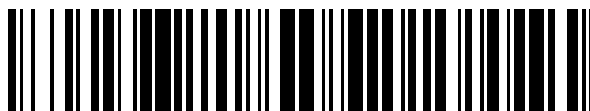


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 893 879**

51 Int. Cl.:

G01N 33/554 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2016** **E 18180720 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.07.2021** **EP 3404410**

54 Título: **Sistema biosensor para la detección rápida de analitos**

30 Prioridad:

31.03.2015 US 201562140920 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
10.02.2022

73 Titular/es:

**FUNDAMENTAL SOLUTIONS CORPORATION
(100.0%)
1550 Lehigh Drive
Easton, PA 18042, US**

72 Inventor/es:

**ZENG, LINGCHUN;
ZUPANCIC, THOMAS, J.;
VEDAMOORTHY, SRIKANTH;
LWANDE, JOEL, S.;
KITTLE, JOSEPH, D. y
MO, MIN**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES, S.L.P.

ES 2 893 879 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema biosensor para la detección rápida de analitos

5 Antecedentes de la invención

La invención descrita se refiere en general a sistemas, dispositivos y métodos para detectar diversos analitos en muestras biológicas u otros tipos de muestras, y más específicamente a un sistema basado en biosensor para detectar e identificar analitos de interés en tiempo real basado en la emisión de una señal detectable cuando el biosensor reacciona con un analito de interés en una muestra que se está analizando.

En términos genéricos, un biosensor es un sistema o dispositivo para la detección de un analito que combina un componente biológico sensible con un componente detector fisicoquímico. Los componentes de un sistema biosensor típico incluyen un elemento biológico, un transductor o elemento detector y componentes electrónicos o procesadores de señales asociados que presentan los resultados de las pruebas de manera significativa y útil. El elemento biológico incluye normalmente material biológico tal como tejido, microorganismos, orgánulos, receptores celulares, enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos y similares que se pueden crear mediante procedimientos de ingeniería biológica conocidos. El transductor o elemento detector funciona de manera fisicoquímica (p. ej., óptica, piezoeléctrica y/o electroquímica) que transforma la señal resultante de la interacción del analito con el elemento biológico en otra señal que se puede medir y cuantificar más fácilmente. Los biosensores se originaron a partir de la integración de la biología molecular y la tecnología de la información (p. ej., microcircuitos, fibras ópticas, etc.) para calificar o cuantificar interacciones biomolécula-analito tales como interacciones de anticuerpo-antígeno. Teniendo en cuenta que existe una gran demanda de herramientas de detección rápidas, sensibles, fáciles de manejar y rentables para detectar agentes infecciosos, patógenos y/o toxinas en los alimentos (véase, por ejemplo, Mead *et al.*, Food Related Illness and Death in the United States, Emerging Infectious Diseases; vol. 5, n.º 5, septiembre-octubre de 1999 (607-625)), existe una necesidad constante de la utilización de biosensores en dispositivos e instrumentos portátiles de campo en tiempo real para la detección e identificación de agentes infecciosos, microorganismos patógenos, toxinas y otros contaminantes en los alimentos y muchos otros artículos.

El documento US 2014/273020 A1 desvela un sistema para detectar agentes infecciosos en una muestra biológica basado en una célula de hibridoma biosensor que expresa de forma natural una IgM endógena específica antiantígeno diana y un gen indicador detectable introducido en la célula.

El documento US 2012/225423 (A1) desvela un método para la detección de analitos solubles, tales como patógenos, antígenos solubles, ácidos nucleicos, toxinas, productos químicos, patógenos vegetales, patógenos transmitidos por la sangre, bacterias, virus y similares. El método se basa en una célula sensora que detecta analitos diana unidos a un anticuerpo mediante la unión del anticuerpo al receptor de Fc de la célula sensora.

Sumario de la invención

A continuación se proporciona un sumario de determinadas realizaciones ilustrativas de la presente invención. Este sumario no es una descripción exhaustiva.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un primer sistema para la detección rápida de analitos. Una realización ilustrativa de este primer sistema incluye una célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, que procede de un componente celular del sistema inmunitario de los mamíferos; una proteína indicadora que se introduce por ingeniería en y es producida por la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, y que emite una señal detectable en respuesta a determinados cambios predeterminados en el citosol de la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería; una ruta de transducción de señales introducida por ingeniería en o que aparece de forma natural dentro de la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, que controla un proceso biológico dentro del citosol de la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, en donde el proceso biológico, cuando aparece, hace que la proteína indicadora emita una señal detectable; al menos un tipo de molécula detectora, en donde cada molécula detectora está adaptada para unirse a un analito específico; al menos un analito que se une a la molécula detectora y que es específico de ese analito; una pluralidad de elementos transductores de señales transmembrana distintos de anticuerpos, expresados por la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, en donde cada elemento transductor de señales está adaptado para recibir una molécula detectora; y en donde tras la unión de un número suficiente de analitos a un número suficiente de moléculas detectoras que se unen a su vez a elementos transductores de señales transmembrana distintos de anticuerpos, se produce una agregación de elementos transductores de señales en la superficie de la célula biosensora, se activa la ruta de transducción de señales, se produce el proceso biológico y la proteína indicadora emite la señal detectable.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un segundo sistema para la detección rápida de analitos. Una realización ilustrativa de este segundo sistema incluye una célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, en donde la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, procede de un componente celular del sistema inmunitario de un mamífero y en donde la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, expresa una pluralidad de al menos un tipo predeterminado de molécula receptora en la superficie de la misma; una proteína indicadora, en

