nanobodies in living cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, doi:10.1074/mcp.M114.044016 (2015).
- 12 12 Huang, L. et al. SPECT imaging with 99mTc-labeled EGFR-specific nanobody for *in vivo* monitoring of EGFR expression. *Molecular imaging and biology: MIB: the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 10, 167-175, doi:10.1007/s11307-008-0133-8 (2008).
- 13 13 Vaneycken, I. et al. Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25, 2433-2446, doi: 10.1096/fj. 10-180331 (2011).
- 14 14 Broisat, A. et al. Nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for the nuclear imaging of atherosclerotic lesions. *Circulation research* 110, 927-937, doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.265140 (2012).
- 15 15 Ries, J., Kaplan, C., Platonova, E., Eghlidi, H. & Ewers, H. A simple, versatile method for GFP-based superresolution microscopy via nanobodies. *Nature methods* 9, 582-584, doi:10.1038/nmeth.1991 (2012).
- 16 16 Yoon, M., Moir, R. D., Prahlad, V. & Goldman, R. D. Motile properties of vimentin intermediate filament networks in living cells. *The Journal of cell biology* 143, 147-157 (1998).
- 17 17 Leonhardt, H. et al. Dynamics of DNA replication factories in living cells. *The Journal of cell biology* 149, 271-280 (2000).
- 18 18 Maier, J., Traenkle, B. & Rothbauer, U. Real-time analysis of epithelial-mesenchymal transition using fluorescent single-domain antibodies. *Scientific reports* 5, 13402, doi: 10.1038/srep13402 (2015).
- 19 19 Kirchhofer, A. et al. Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nature structural & molecular biology* 17, 133-138, doi:10.1038/nsmb.1727 (2010).
- 20 20 Kabsch, W. Xds. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66, 125-132, doi:10.1107/S0907444909047337 (2010).
- 21 21 McCoy, A. J. et al. Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography* 40, 658-674, doi:10.1107/S0021889807021206 (2007).

- 22 Winn, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 67, 235-242, doi: 10.1107/S0907444910045749 (2011).
- 23 Stein, N. CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. *Journal of applied crystallography* 41, 641-643, doi:10.1107/S0021889808006985 (2008).
- 5 24 Adams, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66, 213-221, doi:10.1107/S0907444909052925 (2010).
- 25 Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 53, 240-255, doi:10.1107/S0907444996012255 (1997).
- 10 26 Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 60, 2126-2132, doi: 10.1107/S0907444904019158 (2004).
- 27 Chen, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66, 12-21, doi: 10.1107/S0907444909042073 (2010).

15 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ChromoTek GmbH
Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der
Universität Tübingen
- 20 <120> Etiqueta de epítipo y método de detección, captura y/o purificación de polipéptidos etiquetados
- <130> CHR161101PCT
- 25 <150> EP15194838.7
<151> 16/11/2015
- <160> 46
- 30 <170> BiSSAP 1.3.6
- <210> 1
<211> 8
<212> PRT
- 35 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> péptido epítipo
- 40 <220>
<221> VARIANTE
<222> 2
<223> K o una sustitución
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> 3
<223> A o R, o una sustitución conservativa de A o R
- 50 <220>
<221> VARIANTE
<222> 5
<223> V o una sustitución conservativa de V
- 55 <220>
<221> VARIANTE
<222> 7
<223> H o una sustitución conservativa de H
- 60 <400> 1

Arg Xaa Xaa Ala Xaa Ser Xaa Trp
1 5

<210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> péptido epítipo
 <220>
 10 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> D o una sustitución conservativa de D
 <220>
 15 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> K o una sustitución
 <220>
 20 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> A o R, una sustitución conservativa de A o R
 <220>
 25 <221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> V o una sustitución conservativa de V
 <220>
 30 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> H o una sustitución conservativa de H
 <220>
 35 <221> VARIANTE
 <222> 11
 <223> Q o una sustitución conservativa de Q
 <220>
 40 <221> VARIANTE
 <222> 12
 <223> Q o una sustitución conservativa de Q
 <400> 2
 45
 Pro Xaa Arg Xaa Xaa Ala Xaa Ser Xaa Trp Xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 8
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido epítipo 8 aa
 55
 <400> 3
 Arg Lys Ala Ala Val Ser His Trp
 1 5
 <210> 4
 60

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> péptido epítopo
 <400> 4

10 Pro Asp Arg Lys Ala Ala Val Ser His Trp Gln Gln
 1 5 10

<210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido epítopo

20 <400> 5

Pro Val Arg Ser Ala Ala Leu Ser Gln Trp Ser Ser
 1 5 10

25 <210> 6
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> BC2-Nb

<400> 6

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

35 <210> 7
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Región marco 1 de BC2-Nb

<400> 7

45

ES 2 800 069 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Thr Ala Ser
 20 25

5 <210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR1 de BC2-Nb
 <400> 8

Gly Phe Thr Leu Asp His Tyr Asp
 1 5

15 <210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Región marco 2 de BC2-Nb
 <400> 9

Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser
 1 5 10 15
 Cys

25 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2 de BC2-Nb
 35 <400> 10

Ile Asn Asn Ser Asp Asp Asp Thr Tyr
 1 5

40 <210> 11
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> región marco 3 de BC2-Nb
 <400> 11

ES 2 800 069 T3

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Phe Met Asp Asn Ala
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Glu
 35

5 <210> 12
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR3 de BC2-Nb
 <400> 12

Ala Arg Gly Cys Lys Arg Gly Arg Tyr Glu Tyr Asp Phe Trp
 1 5 10

15 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Región marco 4 de BC2-Nb
 <400> 13

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

25 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido epítipo 10 aa

35 <400> 14

Pro Asp Arg Lys Ala Ala Val Ser His Trp
 1 5 10

40 <210> 15
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador directo GFP (BC2T)

<400> 15
 gcaccatgga tggtagcaa gggcgagg 28

50 <210> 16
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 800 069 T3

	<220>		
	<223> Cebador inverso GFP (BC2T)		
5	<400> 16		
	gacgtcgact tactgctgcc agtgactaac a	31	
	<210> 17		
	<211> 23		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo His6-GFP (BC2T)		
15	<400> 17		
	cagggatccg agtgagcaag ggc	23	
	<210> 18		
	<211> 29		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso His6-GFP (BC2T)		
25	<400> 18		
	cagggatcct tactgctgcc agtgactaa	29	
	<210> 19		
	<211> 25		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo GFP BC2Tmut		
35	<400> 19		
	ggatccgatg gtagagcaagg gcgag	25	
40	<210> 20		
	<211> 65		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador inverso GFP (BC2Tmut)		
	<400> 20		
50	ggtaccttag ctgctccact ggctcagcgc cgcgctccgg accggcttgt acagctcgtc	60	
	catgc	65	
	<210> 21		
	<211> 30		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo His6-GFP (BC2T-10)		
60	<400> 21		

ES 2 800 069 T3

ccccgatcc gatggtgagc aaggcgagg 30
 <210> 22
 <211> 64
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso His6-GFP (BC2T-10)
 10 <400> 22
 ccccggtacc ttaccaatgt gacaccgctg ctttgcggtc aggcttgtag agctcgtcca 60
 tgcc 64
 15 <210> 23
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador directo His6-GFP (BC2T-8)
 <400> 23
 25 ccccgatcc gatggtgagc aaggcgagg 30
 <210> 24
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador inverso His6-GFP (BC2T-8)
 <400> 24
 35 ccccggtacc ttaccagtg gaaacggctg ctttagcctt gtacagctcg tccatg 56
 <210> 25
 <211> 27
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo eGFP (BC2T)
 45 <400> 25
 aagctagcgc taccggtcgc caccatg 27
 <210> 26
 <211> 62
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso eGFP (BC2T)
 55 <400> 26
 aaggtacctt attgctgcca gtgactaaca gccgcttttc tgtctggctt gtacagctcg 60
 tc 62

ES 2 800 069 T3

<210> 27
 <211> 51
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Nhel - BC2T - BglIII

 10 <400> 27
 gctagcatgc cccgatcgtaa ggctgaggc tctcattggc aacagagatc t 51

 <210> 28
 <211> 41
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador directo mCherry-Vimentina (BC2T)
 20
 <400> 28
 aaaagcttag gtggaggagg ttctccacc aggtccgtg c 41

 <210> 29
 <211> 62
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Cebador inverso mCherry-Vimentina (BC2T)

 <400> 29

 aaggtaccct attgctgcc a gtgactaaca gccgcttttc tgtctggttc aaggtcatcg 60

 tg 62

 35
 <210> 30
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador directo GFP-PCNA (BC2T)

 <400> 30
 45 gtatggcttc gtgggatcc ccc 23

 <210> 31
 <211> 78
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso GFP-PCNA (BC2T)

 55 <400> 31

ggggtctaga ctaaaggtac cctattgctg ccagtgacta acagccgctt ttctgtctgg 60

agatccttct tcatacctc 78

- 5 <210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> péptido epítopo
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> 1
<223> P o A
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> 2
<223> D o una sustitución conservativa de D
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> 4
<223> K o una sustitución
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> 5
<223> A o R, o una sustitución conservativa de A o R
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> 7
<223> V o una sustitución conservativa de V
- 40 <220>
<221> VARIANTE
<222> 9
<223> H o una sustitución conservativa de H
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> 11
<223> Q o una sustitución conservativa de Q
- 50 <220>
<221> VARIANTE
<222> 12
<223> Q o una sustitución conservativa de Q
- <400> 32

Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Ala Xaa Ser Xaa Trp Xaa Xaa
1 5 10

- 55 <210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 800 069 T3

<220>
 <223> Péptido epítopo

5 <400> 33

Pro Asp Arg Val Arg Ala Val Ser His Trp Ser Ser
 1 5 10

10 <210> 34
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido epítopo

<400> 34

Ala Asp Arg Val Arg Ala Val Ser His Trp Ser Ser
 1 5 10

20 <210> 35
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> mCherry_BC2T_dir