donde la proteína indicadora se introduce por ingeniería en y es expresada por la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, y en donde la proteína indicadora emite una señal detectable en respuesta a determinados cambios predeterminados en el citosol de la célula viva, diseñada por ingeniería; una ruta de transducción de señales introducida por ingeniería en o que aparece de forma natural dentro de la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, en donde la ruta de transducción de señales controla un proceso biológico dentro del citosol de la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, y en donde el proceso biológico, cuando aparece, hace que la proteína indicadora emita una señal detectable; al menos un tipo de molécula detectora, en donde cada molécula detectora está adaptada para unirse a un analito específico; al menos un analito, en donde el al menos un analito se une a la molécula detectora que es específica de ese analito; una pluralidad de elementos transductores de señales solubles distintos de anticuerpos, en donde cada elemento transductor de señales soluble está adaptado para unirse a una molécula receptora y a una molécula detectora; y en donde tras la unión de un número suficiente de analitos a un número suficiente de moléculas detectoras a un número suficiente de elementos transductores de señales distintos de anticuerpos que están a su vez unidos a las moléculas receptoras de la superficie celular, se produce una agregación de las moléculas receptoras, se activa la ruta de transducción de señales, se produce el proceso biológico y la proteína indicadora emite la señal detectable.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un biosensor para la detección rápida de analitos en una muestra. Este biosensor incluye una célula viva, diseñada por ingeniería, en donde la célula viva, diseñada por ingeniería procede de un componente celular del sistema inmunitario de un mamífero (es decir, un inmunocito); una proteína indicadora, en donde la proteína indicadora se introduce por ingeniería en y es expresada por la célula viva, diseñada por ingeniería, y en donde la proteína indicadora emite una señal detectable en respuesta a determinados cambios predeterminados en el citosol de la célula viva, diseñada por ingeniería; una ruta de transducción de señales introducida por ingeniería en o que aparece de forma natural dentro de la célula viva, diseñada por ingeniería, en donde la ruta de transducción de señales controla un proceso biológico dentro del citosol de la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, y en donde el proceso biológico, cuando aparece, hace que la proteína indicadora emita una señal detectable; y una pluralidad de elementos transductores de señales distintos de anticuerpos que se unen directa o indirectamente a un analito en una muestra para analizar, en donde los elementos transductores de señales distintos de anticuerpos unidos cooperan a continuación con la célula biosensora para activar directa o indirectamente la ruta de transducción de señales.

Las características y aspectos adicionales de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia al leer y comprender la siguiente descripción detallada de las realizaciones ilustrativas. Como apreciará el experto en la materia, son posibles realizaciones adicionales de la invención. Por consiguiente, los dibujos y las descripciones asociadas deben considerarse ilustrativos.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y forman una parte de la memoria descriptiva, ilustran esquemáticamente una o más realizaciones ilustrativas de la invención y, junto con la descripción general proporcionada anteriormente y la descripción detallada proporcionada a continuación, sirven para explicar los principios de la invención, y en donde:

las figs. 1a-b son ilustraciones de un primer biosensor de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención, en donde células T Jurkat se han diseñado por ingeniería para producir ecuatorina y para expresar el elemento transductor de señales transmembrana distinto de anticuerpo IgGbp-CD3 ζ ;

las figs. 2a-b son ilustraciones de un segundo biosensor de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención, en donde los mastocitos MC/9 se han diseñado por ingeniería para producir ecuatorina y en donde las células MC/9 expresan el receptor nativo Fc ϵ RI, que se une al elemento transductor de señal distinto de anticuerpo soluble IgGbp-IgE;

las figs. 3a-b son ilustraciones de un tercer biosensor de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención, en donde los mastocitos MC/9 se han diseñado por ingeniería para producir un elemento transductor de señal distinto de anticuerpo soluble IgGbp-IgE, que ha sido excretado por los mastocitos MC/9;

la fig. 4 es una ilustración de un cuarto biosensor de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención, en donde las células biosensoras se han diseñado por ingeniería para producir ecuatorina y para expresar el elemento transductor de señales transmembrana distinto de anticuerpo mSA-CD3 ζ , que se une a un elemento detector biotinilado; y

la fig. 5 es una ilustración de un quinto biosensor de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención, en donde las células biosensoras se han diseñado por ingeniería para producir ecuatorina y para expresar el elemento transductor de señales transmembrana distinto de anticuerpo mSA-OP3 ζ , que se une a un elemento detector biotinilado.

Descripción detallada de la invención

Se describen ahora realizaciones ilustrativas de la presente invención con referencia a las figuras. Aunque la siguiente descripción detallada contiene muchos detalles con fines ilustrativos, un experto en la materia apreciará que muchas variaciones y alteraciones de los siguientes detalles están dentro del alcance de la invención. Por consiguiente, las siguientes realizaciones de la invención se exponen sin ninguna pérdida de generalidad y sin imponer limitaciones sobre la invención reivindicada.