30 <400> 35
 gtacagtggc cggatcgca aagcggcggg gagccattgg cagcagtaaa 50

35 <210> 36
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> mCherry_BC2T_inv

40 <400> 36
 agctttact gctgccaatg gctcaccgcc gctttgcat cggaccact 50

45 <210> 37
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> mCherry_SEQ33_dir

50 <400> 37
 gtacagtggc cggatcgcg tgcgcggcgg gagccattgg agcagctaaa 50

55 <210> 38
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> mCherry_SEQ33_inv

ES 2 800 069 T3

<400> 38
 agcttttagc tgctcaatg gctcaccgcg cgcacgcat cggaccact 50

5 <210> 39
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> mCherry_SEQ34_dir

<400> 39
 gtacagtggg gcggatcgcg tgcgcgagg gagccattgg agcagctaaa 50

15 <210> 40
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> mCherry_SEQ34_inv

<400> 40
 agcttttagc tgctcaatg gctcaccgcg cgcacgcat cggaccact 50

25 <210> 41
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> mCherry_BC2T_dir2

<400> 41
 tatgccggat cgcaaagcgg cggtagacca ttggcagcag ggctcg 46

35 <210> 42
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> mCherry_BC2T_inv2

<400> 42
 gatccgagcc ctgctgcaa tggctaccg cgccttgcg atccggca 48

45 <210> 43
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> mCherry_SEQ33_dir2

<400> 43
 tatgccggat cgcgtgcgcg cggtagacca ttggagcagc ggctcg 46

55 <210> 44
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>

65

ES 2 800 069 T3

<223> mCherry_SEQ33_inv2

<400> 44
gatccgagcc gctgctccaa tggctcaccg cgcgcacgcg atccggca 48

5

<210> 45
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> mCherry_SEQ34_dir2

<400> 45
tatggcggat cgcggtcgcg cggtagacca ttggagcagc ggctcg 46

15

<210> 46
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> mCherry_SEQ34_inv2

<400> 46
gatccgagcc gctgctccaa tggctcaccg cgcgcacgcg atccgcca 48

25

REIVINDICACIONES

1. Péptido epítipo aislado que tiene de 12 a 25 aminoácidos, en donde la secuencia de aminoácidos comprende una secuencia según se define en SEQ ID NO: 32 ($X_1X_2RX_4X_5AX_7SX_9WX_{11}X_{12}$),
 5 en donde X_1 puede ser P o A,
 en donde X_2 puede ser D o una sustitución conservativa de D;
 en donde X_4 puede ser K, o una sustitución conservativa de K o serina;
 en donde X_5 puede ser A o R, o una sustitución conservativa de A o R;
 en donde X_7 puede ser V o una sustitución conservativa de V,
 10 en donde X_9 puede ser H o una sustitución conservativa de H,
 en donde X_{11} y X_{12} puede ser Q o una sustitución conservativa de Q,
 en donde el péptido epítipo aislado no comprende una secuencia de aminoácidos como la definida por la SEQ ID NO: 3 (RKA AVSHW).
- 15 2. Péptido epítipo aislado que tiene una secuencia de aminoácidos definida por la SEC ID NO: 5 (PV RSAALSQWSS), o que tiene una secuencia de aminoácidos definida por SEQ ID NO: 33 (PDRVRAVSHWSS), o que tiene una secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 34 (ADRVRAVSHWSS).
3. Uso del péptido epítipo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 como una etiqueta de epítipo N-terminal o C-
 20 terminal.
4. Construcción que consiste en un polipéptido y al menos un péptido epítipo según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en su extremo N-terminal o C-terminal.
- 25 5. Ácido nucleico que codifica un péptido epítipo aislado según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde opcionalmente el ácido nucleico es ARN, ADN, APN o LNA (siglas en inglés de ácido nucleico bloqueado).
6. Construcción de expresión de ácido nucleico que comprende al menos un ácido nucleico de la reivindicación 5, y
 30 opcionalmente un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés y/o al menos un engarce.
7. Construcción de expresión de ácido nucleico de la reivindicación 6, que comprende además un engarce, en donde el engarce comprende opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio de escisión o un sitio reconocido por una enzima localizada adyacente al ácido nucleico de la reivindicación 5, en donde opcionalmente el sitio de escisión es reconocido por una enzima proteasa.
- 35 8. Célula hospedadora que comprende un ácido nucleico según se define en la reivindicación 5, o una construcción de expresión de ácido nucleico según se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7; en donde la célula hospedadora se selecciona opcionalmente del grupo que comprende una célula procariota, célula eucariota, célula bacteriana, una célula vegetal, una célula fúngica, una célula de nematodo, una célula de ave, una célula de pez, una
 40 célula de levadura, una célula de insecto y una célula de mamífero.
9. Método para introducir un ácido nucleico según se define en la reivindicación 5, o una construcción de expresión de ácido nucleico según se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en una célula hospedadora, en donde el ácido nucleico se fusiona al ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés en la célula hospedadora,
 45 seleccionándose el método del grupo que comprende la edición del genoma con CRISPR/Cas, métodos de edición del genoma utilizando nucleasas de dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras de actividad similar a activadores de la transcripción (TALEN) o meganucleasas, métodos basados en reactivos que utilizan reactivos tales como lípidos catiónicos, fosfato de calcio o DEAE-dextrano, transducción, transfección y métodos basados en instrumentos tales como la electroporación, microinyección y laserfección.
- 50 10. Método *in vitro* para determinar la presencia, localización subcelular y/o cantidad de un polipéptido de interés que comprende un péptido epítipo según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende las siguientes etapas:
- 55 a) administrar un ligando de afinidad capaz de unir específicamente el péptido epítipo a una muestra, a una célula hospedadora según se define en la reivindicación 8, o a un lisado celular de una célula hospedadora según se define en la reivindicación 8, en donde el ligando de afinidad comprende una porción detectable;
 b) determinar la presencia, localización subcelular y/o cantidad del polipéptido de interés que comprende el péptido epítipo mediante la detección de la porción detectable.
- 60 11. Método *in vitro* para determinar la presencia, localización subcelular y/o cantidad de un polipéptido de interés que comprende un péptido epítipo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende las siguientes etapas:
- 65 a) administrar un ligando de afinidad capaz de unir específicamente el péptido epítipo a una muestra, a una célula

hospedadora como se define en la reivindicación 8, o a un lisado celular de una célula hospedadora como se define en la reivindicación 8;

- 5 b) administrar al menos una pareja de unión secundaria capaz de unirse al ligando de afinidad, al polipéptido etiquetado o al complejo construido por ambos, del paso a), en donde la pareja de unión secundaria comprende una porción detectable y/o una porción inmovilizada o inmovilizable;
- c) determinar la presencia, localización subcelular y/o cantidad del polipéptido de interés que comprende el péptido epítipo mediante la detección de la porción detectable.

10 12. Método de la reivindicación 10 u 11, en donde la porción detectable es un marcador fluorescente, en donde la determinación se lleva a cabo midiendo el nivel de fluorescencia; o en donde la determinación de la presencia y/o cantidad del polipéptido de interés que comprende el péptido epítipo se lleva a cabo mediante transferencia de Western.

15 13. Método para purificar una construcción según se define en la reivindicación 4 o un polipéptido de interés que comprende un péptido epítipo según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el método comprende las etapas de

- 20 a) poner en contacto una muestra que comprende la construcción o el polipéptido de interés con un ligando de afinidad capaz de unirse específicamente al péptido epítipo, en donde opcionalmente antes o después de la unión, el ligando de afinidad se une a un soporte sólido;
- b) poner en contacto opcionalmente la muestra obtenida después del paso a) con una pareja de unión secundaria capaz de unirse al ligando de afinidad, al polipéptido etiquetado o al complejo construido por ambos, del paso a), en donde la pareja de unión secundaria antes o después de la unión, se une a un soporte sólido;
- 25 c) lavar el soporte sólido del paso a) o b) para eliminar los componentes no unidos y unidos de forma inespecífica; y, opcionalmente,
- d) eluir la construcción o el polipéptido de interés.

30 14. Método de la reivindicación 13, en donde la muestra de la etapa a) es un lisado de una célula hospedadora según se define en la reivindicación 8 que comprende una construcción de ácido nucleico según se define en la reivindicación 6 o 7, en donde el método comprende además el paso e) que sigue o sustituye al paso d) de la reivindicación 13, en donde el péptido epítipo se elimina del polipéptido de interés mediante escisión con una proteasa.

35 15. Método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en donde el ligando de afinidad es un anticuerpo, en donde el anticuerpo es un fragmento de un anticuerpo de dominio único, en donde el fragmento de un anticuerpo de dominio único comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la región marco 1, la CDR1, la región marco 2 según se define en la SEQ ID NO: 9, la CDR2, la región marco 3, la CDR3 y la región marco 4, en donde la CDR3 tiene la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 12, y en donde la cisteína presente en la región marco 2 es capaz de formar un puente disulfuro con la cisteína presente en la CDR3.

40 16. Método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en donde el ligando de afinidad es un anticuerpo, en donde el anticuerpo es un fragmento de un anticuerpo de dominio único, en donde el fragmento de un anticuerpo de dominio único comprende una secuencia de aminoácidos según se define en SEQ ID NO: 6.

45 17. Kit para capturar y/o detectar un polipéptido que comprende

- a) un ácido nucleico según se define en la reivindicación 5, o una construcción de expresión de ácido nucleico según se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7;
- 50 b) un ligando de afinidad que se une específicamente a un péptido epítipo según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el ligando de afinidad comprende opcionalmente una porción detectable, en donde opcionalmente la porción detectable es un marcador fluorescente; en donde opcionalmente el ligando de afinidad es un ligando de afinidad según se define en la reivindicación 15 o 16;
- c) opcionalmente, una pareja de unión secundaria específico para el ligando de afinidad, al polipéptido etiquetado o al complejo construido por ambos, en donde la pareja de unión secundaria comprende una porción detectable y/o una porción inmovilizada o inmovilizable; y
- 55 d) tampones y reactivos necesarios para un método según se define en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16.

18. Kit para capturar y/o purificar un polipéptido que comprende

- 60 a) un ácido nucleico según se define en la reivindicación 5, o una construcción de expresión de ácido nucleico según se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7;
- b) un ligando de afinidad que se une específicamente a un péptido epítipo según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde opcionalmente el ligando de afinidad está unido a un soporte sólido;
- 65 c) opcionalmente una pareja de unión secundaria específica para el ligando de afinidad, el polipéptido etiquetado o el complejo construido por ambos, en donde la pareja de unión secundaria está unida a un soporte sólido o es inmovilizable; y

- d) opcionalmente, un péptido epítipo aislado según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2;
- e) opcionalmente, un soporte sólido, en donde opcionalmente el soporte sólido se selecciona del grupo que comprende poliestireno, polipropileno, cloruro de polivinilo, poliacrilamida, celulosas, dextranos, polímeros y copolímeros sintéticos, látex, sílice, agarosa, metal, vidrio y carbono; y
- 5 f) tampones y reactivos necesarios para un método según se define en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16.
19. Uso de un fragmento de un anticuerpo de dominio único que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la región marco 1, la CDR1, la región marco 2 como se define en la SEQ ID NO: 9, la CDR2, la región marco 3, la CDR3 y la región marco 4, en donde la CDR3 tiene la secuencia de aminoácidos según se define en SEQ
- 10 ID NO: 12, y en donde la cisteína presente en la región marco 2 es capaz de formar un puente disulfuro con la cisteína presente en la CDR3, para detectar, capturar y/o purificar un polipéptido que comprende al menos un epítipo según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
20. Uso de la reivindicación 19, en donde el fragmento de un anticuerpo de dominio único comprende una secuencia
- 15 de aminoácidos según se define en SEQ ID NO: 6.