La presente invención se refiere en general a sistemas, dispositivos y métodos para detectar diversos analitos en muestras biológicas u otros tipos de muestras, y más específicamente a un sistema basado en biosensor para detectar e identificar analitos de interés en tiempo real basado en la emisión de una señal detectable cuando el biosensor reacciona con un analito de interés en una muestra que se está analizando. Las células diseñadas por ingeniería de la presente invención son biosensores extremadamente sensibles y eficaces y, debido a que estas células biosensoras tienen una capacidad de detección intrínseca, proporcionan un sistema versátil que puede adaptarse fácilmente para detectar una amplia variedad de diferentes agentes infecciosos u otras dianas simplemente seleccionando moléculas detectoras solubles alternativas (p. ej., anticuerpos) con especificidad para un patógeno particular u otra diana de interés. Asimismo, el sistema de esta invención se puede configurar fácilmente para la detección múltiple de varios agentes infecciosos u otros analitos en un solo ensayo, proporcionando una gran flexibilidad y utilidad. La versatilidad de la presente invención procede de una combinación única de elementos y, en particular, de la combinación de una célula biosensora universal con un detector soluble específico (p. ej., anticuerpo). La célula biosensora universal tiene la capacidad de responder a la presencia de prácticamente cualquier molécula diana que pueda ser reconocida por la molécula detectora. Debido a que, en algunas realizaciones, el detector o el anticuerpo detector se añade al sistema como factor soluble, el sistema puede configurarse para detectar una diana alternativa simplemente seleccionando un detector alternativo o un anticuerpo detector adecuado. La especificidad del sistema desvelado está determinada por la molécula detectora, que se selecciona basándose en su especificidad y afinidad por una molécula diana que es característica de un agente infeccioso u otro analito diana. La combinación de esta célula biosensora universal y detector soluble también permite la construcción de ensayos múltiples simplemente incluyendo una pluralidad de moléculas detectoras (p. ej., anticuerpos) dentro del sistema de análisis, en donde las moléculas diana se seleccionan en función de su especificidad por agentes infecciosos alternativos u otros analitos.

La manipulación genética y la modificación de los tipos de células biosensoras usados con la presente invención normalmente implican el uso de vehículos de suministro de genes seleccionados de forma adecuada que contienen elementos genéticos que actúan de manera eficiente en el tipo celular elegido. Por ejemplo, es útil emplear un elemento promotor que dirija un alto nivel de expresión de transgenes introducidos en la célula biosensora específica elegida. En una realización ilustrativa de la presente invención, dicho elemento promotor puede proceder directamente de la propia célula biosensora y usarse después para expresar un transgén de interés. En otra realización de la presente invención, se puede determinar empíricamente un elemento adecuado comparando la función de elementos promotores alternativos en el contexto de vehículos de suministro de genes alternativos para identificar combinaciones eficaces de promotor, transgén, vector para el tipo celular elegido. Pueden introducirse transgenes tales como el gen que codifica una proteína indicadora luminiscente en la célula biosensora usando técnicas convencionales tales como electroporación o reactivos de transfección química tales como, por ejemplo, lipofectamine. Otros métodos de ingeniería genética conocidos por los expertos en la materia también son compatibles con la presente invención.

En una realización genérica, la presente invención proporciona un sistema y método para la detección rápida de analitos que incluye los siguientes componentes: (i) una célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, en donde la célula biosensora viva diseñada por ingeniería es un componente del sistema inmunitario de un mamífero; (ii) una proteína indicadora, en donde la proteína indicadora es expresada por la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería genética, y en donde la proteína indicadora emite una señal detectable en respuesta a determinados cambios predeterminados en el citosol de la célula viva, diseñada por ingeniería; (iii) una ruta de transducción de señales expresada por la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, en donde la ruta de transducción de señales controla un proceso biológico o bioquímico dentro del citosol de la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, y en donde el proceso biológico o bioquímico, cuando aparece, hace que la proteína indicadora emita una señal detectable; (iv) al menos un tipo de molécula detectora, en donde cada molécula detectora está adaptada para unirse a un analito específico; (v) al menos un analito, en donde el al menos un analito se une a la molécula detectora que es específica de ese analito; (vi) una pluralidad de elementos transductores de señales distintos de anticuerpos que son expresados por la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería o que se unen activamente a un receptor o un componente del receptor expresado por la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, en donde cada elemento transductor de señales está adaptado para recibir una molécula detectora. Tras la unión de un número suficiente de analitos a un número suficiente de moléculas detectoras que se unen a su vez a los elementos transductores de señales distintos de anticuerpos, se produce una agregación de elementos transductores de señales en la superficie de la célula, se activa la ruta de transducción de señales, se produce el proceso bioquímico y la proteína indicadora emite la señal detectable. Este sistema también puede incluir un dispositivo para mezclar las células vivas junto con componentes solubles y una muestra que contenga un analito o agente infeccioso de interés mientras se mantiene la viabilidad y funcionalidad de la célula biosensora viva, y un detector para detectar la señal emitida por la célula biosensora.

Célula biosensora viva, diseñada por ingeniería

Las realizaciones ilustrativas de la presente invención incluyen una célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, que es normalmente un componente del sistema inmunitario de los mamíferos, p. ej., un inmunocito. En determinadas realizaciones de la presente invención, la célula biosensora es una célula B humana o de ratón. Las células B o linfocitos B, son un tipo de glóbulo blanco del subtipo linfocítico que actúan en el componente de inmunidad humoral del sistema inmunitario adaptativo mediante la secreción de anticuerpos. En otras realizaciones de la presente invención, la célula biosensora es una célula T humana o de ratón. Las células T o linfocitos T son otro tipo de linfocito que desempeñan una función central en la inmunidad mediada por células como parte del sistema inmunitario adaptativo. Las células T son distinguibles de otros linfocitos debido a la presencia de un receptor de células T en la superficie celular. En otras realizaciones de la presente invención, la célula biosensora es un mastocito. Un mastocito es también un tipo de glóbulo blanco conocido como granulocito que procede de la célula madre mieloide que es parte de los sistemas inmunitario y neuroinmunitario. Otros tipos de células son compatibles con la presente invención, incluyendo basófilos, que son otro tipo de glóbulo blanco y que son similares tanto en apariencia como en función a los mastocitos.

Proteína indicadora

Las realizaciones ilustrativas de la presente invención incluyen un elemento indicador, tal como una proteína indicadora o enzima que es producida o expresada por la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería. La proteína indicadora emite una señal detectable en respuesta a determinados cambios predeterminados en el citosol de la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería. En determinadas realizaciones de la presente invención, la proteína indicadora es una fotoproteína bioluminiscente tal como la ecuorina, que procede del hidrozoo *Aequorea victoria*. La ecuorina se ha usado anteriormente para diseñar por ingeniería células biosensoras vivas para producir señales de luz en respuesta a la activación de una amplia variedad de rutas de transducción de señales; por tanto, el experto en la materia conoce bien diversos métodos para manipular la producción de ecuorina en células vivas. En particular, un experto en la materia puede seleccionar y emplear cualquier vehículo de suministro de genes adecuado tal como, por ejemplo, vectores plasmídicos bacterianos o vectores víricos, para introducir el material genético adecuado en las células biosensoras. Entonces, la producción de la proteína indicadora dentro de la célula biosensora estará controlada por la expresión del material genético introducido. Un experto habitual en la técnica también apreciará que otras fotoproteínas u otros tipos de proteínas indicadoras, enzimas y moléculas pueden incorporarse en y utilizarse con diversas realizaciones alternativas de la presente invención.

Ruta de transducción de señales

Las realizaciones ilustrativas de la presente invención incluyen una ruta de transducción de señales expresada por la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería. La ruta de transducción de señales controla al menos un proceso biológico dentro del citosol de la célula viva, diseñada por ingeniería, y el al menos un proceso biológico, cuando aparece, hace que la proteína indicadora emita una señal detectable. En determinadas realizaciones de la presente invención, la ruta de transducción de señales es cualquier ruta bioquímica en la que se induce un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la activación de una molécula transductora de señales de la superficie celular, tal como una proteína receptora. Las células biosensoras usadas con la presente invención pueden seleccionarse de un conjunto de células vivas que son capaces de producir un aumento de Ca^{2+} citoplásmico en respuesta a la activación de una molécula de transducción de señales de la superficie celular. Por ejemplo, los linfocitos B, linfocitos T y mastocitos tienen la capacidad de inducir un aumento de la concentración de Ca^{2+} en respuesta a la activación de moléculas transductoras de señales de la superficie celular, tales como el receptor de linfocitos B, el receptor de linfocitos T y el receptor Fc épsilon (mastocitos), respectivamente.

Debido a que las células de mamífero que crecen en cultivo normalmente generan poblaciones de células en las que células individuales específicas pueden tener diferentes capacidades para inducir un aumento de la concentración de Ca^{2+} , es útil seleccionar o cribar subpoblaciones de células o líneas celulares clonales que tienen una capacidad sólida para generar la señal de Ca^{2+} . Esto se puede lograr analizando la inducción de un destello inducido por ecuorina, por ejemplo. En particular, los transfectantes creados por la introducción de transgenes en una célula son una población mixta de células procedentes de una gran cantidad de acontecimientos de inserción de genes independientes. Por tanto, cuando se construye una célula biosensora, es útil cribar o seleccionar subconjuntos específicos de células o líneas celulares clonales que tienen capacidades de transducción de señales eficientes junto con niveles útiles de expresión de transgenes introducidos. Es particularmente útil usar tecnología de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para seleccionar subpoblaciones de células de alta expresión o para generar líneas celulares clonales para este fin.

Como se ha indicado anteriormente, la ecuorina se ha usado anteriormente para diseñar por ingeniería células biosensoras vivas para producir señales de luz en respuesta a la activación de una amplia variedad de rutas de transducción de señales, en particular, en donde dichas rutas de transducción de señales conducen a un aumento de los iones de Ca^{2+} citoplásmicos dentro de una célula viva. En determinadas realizaciones de la presente invención, las células biosensoras que producen ecuorina como proteína indicadora se cargan con coelenteracina (CTZ) antes de su uso en un ensayo de detección. Esta etapa de carga une covalentemente la ecuorina a un grupo protésico hidrófobo (p. ej., CTZ) y, tras unirse al calcio (Ca^{2+}), la CTZ experimenta una reacción irreversible que incluye un cambio de conformación y emite luz azul (a 469 nm).

Molécula detectora

Las realizaciones ilustrativas de la presente invención incluyen al menos un tipo de elemento detector tal como una molécula detectora, en donde cada molécula detectora está adaptada para unirse a un analito diana específico. La molécula detectora puede ser un anticuerpo soluble que no es expresado de ninguna manera por las células biosensoras. La molécula detectora particular usada con la presente invención se selecciona basándose en su capacidad para identificar sin ambigüedades el analito diana de interés. En una realización ilustrativa, la molécula detectora es un anticuerpo soluble, tal como una IgG disponible en el mercado, que es específica para un analito en particular, tal como un agente infeccioso. En otra realización ilustrativa, la molécula detectora es una molécula biotinilada (o molécula basada en estreptavidina) que es específica para un analito predeterminado tal como, por ejemplo, una molécula de autoantígeno biotinilada que es específica para un anticuerpo anti-autoantígeno. Un detector o molécula diana según la presente invención puede incluir un autoantígeno o un autoanticuerpo asociado con una enfermedad autoinmunitaria. Las enfermedades o trastornos autoinmunitarios representativos incluyen artritis reumatoide (AR), AR juvenil (ARJ), diabetes mellitus de tipo 1, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, esclerodermia, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Addison, granulomatosis de Wegener, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmunitaria, polimialgia reumática, arteritis temporal/arteritis de células gigantes y síndrome de Guillain-Barré. Las moléculas detectoras o diana también pueden comprender antígenos específicos de tumores o asociados a tumores o anticuerpos contra dichos antígenos; o moléculas biológicamente activas, tales como EGF, hormonas peptídicas, incluyendo insulina y hormona del crecimiento, citocinas, interleucinas, interferones, TNF, etc. o anticuerpos contra dichas moléculas biológicamente activas.