Figura 1

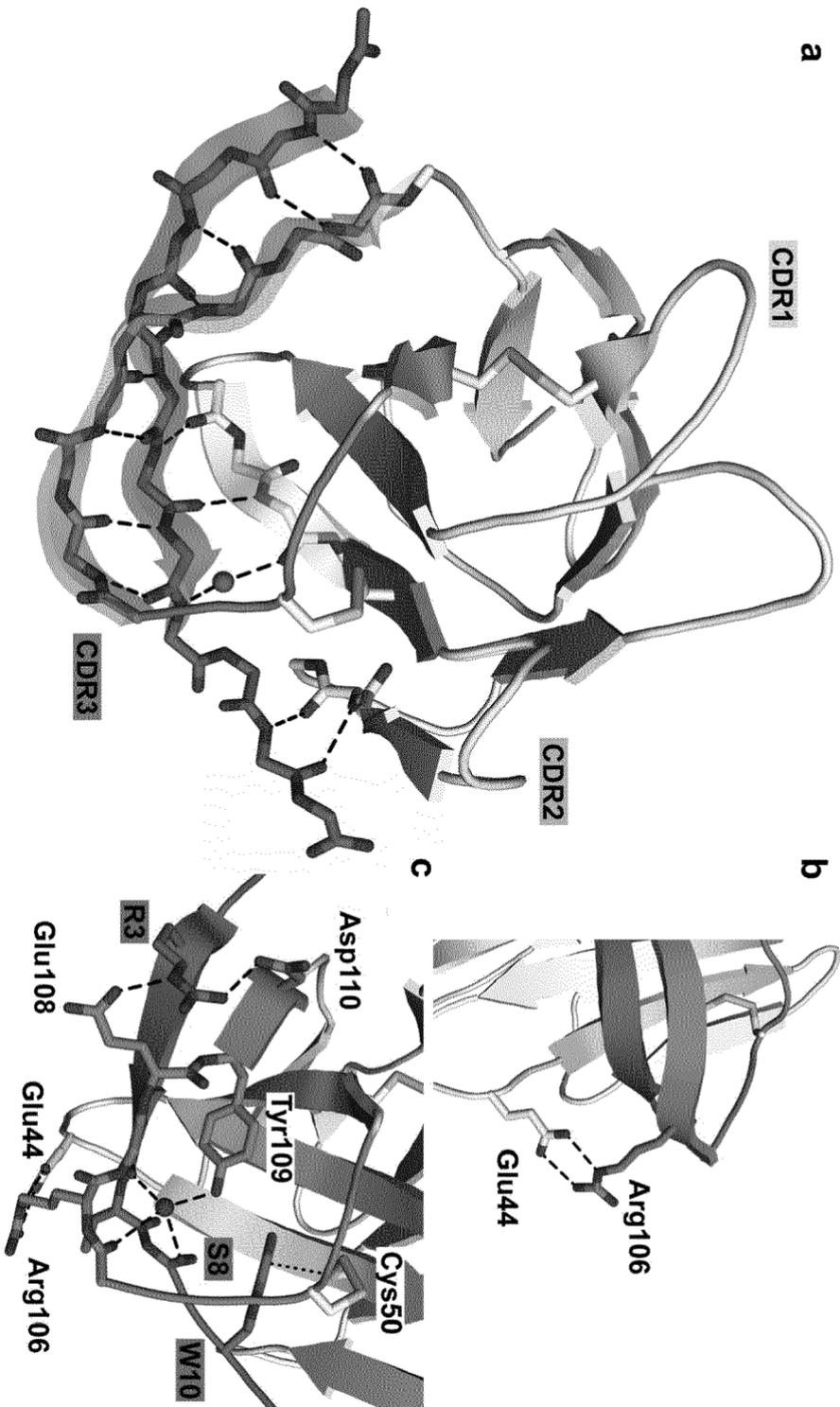


Figura 2

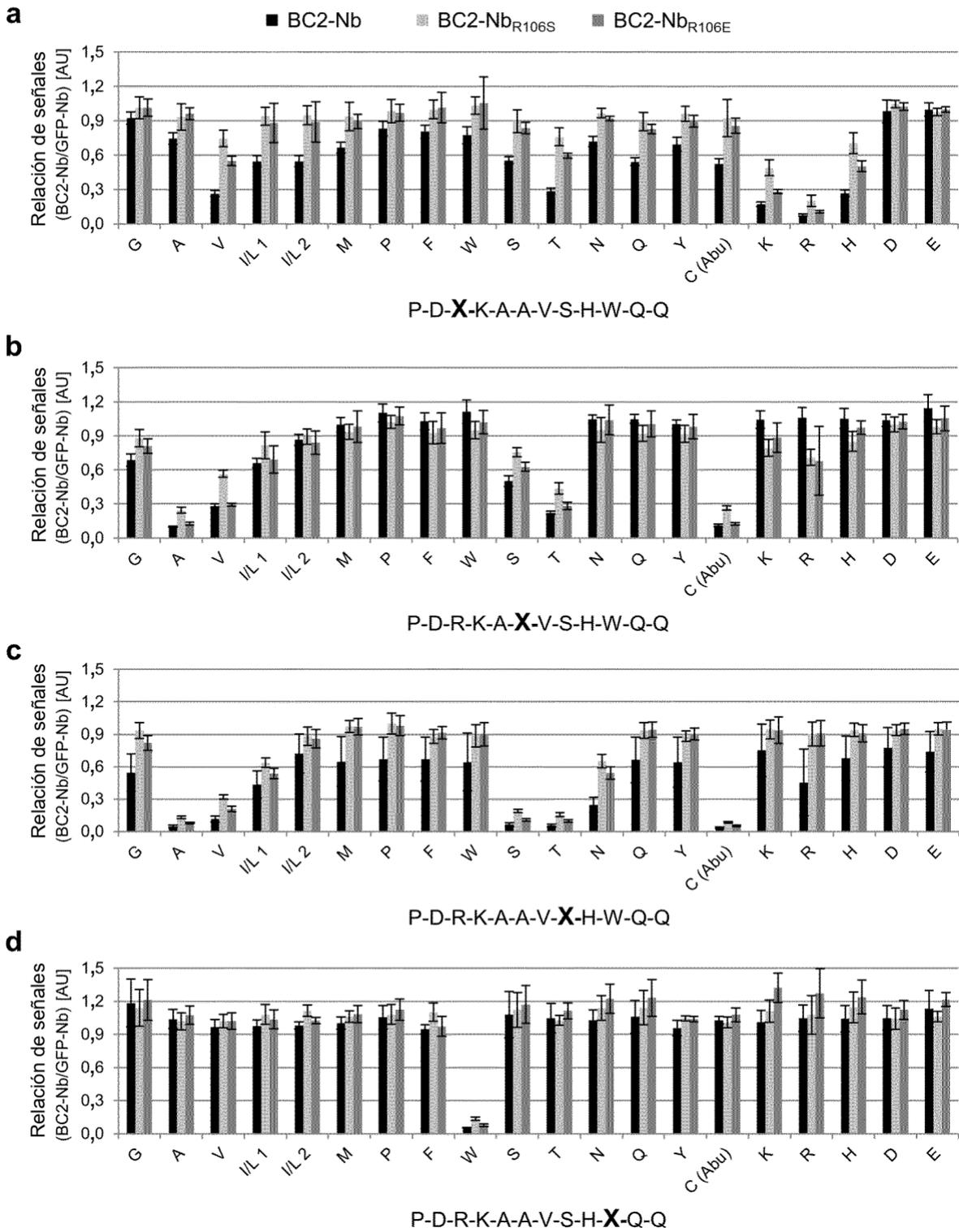


Figura 3