Analito y muestra de prueba

Un uso previsto de la presente invención es la detección de diversos analitos que están o podrían estar presentes en las muestras que se van a analizar. En una realización ilustrativa de la presente invención, un analito que se va a detectar se unirá a una molécula detectora, tal como un anticuerpo soluble, que es específico de ese analito. Se puede tomar una muestra para analizar de una gran cantidad de fuentes alimentarias, incluyendo: (i) carnes tales como ternera, cerdo, cordero, bison, aves de corral y mariscos; y (ii) plantas y hortalizas. También se puede tomar una muestra para analizar de muchas otras fuentes, tales como agua, líquidos consumibles, líquidos conservantes y líquidos corporales tales como la sangre. Los analitos que pueden detectarse incluyen prácticamente cualquier cosa que se una con especificidad al detector o molécula detectora, tales como productos químicos, toxinas y agentes infecciosos tales como virus, bacterias y otros materiales o agentes biológicos. En una realización ilustrativa de la presente invención, el agente infeccioso específico es *Escherichia coli*, aunque otros agentes infecciosos (tales como *Salmonella*, *Listeria* y *Campylobacter*) y contaminantes pueden detectarse con la presente invención. *Escherichia coli* O157 H7, O26, O45, O103, O111, O121 y O145, en ensayos separados o ensayos múltiples, pueden todos potencialmente ser detectados usando la presente invención.

La presente invención es capaz de detectar muchos analitos diferentes, incluyendo patógenos de la carne y los que se encuentran en las espinacas, la lechuga y otras hortalizas y alimentos. Un analito puede contener uno o más epítomos de un antígeno o alérgeno, incluyendo epítomos lineales o de conformación; también puede contener uno o más ligandos o receptores reconocidos por receptores o ligandos recíprocos. Los analitos ilustrativos incluyen una bacteria, tal como *Bacillus* (p. ej., *B. anthracis*), *Enterobacteriaceae* (p. ej., *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella* y *Shigella*), *Yersinia* (p. ej., *Y. pestis* o *Y. enterocolitica*), *Staphylococcus* (p. ej., *S. aureus*), *Streptococcus*, *Gonorrheae*, *Enterococcus* (p. ej., *E. faecalis*), *Listeria* (p. ej., *L. monocytogenes*), *Brucella* (p. ej., *B. abortus*, *B. melitensis* o *B. suis*), *Vibrio* (p. ej., *V. cholerae*), *Corynebacterium diphtheria*, *Pseudomonas* (p. ej., *P. pseudomallei* o *P. aeruginosa*), *Burkholderia* (p. ej., *B. mallei* o *B. pseudomallei*), *Shigella* (p. ej., *S. dysenteriae*), *Rickettsia* (p. ej., *R. rickettsii*, *R. prowazekii* o *R. typhi*), *Francisella tularensis*, *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Mycoplasma* (p. ej., *M. mycoides*), etc.; alérgenos, tales como polvo de cacahuete, micotoxinas, esporas de moho o esporas bacterianas tales como *Clostridium botulinum* y *C. perfringens*; toxinas, tales como ricina, micotoxina, tetrodotoxina, toxina de carbunco, toxina botulínica, enterotoxina B estafilocócica o saxitoxina; un virus, tal como *Adenoviridae* (p. ej., adenovirus), *Arenaviridae* (p. ej., virus Machupo), *Bunyaviridae* (p. ej., Hantavirus o virus de la fiebre del valle del Rift), *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae* (p. ej., virus de la gripe), *Filoviridae* (p. ej., virus del Ébola y virus de Marburgo), *Flaviviridae* (p. ej., virus de la encefalitis japonesa y virus de la fiebre amarilla), *Hepadnaviridae* (p. ej., virus de la hepatitis B), *Herpesviridae* (p. ej., virus del herpes simple), *Papovaviridae* (p. ej., virus del papiloma), *Paramyxoviridae* (p. ej., virus respiratorio sincitial, virus del sarampión, virus de las paperas o virus paragripal), *Parvoviridae*, *Picornaviridae* (p. ej., poliovirus), *Poxviridae* (p. ej., virus de la viruela), *Reoviridae* (p. ej., rotavirus), *Retroviridae* (p. ej., virus linfotrópicos de linocitos T humanos (HTLV) y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)), *Rhabdoviridae* (p. ej., virus de la rabia) y *Togaviridae* (p. ej., virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla y virus de la rubéola)); un protozoo, tal como *Cryptosporidium parvum*, encefalitozoos, *Plasmodium*, *Toxoplasma gondii*, *Acanthamoeba*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania* o *Trypanosoma* (p. ej., *T. brucei* y *T. cruzi*); un helminto, tal como cestodos (tenias), trematodos (duelas) o nematodos (nematelmintos, p. ej., *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* o *Ancylostoma duodenale*); un parásito (p. ej., cualquier protozoo o helminto descrito en el presente documento); un hongo, tal como *Aspergillus*, *Candida*, *Coccidioides immitis* y *Cryptococcus*; un contaminante ambiental; un aditivo de agua; un marcador agrícola; un ácido nucleico (p. ej., oligonucleótidos,