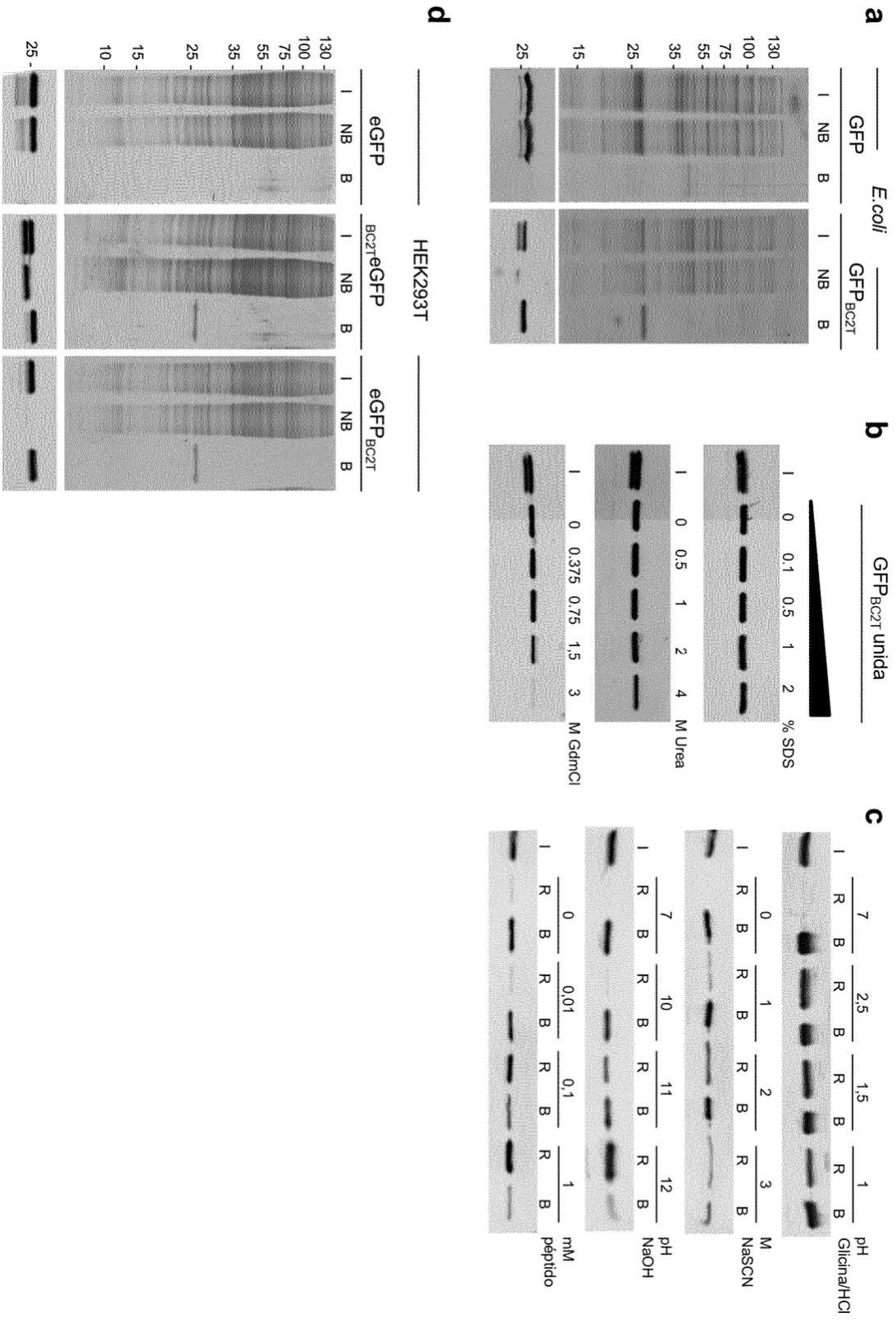


Figura 4

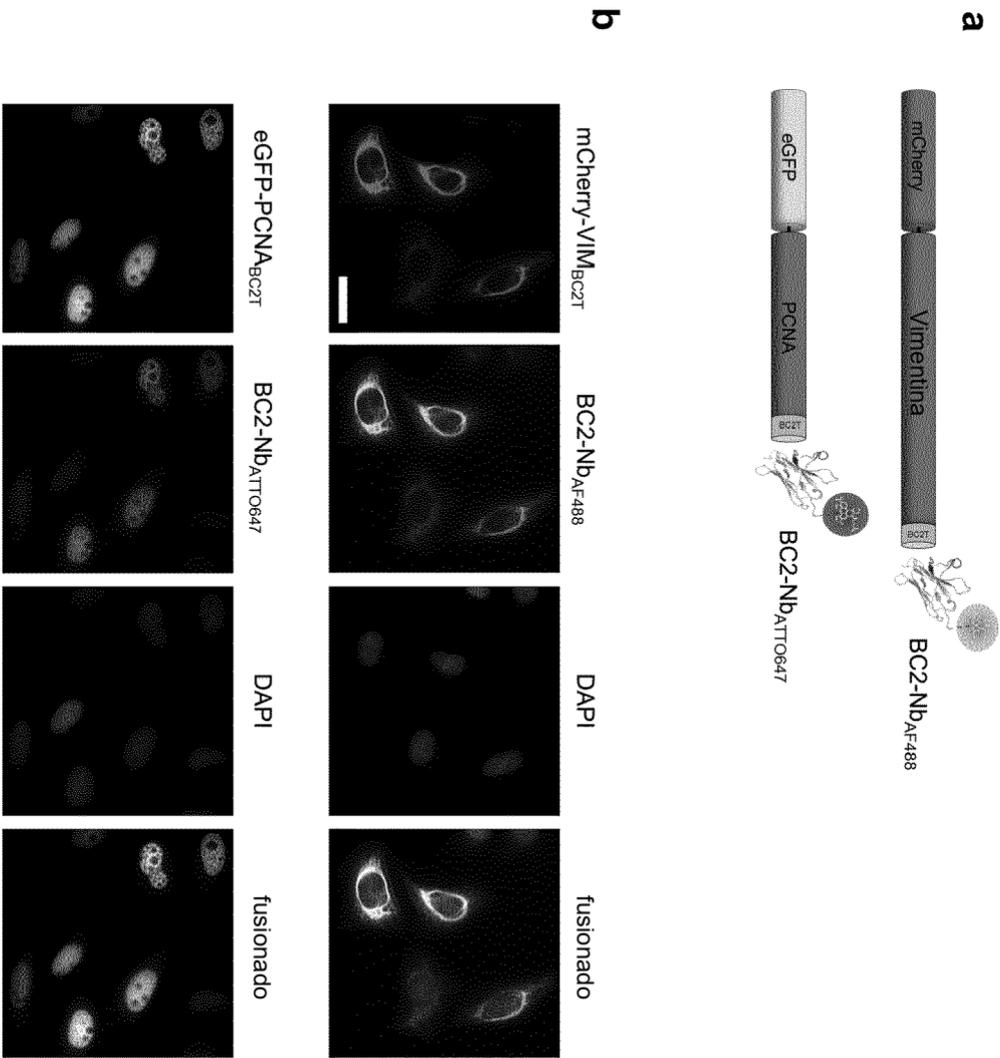
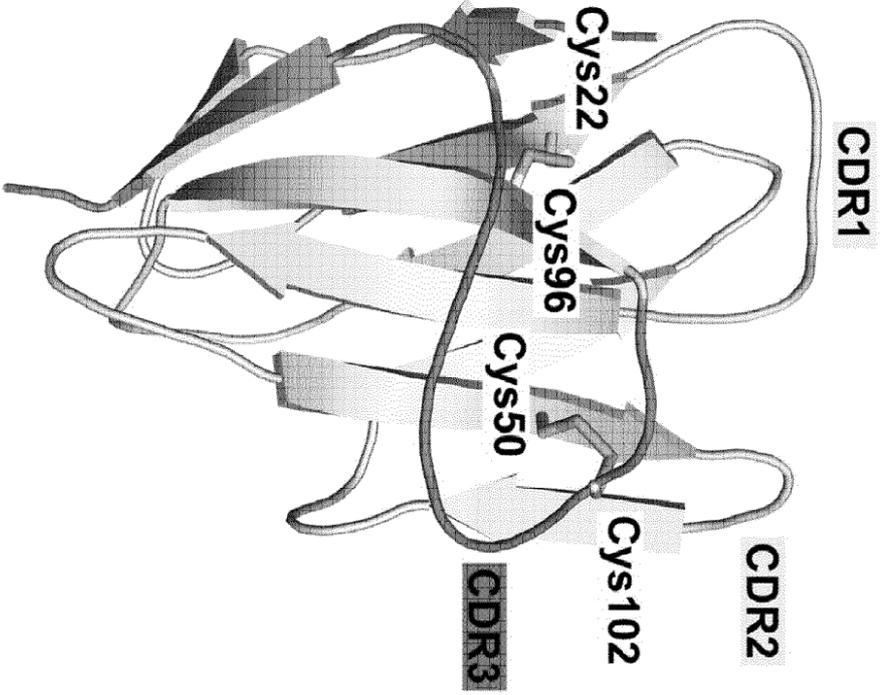