polinucleótidos, nucleótidos, nucleósidos, moléculas de ADN o moléculas de ARN, incluyendo un cromosoma, un plásmido, un genoma vírico, un cebador o un gen; una proteína (p. ej., una glucoproteína, una metaloproteína, una enzima, un prion o una inmunoglobulina); un metabolito; un azúcar; un lípido; un lipopolisacárido; una sal; o un ion. Las dianas también incluyen patógenos transmitidos por alimentos, tales como *Salmonella* (p. ej., *Salmonella typhimurium*), *E. coli* patógena (p. ej., O157:H7), *Bacillus* (p. ej., *B. cereus*), *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia* (p. ej., *Y. enterocolitica*), *Norovirus* (p. ej., virus de Norwalk), *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Toxoplasma gondii*, *Vibrio* (p. ej., *V. vulnificus*, *V. cholera*, *V. parahaemolyticus*), *Campylobacter jejuni* y *Clostridium perfringens*; y patógenos usados como armas, tales como *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Brucella* (p. ej., *B. suis*), *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Shigella*, *Clostridium botulinum*, *Variola* (p. ej., *V. major*), *Filoviridae* (p. ej., virus del Ébola y virus de Marburgo), *Arenaviridae* (p. ej., virus de Lassa y virus Machupo), *Clostridium perfringens*, cualquier patógeno transmitido por los alimentos (p. ej., especies de *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 o *Shigella*), *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Staphylococcus aureus*, *Rickettsia* (p. ej., *R. prowazekii* o *R. rickettsii*), *Alfavirus* (p. ej., virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis equina del este o virus de la encefalitis equina del oeste), *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*, *Henipavirus* (p. ej., virus Nipah), *Bunyaviridae* (p. ej., Hantavirus o virus de la fiebre del valle del Rift), *Flaviviridae* (p. ej., virus de la encefalitis japonesa y virus de la fiebre amarilla) y *Coccidioides* spp.

Los epítomos que pueden detectarse como analitos o partes de un analito son normalmente sitios determinantes antigénicos en un antígeno a los que se puede unir específicamente una inmunoglobulina (o fragmento de unión a antígeno de la misma). Los epítomos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como a partir de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos se pueden encontrar en la región Fab (variable) de las inmunoglobulinas (denominadas "determinantes idiotípicos") y comprenden el "idiotipo" de la inmunoglobulina. El epítipo y el antígeno pueden producirse de forma natural o artificial. Dependiendo de la naturaleza del epítipo o antígeno, el epítipo o antígeno puede aislarse o purificarse a partir de una matriz o sustancia de origen, sintetizarse o producirse de forma recombinante, por ejemplo. Los epítomos y antígenos útiles como analitos pueden ser de un animal humano o no humano, una planta, bacterias, protozoo, parásito, virus, etc. En algunas realizaciones, el analito es un polipéptido, molécula de ácido nucleico, hidrato de carbono, glucoproteína, lípido, lipoproteína, glucolípido o molécula pequeña. En algunas realizaciones, el analito se selecciona entre un antígeno de cáncer, autoantígeno, alérgeno, antígeno endógeno, antígeno de agente infeccioso, antígeno farmacológico (molécula pequeña), toxina, veneno, antígeno biológico, antígeno ambiental, antígeno de trasplante y antígeno de implante.

Un analito puede comprender un epítipo de un antígeno de cáncer. En algunas realizaciones, el analito es un antígeno asociado a tumor. En algunas realizaciones, el analito es un antígeno específico de tumor. En algunas realizaciones de la invención, el analito es un antígeno asociado al tumor (TAA) y el TAA es un antígeno de hidrato de carbono que tiene una o más modificaciones postraduccionales que difieren de la proteína de tipo silvestre, comprende una región de fusión de una proteína resultante de una fusión génica que está presente en células malignas pero no está presente en células no malignas, y/o en donde el TAA comprende una tirosina cinasa receptora (RTK) que está desregulada y/o es disfuncional en células tumorales debido a la activación autocrina, translocaciones cromosómicas, sobreexpresión de RTK o mutaciones de ganancia de función en el gen o proteína de RTK. En algunas realizaciones de la invención, el analito es una inmunoglobulina expresada por una neoplasia maligna de linfocitos B. Los ejemplos de neoplasias malignas de linfocitos B incluyen, pero sin limitación, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células del manto y mieloma múltiple. Las neoplasias malignas de linfocitos B adicionales incluyen, por ejemplo, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, leucemia linfoplasmocítica, linfoma esplénico de la zona marginal, linfoma de zona marginal (extraganglionar y ganglionar), neoplasias de células plasmáticas (p. ej., mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, enfermedades de deposición de inmunoglobulina monoclonal, enfermedades de cadenas pesadas) y linfoma folicular (p. ej., Grados I, II, III o IV).

En algunas realizaciones, el analito es un antígeno asociado a tumor procedente de células tumorales obtenidas del sujeto. En algunas realizaciones, el antígeno asociado al tumor es uno o más antígenos seleccionados entre 17-1A, 707-AP, AFP, anexina II, ART-4, BAGE, BAGE-1, .beta.-catenina, BCG, bcr/abl, unión de fusión de bcr/abl e14a2, bcr-abl (b3a2), bcr-abl (b3a2), bcr-abl p190 (ela2), bcr-abl p210 (b2a2), bcr-abl p210 (b3a2), bcr-abl p210 (b3a2), antígeno penfigoide ampolloso-1, CA19-9, CA125, CA215, CAG-3, CAMEL, antígeno de cáncer de testículo, caspasa-8, CCL3, CCL4, CD16, CD20, CD3, CD30, CD55, CD63, CDC27, CDK-4, CDR3, CEA, grupo 5, grupo-5A, cinasa-4 dependiente de ciclina, Cyp-B, DAM-10, DAM-6, Dekcaína, E7, EGFR, EGFRvIII, EGP40, ELF2 M, EpCAM, FucGM1, G250, GA733, GAGE, GAGE-1-8, antígeno de gastrina asociado al cáncer, GD2, GD3, globoH, glucoforina, GM1, GM2, GM3, GnT4, GnT-V, gp100, Her-2/neu, HERV-K-ME, antígeno asociado a alto peso molecular, proteoglicano de alto peso molecular (HMPG), HPV-16 E6, HPV-16 E7, HPVE6, HSP70-2M, HST-2, hTERT, gonadotropina coriónica humana (HCG), glóbulo graso de leche humana (HMFG), iCE, KIAA0205, KK-LC-1, KM-HN-1, L6, LAGE-1, Lcose4Cer, LDLR/FUT, Lewis A, Lewis v/b, proteína M, MAGE-1, MVC, MAGE-A1-12, MAGE-C2, MAHGE-3, MART-1/Melan-A, MC1R, ME491, MUC1, MUC2, mucina, MUM-1, MUM-2, MUM-3, p53 mutado, miosina, MZ2-E, neuraminidasa N9, NA88, NA88-A, antígeno de carcinoma nasofaríngeo, NGA, NK1/c-3, nuevos exones 1, 13, 14 de BCR de fusión de bcr/abl con exones 4 de ABL, NY-ESO-1/LAGE-2, NY-ESO-1b, OC125, antígeno-1 asociado al osteosarcoma, P15, p190 mimor bcr-abl (ela2), p53, Pm1/RARa, ácido polisialico, PRAME, PSA, PSM, RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-2, SART-3, sialil LeA, Sp17, SSX-2, SSX-4, inmunoglobulina de superficie, TAG-1, TAG-2, TEL/AML1, TPI, TRAG-3, TRP-1 (gp75), TRP-2, TRP2-INT2, hTERT, glucoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72), tirosinasa, u-PA, WT1 y XAGE-

1b, o un fragmento inmunogénico de cualquiera de los antígenos anteriores. En algunas realizaciones, el antígeno asociado al tumor se identifica mediante el enfoque SEREX (análisis serológico de la biblioteca de expresión de ADNc recombinante) o se basa en el cribado serológico de la biblioteca de expresión de ADNc generada a partir de tejidos tumorales de diversos orígenes o líneas de células cancerosas, y la identificación de proteínas tumorales inmunogénicas en función de su reactividad con sueros de pacientes autólogos. En algunas realizaciones, el analito es un antígeno asociado al tumor que es un antígeno de hidrato de carbono que tiene una o más modificaciones postraduccionales que difieren de la proteína de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el antígeno asociado al tumor comprende una región de fusión de una proteína resultante de una fusión génica que está presente en células malignas pero no está presente en células no malignas. En algunas realizaciones, el antígeno asociado al tumor comprende un receptor de tirosina cinasa que está desregulado y/o es disfuncional en las células tumorales debido a la activación autocrina, translocaciones cromosómicas, sobreexpresión de RTK o mutaciones de ganancia de función en el gen o proteína de RTK.

El analito puede comprender un epítipo de un antígeno de un agente infeccioso o no infeccioso que puede ser patógeno o no patógeno para el sujeto. El analito puede proceder de un microorganismo mutualista, parasitario o comensal, incluyendo cualquier microorganismo en un bioma animal o vegetal, tal como microorganismos probióticos o comensales en el aparato digestivo humano, superficies mucosas o epitelio. En algunas realizaciones, el patógeno bacteriano se selecciona entre *Acinetobacter baumannii* (anteriormente *Acinetobacter calcoaceticus*), *Actinobacillus*, *Actinomyces pyogenes* (anteriormente *Corynebacterium pyogenes*), *Actinomyces israelii*, *Nocardia asteroides*, *N. brasiliensis*, *Aeromonas hydrophila*, *Amycolata autotrophica*, *Archaeobacterium haemolyticum* (anteriormente *Corynebacterium haemolyticum*), *Arizona hinshawii* - todos los serotipos, *Bacillus anthracis*, *Bacteroides fragilis*, *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *B. vinsonii*, *Bordetella*, incluyendo *B. pertussis*, *Borrelia recurrentis*, *B. burgdorferi*, *Burkholderia* (anteriormente especie de *Pseudomonas*) excepto las enumeradas en BSL III), *Campylobacter coli*, *C. fetus*, *C. jejuni*, *Chlamydia psittaci*, *C. trachomatis*, *C. pneumonia*, *Clostridium botulinum* (especie productora de neurotoxinas), neurotoxinas de *Clostridium botulinum*, *Cl. chauvoei*, *Cl. haemolyticum*, *Cl. histolyticum*, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. tetani*, toxina épsilon de *Cl. perfringens*, *Corynebacterium diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis*, *C. renale*, *Dermatophilus congolensis*, *Edwardsiella tarda*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia coli* - todas enteropatógenas, enterotoxigénicas, enteroinvasoras y cepas portadoras del antígeno K1, incluyendo *E. coli* O157:H7, *Haemophilus ducreyi*, *H. influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella* - todas las especies excepto *K. oxytoca* (RG1), *Legionella*, incluyendo *L. pneumophila*, *Leptospira interrogans* - todos los serotipos, *Listeria*, *Moraxella*, *Mycobacterium* (excepto los enumerados en BSL III) incluyendo el complejo de *M. avium*, *M. asiaticum*, cepa de la vacuna de *M. bovis* BCG, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. leprae*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. paratuberculosis*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. ulcerans*, *M. xenopi*, *Mycoplasma*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*, *N. transvalensis*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Rhodococcus equi*, *Salmonella*, incluyendo *S. arizonae*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum-pullorum*, *S. meleagridis*, *S. paratyphi*, *A. B. C.*, *S. typhi*, *S. typhimurium*, *Shigella* incluyendo *S. boydii*, *S. dysenteriae*, tipo 1, *S. flexneri*, *S. sonnei*, *Sphaerophorus necrophorus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptobacillus moniliformis*, *Streptococcus*, incluyendo *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Treponema pallidum*, *T. carateum*, *Vibrio cholerae*, *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus*, *Yersinia enterocolitica*, *Bartonella*, *Brucella* incluyendo *B. abortus*, *B. canis*, *B. suis*, *B. melitensis*, *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *mallei*, *B. pseudomallei*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Mycobacterium bovis* (excepto la cepa BCG, agentes bacterianos BSL II incluyendo *Chlamydia*), *M. tuberculosis*, micobacterias distintas de la tuberculosis (MOTT), *Pasteurella multocida* tipo B - "búfalo" y otras cepas virulentas. *Rickettsia akari*, *R. australis*, *R. canada*, *R. conorii*, *R. prowazekii*, *R. rickettsii*, *R. sibirica*, *R. tsutsugamushi*, *R. typhi* (*R. mooseri*), *Yersinia pestis*.