Figura 5

a



b

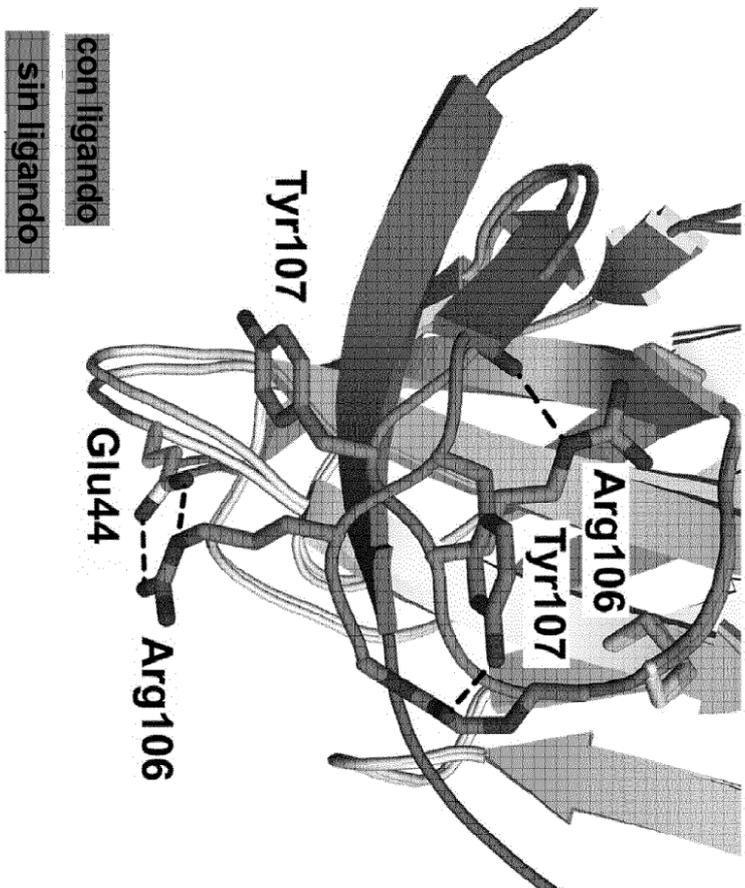


Figura 6

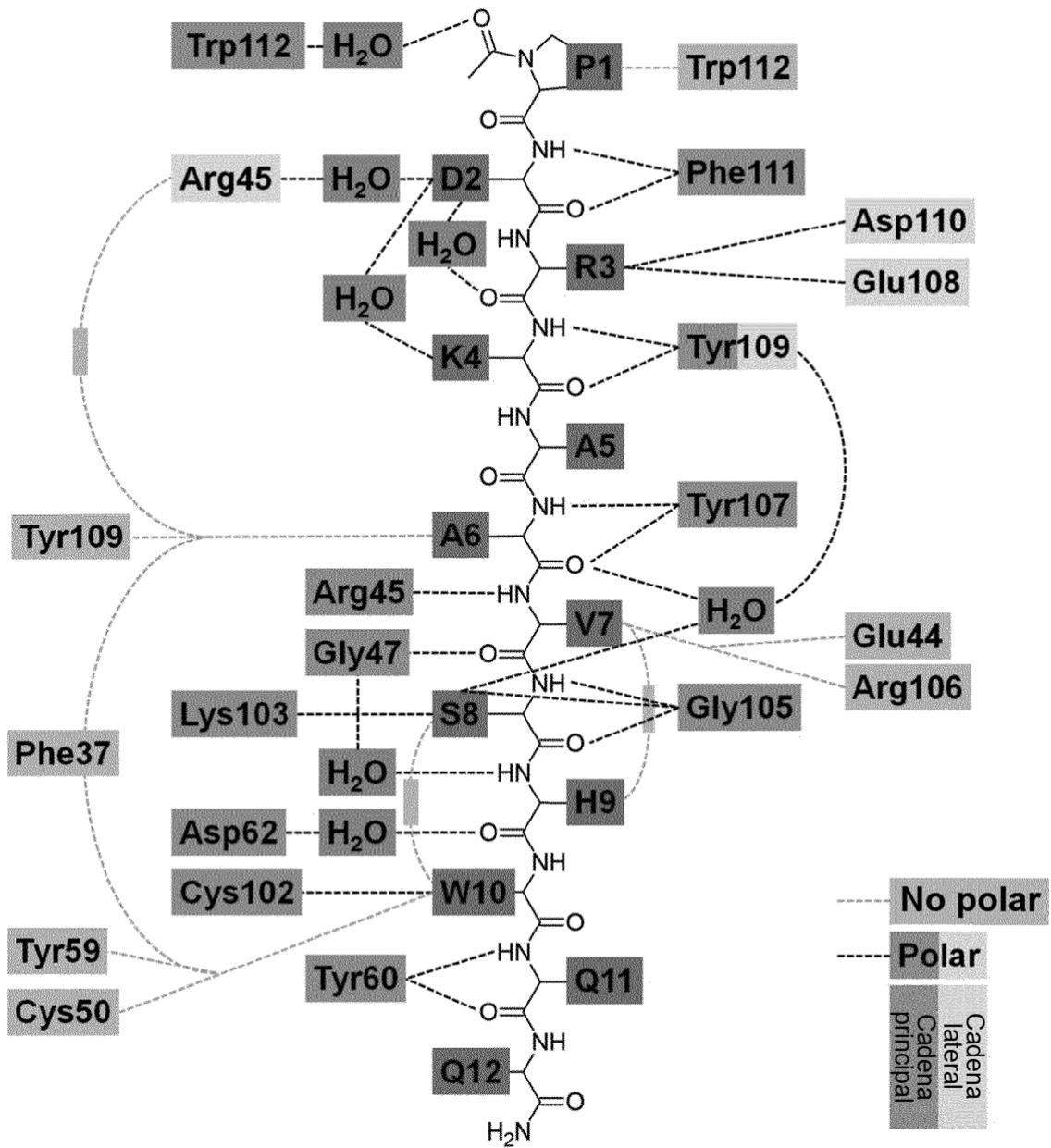


Figura 7

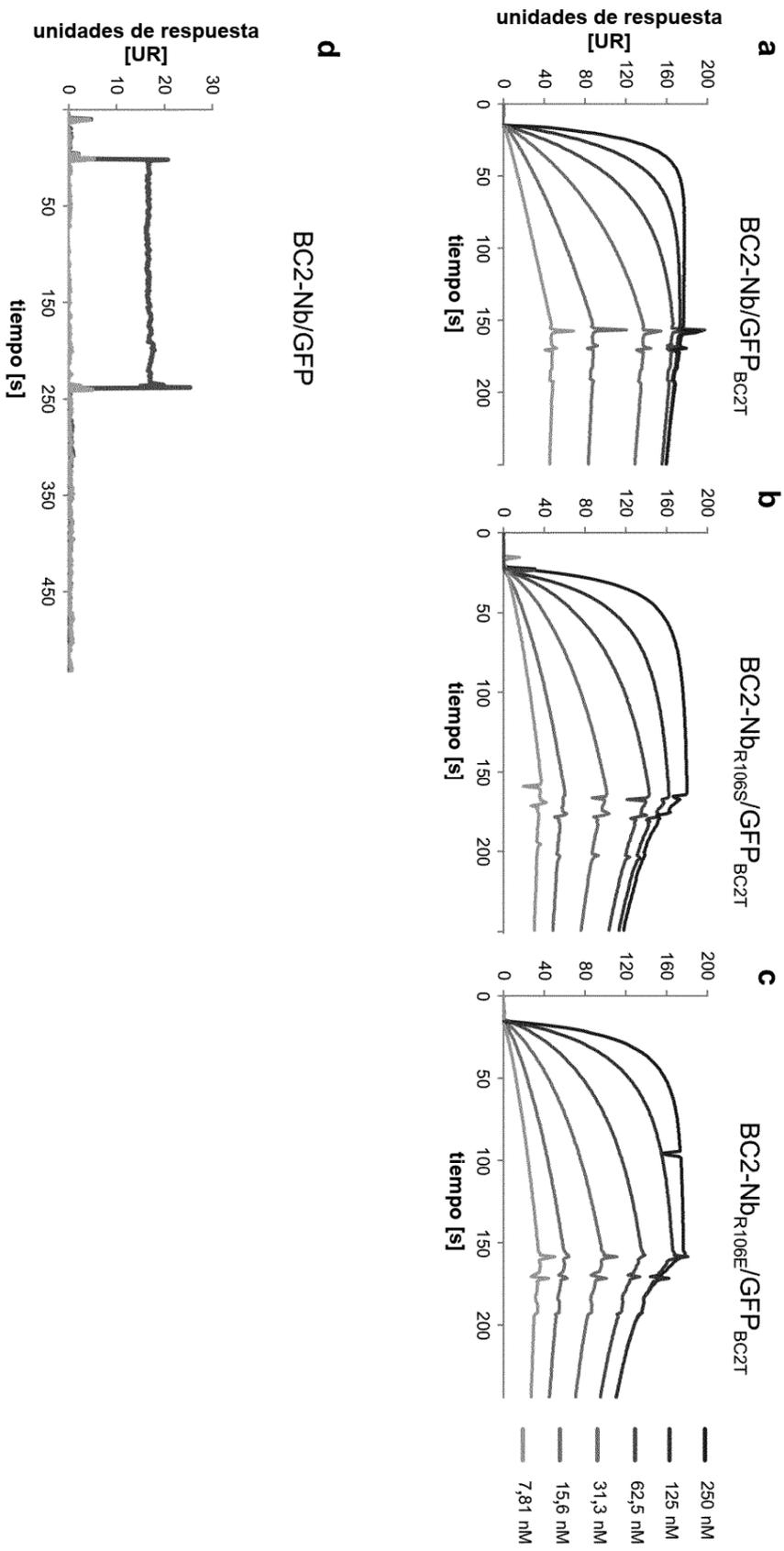


Figura 8

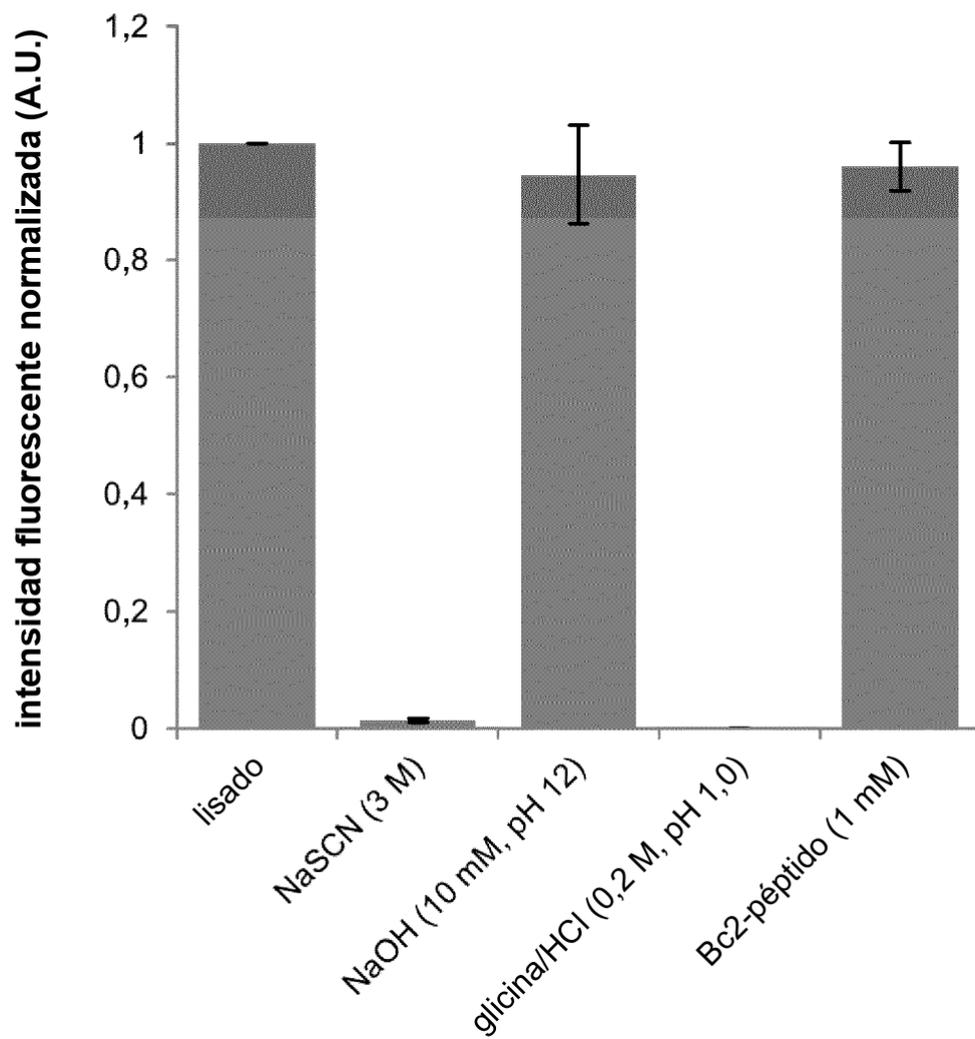
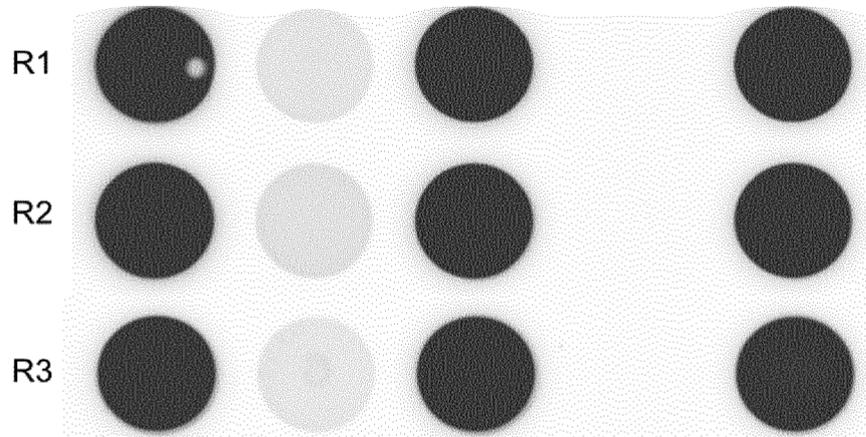


Figura 9

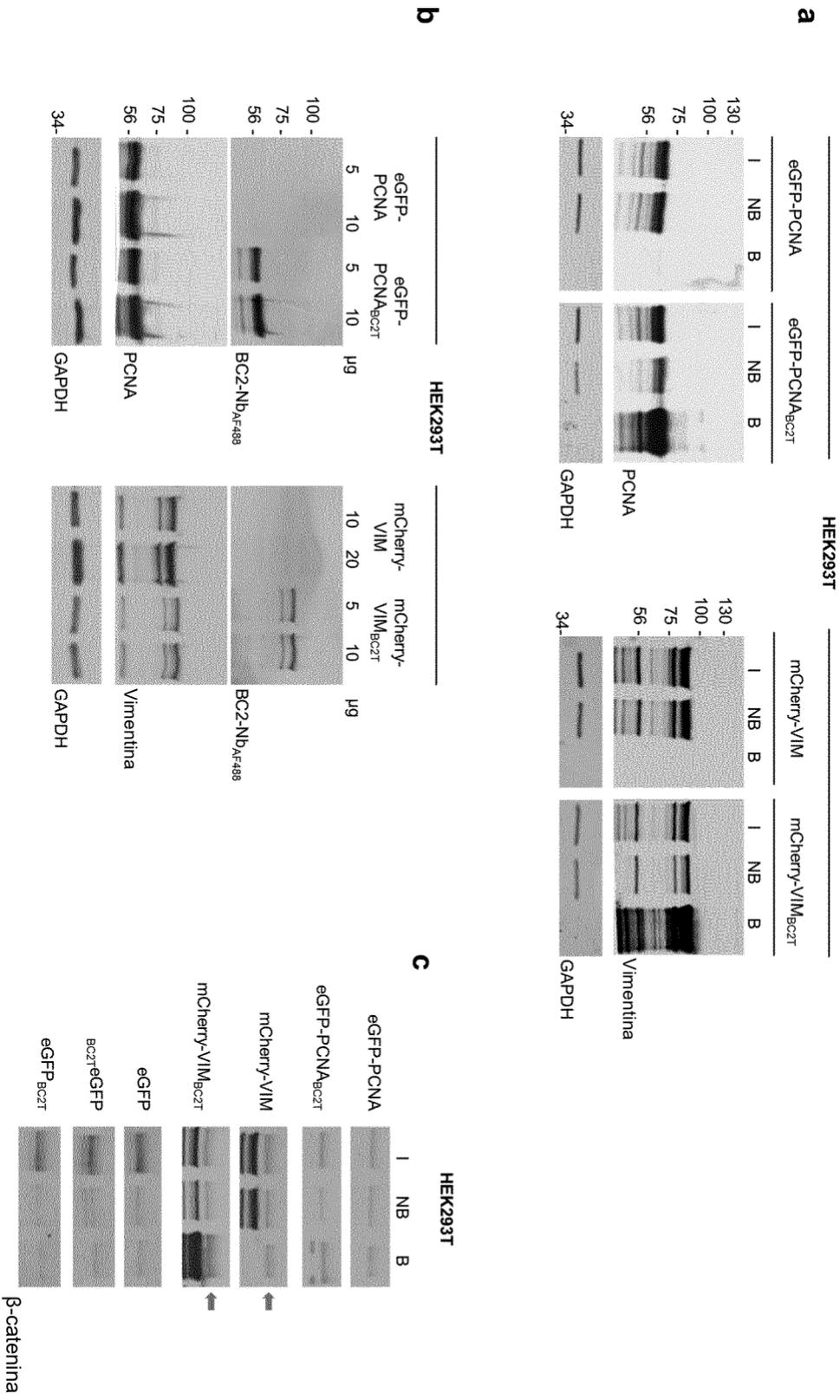


Figura 10

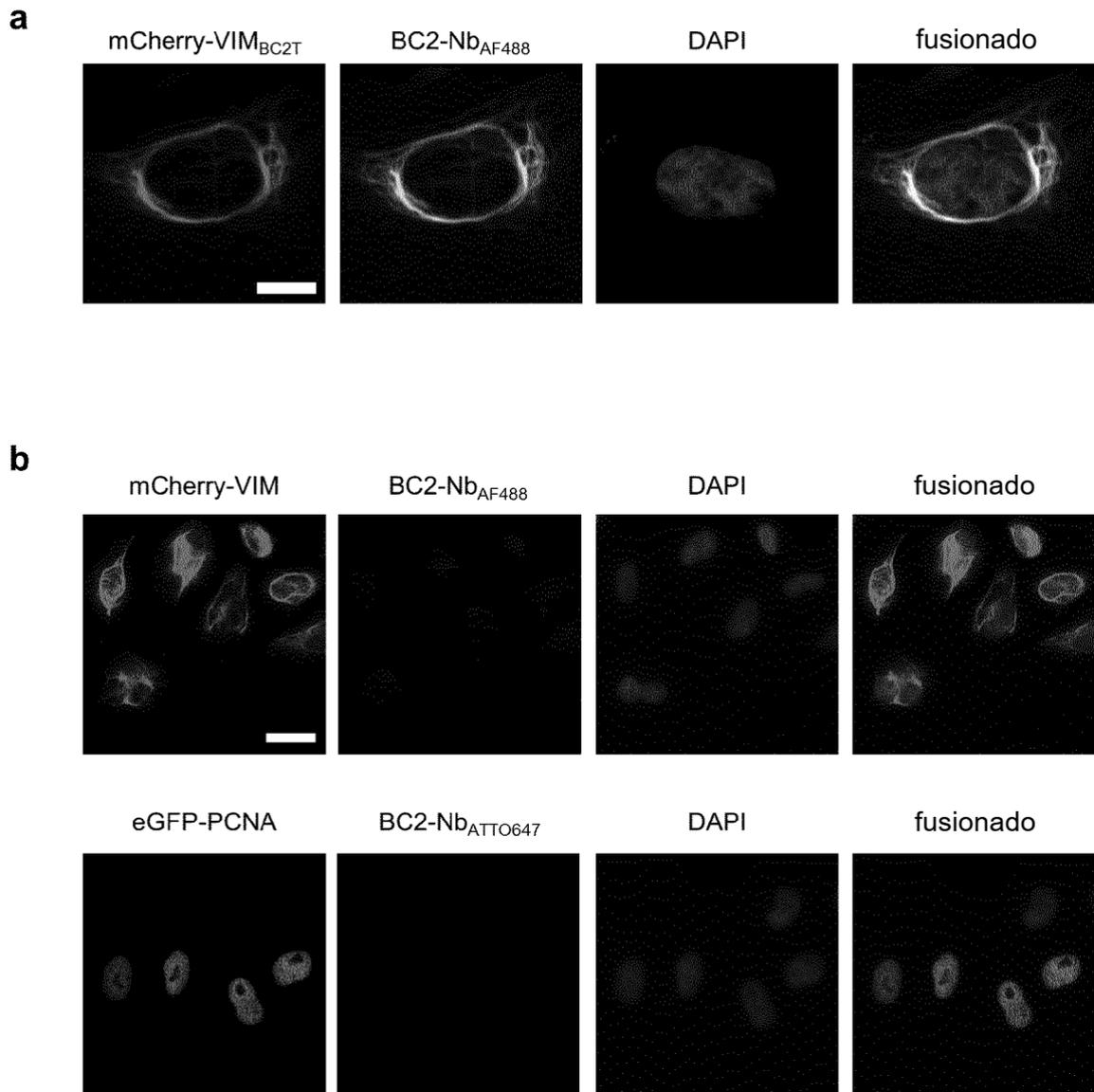


Figura 11

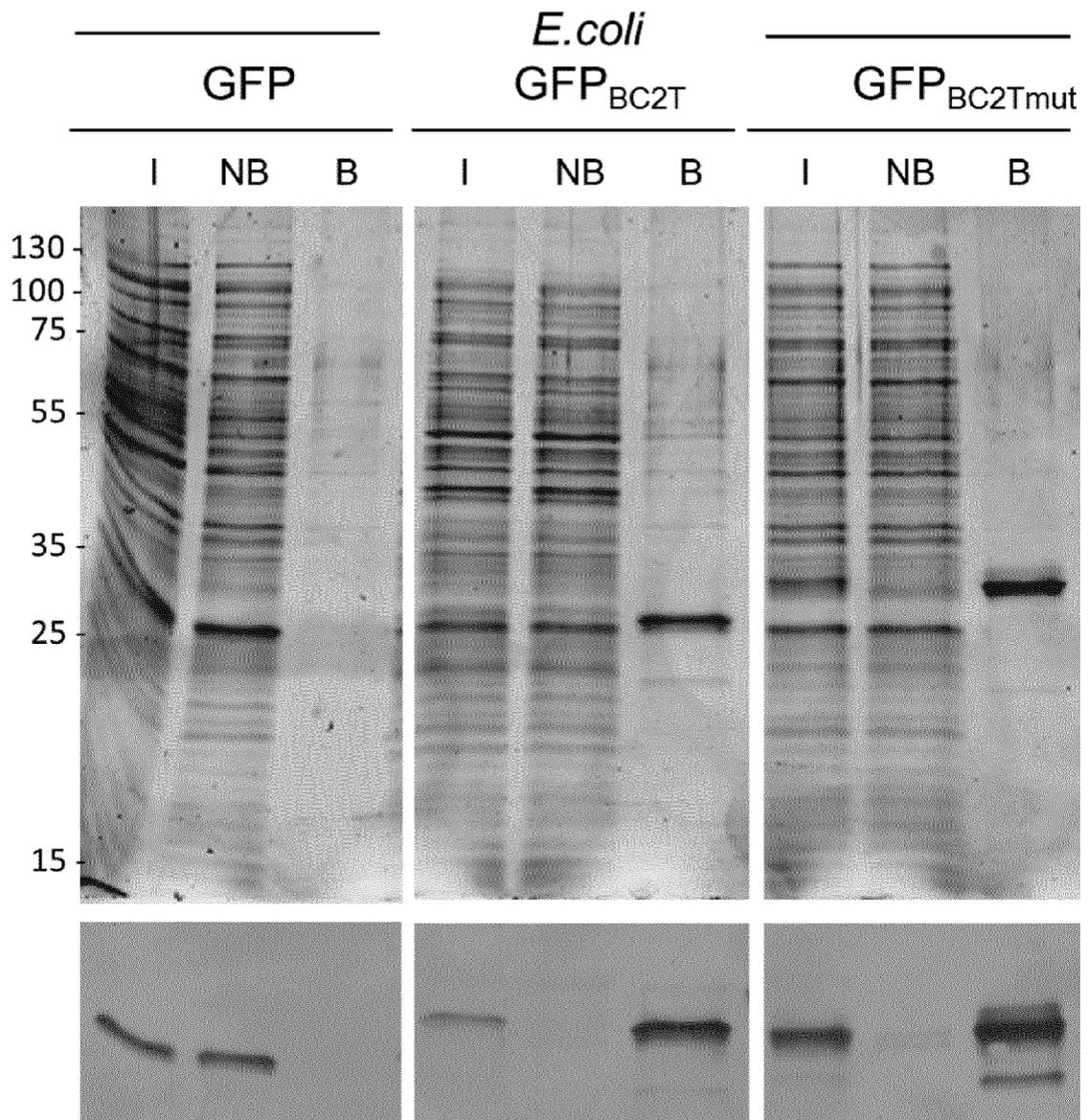


Figura 12

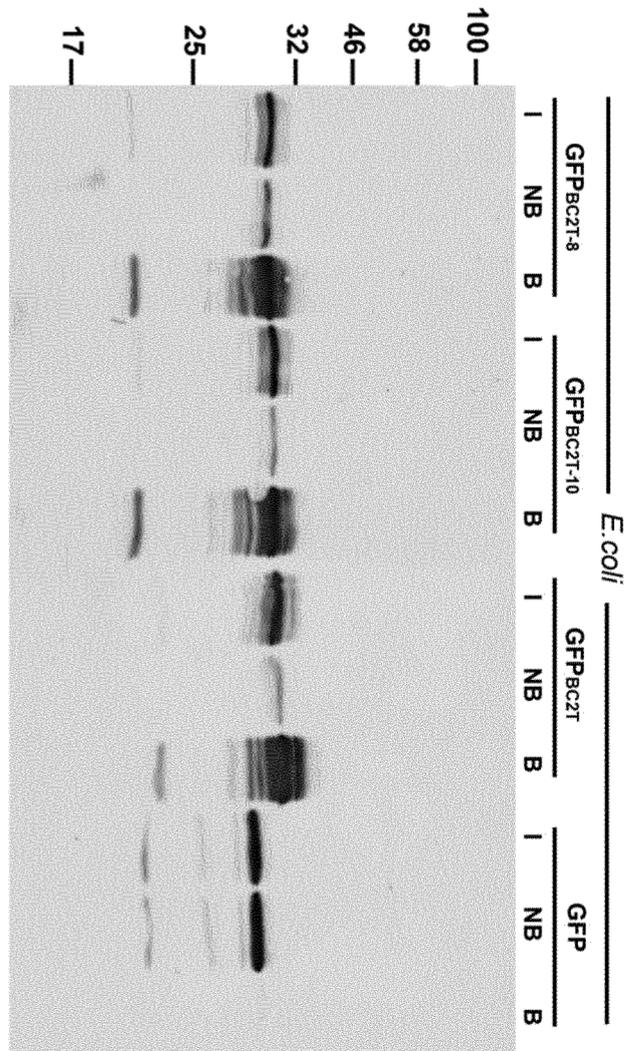


Figura 13

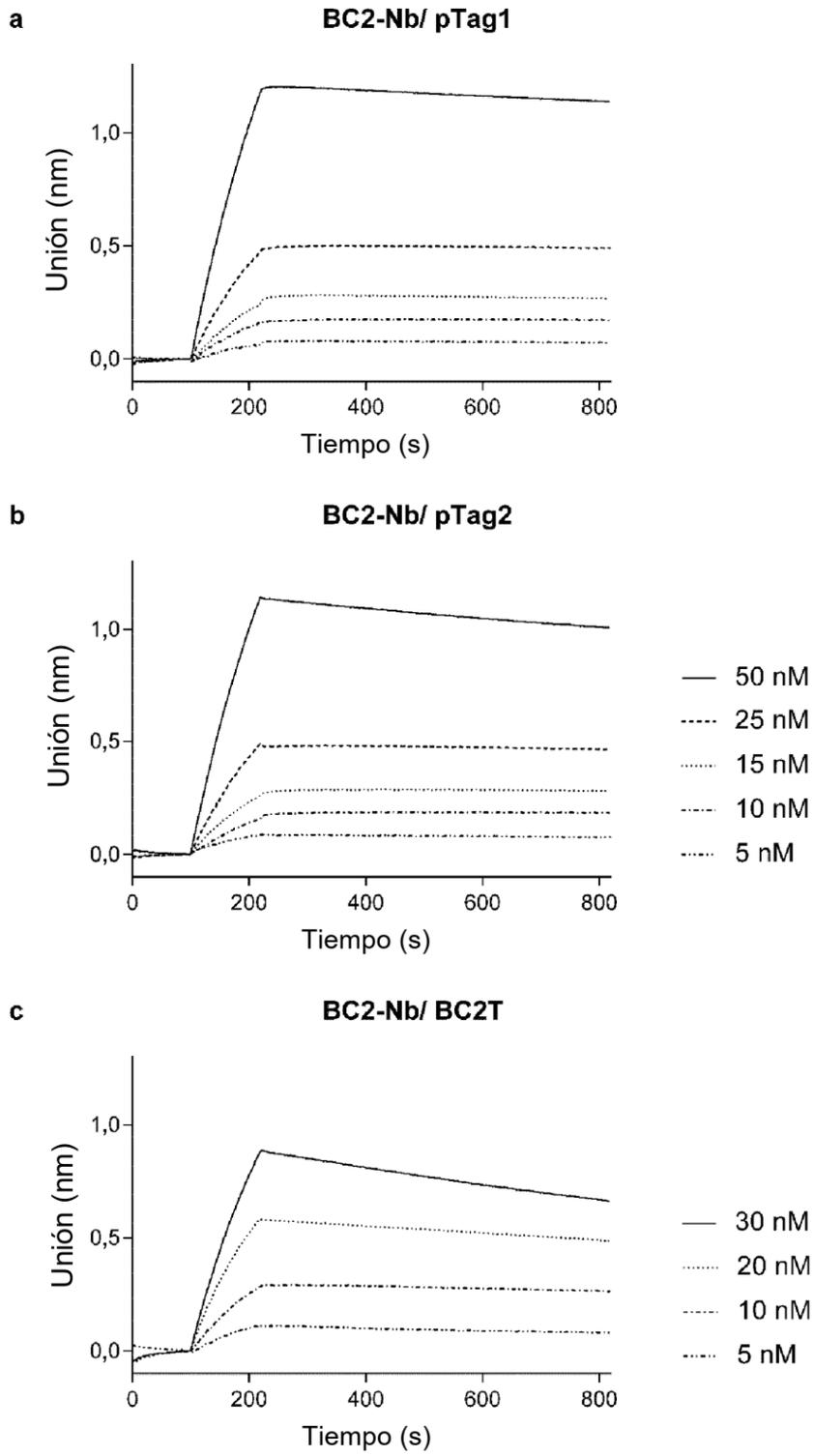
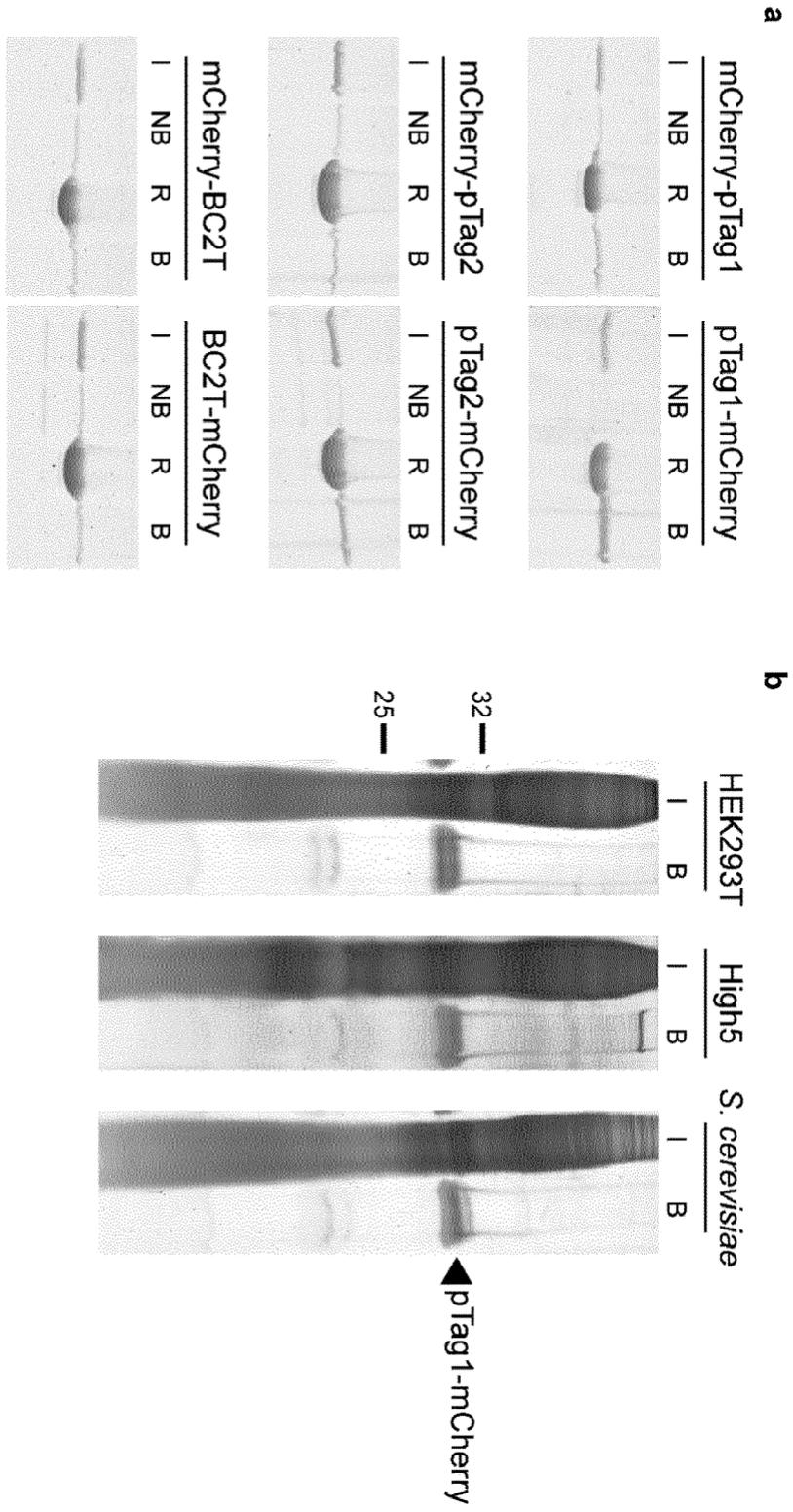


Figura 14



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- EP 15194838 [0162]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **DE GENST, E. et al.** Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, vol. 103, 4586-4591 [0161]
- **MUYLDERMANS, S.** Single domain camel antibodies: current status. *Journal of biotechnology*, 2001, vol. 74, 277-302 [0161]
- **GOVAERT, J. et al.** Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments. *The Journal of biological chemistry*, 2012, vol. 287, 1970-1979 [0161]
- **ROTHBAUER, U. et al.** A versatile nanotrapp for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2008, vol. 7, 282-289 [0161]
- **MUYLDERMANS, S.** Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*, 2013, vol. 82, 775-797 [0161]
- **LEE, S. Y. et al.** Ube3a, the E3 ubiquitin ligase causing Angelman syndrome and linked to autism, regulates protein homeostasis through the proteasomal shuttle Rpn10. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2014, vol. 71, 2747-2758 [0161]
- **SCHEMBRI, L. et al.** The HA tag is cleaved and loses immunoreactivity during apoptosis. *Nature methods*, 2007, vol. 4, 107-108 [0161]
- **WEGNER, G. J.; LEE, H. J. ; CORN, R. M.** Characterization and optimization of peptide arrays for the study of epitope-antibody interactions using surface plasmon resonance imaging. *Analytical chemistry*, 2002, vol. 74, 5161-5168 [0161]
- **HILPERT, K. et al.** Anti-c-myc antibody 9E10: epitope key positions and variability characterized using peptide spot synthesis on cellulose. *Protein Eng*, 2001, vol. 14, 803-806 [0161]
- **DE GENST, E. J. et al.** Structure and properties of a complex of alpha-synuclein and a single-domain camelid antibody. *Journal of molecular biology*, 2010, vol. 402, 326-343 [0161]
- **TRAENKLE, B. et al.** Monitoring interactions and dynamics of endogenous beta-catenin with intracellular nanobodies in living cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2015 [0161]
- **HUANG, L. et al.** SPECT imaging with 99mTc-la- beled EGFR-specific nanobody for *in vivo* monitoring of EGFR expression. *Molecular imaging and biology: MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging*, 2008, vol. 10, 167-175 [0161]
- **VANEYCKEN, I. et al.** Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2011, vol. 25, 2433-2446 [0161]
- **BROISAT, A. et al.** Nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for the nuclear imaging of atherosclerotic lesions. *Circulation research*, 2012, vol. 110, 927-937 [0161]
- **RIES, J. ; KAPLAN, C. ; PLATONOVA, E. ; EGHLE, H. ; EWERS, H.** A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nature methods*, 2012, vol. 9, 582-584 [0161]
- **YOON, M. ; MOIR, R. D. ; PRAHLAD, V. ; GOLDMAN, R. D.** Motile properties of vimentin intermediate filament networks in living cells. *The Journal of cell biology*, 1998, vol. 143, 147-157 [0161]
- **LEONHARDT, H. et al.** Dynamics of DNA replication factories in living cells. *The Journal of cell biology*, 2000, vol. 149, 271-280 [0161]
- **MAIER, J. ; TRAENKLE, B. ; ROTHBAUER, U.** Real-time analysis of epithelial-mesenchymal transition using fluorescent single-domain antibodies. *Scientific reports*, 2015, vol. 5, 13402 [0161]
- **KIRCHHOFER, A. et al.** Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nature structural & molecular biology*, 2010, vol. 17, 133-138 [0161]
- **KABSCH, W.** XDS. Biological crystallography. *Acta crystallographica*, 2010, vol. 66, 125-132 [0161]
- **MCCOY, A. J. et al.** Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography*, 2007, vol. 40, 658-674 [0161]
- **WINN, M. D. et al.** Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta crystallographica. Biological crystallography*, 2011, vol. 67, 235-242 [0161]
- **STEIN, N.** CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. *Journal of applied crystallography*, 2008, vol. 41, 641-643 [0161]
- **ADAMS, P. D. et al.** PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 2010, vol. 66, 213-221 [0161]
- **MURSHUDOV, G. N. ; VAGIN, A. A. ; DODSON, E. J.** Refinement of macromolecular structures by the maximum-

- likelihood method. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 1997, vol. 53, 240-255 **[0161]**
- **EMSLEY, P. ; COWTAN, K.** Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 2004, vol. 60, 2126-2132 **[0161]**
 - **CHEN, V. B. et al.** MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 2010, vol. 66, 12-21 **[0161]**
- 5