El analito puede proceder de un patógeno vírico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el analito procede de un patógeno vírico seleccionado entre adenovirus, humanos - todos los tipos, alfavirus (togavirus), virus de la encefalitis equina del este, virus de la encefalomiелitis equina del este, cepa de vacuna contra la encefalomiелitis equina venezolana TC-83, virus de la encefalomiелitis equina del oeste, arenavirus, virus de la coriomeningitis linfocítica (cepas no neurotrópicas), complejo de virus Tacaribe, bunyavirus, virus bunyamwera, vacuna contra el virus de la fiebre del Valle del Rift cepa MP-12, calcivirus, coronavirus. Flavivirus (togavirus)-arbovirus del grupo B, serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue, cepa 17D de la vacuna contra el virus de la fiebre amarilla, virus de la hepatitis A, B, C, D y E, el citomegalovirus, virus de Epstein Barr, herpes simple de tipos 1 y 2, herpes zóster, virus del herpes humano de tipos 6 y 7, virus de la gripe de tipos A, B y C, papovavirus, virus del papiloma, virus de la enfermedad de Newcastle, virus del sarampión, virus de las paperas, virus paragripal de tipos 1, 2, 3 y 4, poliomavirus (virus JC, virus BK), virus respiratorio sincitial, parvovirus humano (B 19), virus Cocksackie de tipos A y B, ecovirus, poliovirus, rinovirus, alastrim (virus de viruela menor), viruela (virus de viruela mayor), reovirus de la viruela blanca, coltivirus, rotavirus humano y orbivirus (virus de la fiebre por garrapatas de Colorado), virus de la rabia, virus de la estomatitis vesicular, rubivirus (rubeola), virus del bosque de Semliki, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalomiелitis equina venezolana, arenavirus (también conocido como virus de la fiebre hemorrágica sudamericana), flexal, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM) (cepas neurotrópicas), hantavirus, incluyendo el virus Hantaan, virus de la fiebre del Valle del Rift, virus de la encefalitis japonesa, virus de la fiebre amarilla, virus de la viruela de los simios, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) de tipos 1 y 2, virus linfotrópico de linfocitos T humanos (HTLV) de tipos 1 y 2, el virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV), virus de la estomatitis vesicular, virus guaranito, virus de la fiebre de Lassa, virus de Junín, virus machupo, Sabia, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus del Ébola, virus de Marburgo, complejo del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (flavi), incluyendo la encefalitis transmitida por garrapatas de Europa Central, encefalitis transmitida por garrapatas del Lejano

Oriente, Hanzalova, Hypr, Kumlinge, enfermedad de la selva de Kyasanur, fiebre hemorrágica de Omsk y virus de la encefalitis primavera-verano rusa, herpesvirus de simios (virus del herpes B o de simios B), herpesvirus de cercopitecinos 1 (virus del herpes B), morbilivirus equino (virus Hendra y de tipo Hendra), virus de Nipah, virus de la viruela mayor (virus de la viruela), virus de la viruela menor (alastrim), virus de la peste porcina africana, virus de la peste equina africana, virus de Akabane, virus de la gripe aviar (muy patógeno), virus de la lengua azul, virus de la viruela del camello, virus de la fiebre porcina clásica, *Cowdria ruminantium* (cowdriosis), virus de la fiebre aftosa, virus de la viruela caprina, virus de la encefalitis japonesa, virus de la dermatosis nodular, virus de la fiebre catarral maligna, virus de Menangle, virus de la enfermedad de Newcastle (VVND), virus de la peste de los pequeños rumiantes, virus de la peste bovina, virus de la viruela de las ovejas, virus de la enfermedad vesicular porcina, virus de la estomatitis vesicular (exótico).

El analito puede proceder de un parásito. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el analito procede de un parásito seleccionado de entre los anquilostomas humanos *Ancylostoma*, incluyendo *A. duodenale*, *A. ceylanicum*, *Brassica* incluyendo *Ascaris lumbricoides suum*, *Babesia*, incluyendo *B. divergens*, *B. microti*, filarias de *Brugia* incluyendo *B. malayi*, *B. timori*, coccidios, *Cryptosporidium*, incluyendo *C. parvum*, *Cysticercus cellulosae* (quiste hidatídico, larva de *T. solium*), *Echinococcus*, incluyendo *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. vogeli*, *Entamoeba histolytica*, *Enterobius*, *Fasciola*, incluyendo *F. gigantica*, *F. hepatica*, *Giardia*, incluyendo *G. lamblia*, *Heterophyes*, *Hymenolepis* incluyendo *H. diminuta*, *H. nana*, *Isospora*, *Leishmania*, incluyendo *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. ethiopia*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. peruviana*, *L. tropica*, filarias *Loa loa*, microsporidio, *Naegleria fowleri*, anquilostomas humanos *Necator*, incluyendo *N. americanus*, filarias *Onchocerca*, incluyendo *O. volvulus*, *Plasmodium cynomolgi*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, *Sarcocystis* incluyendo *S. sui hominis*, *Schistosoma*, incluyendo *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mansoni*, *S. mekongi*, *Strongyloides* incluyendo *S. stercoralis*, *Taenia solium*, *Toxocara*, incluyendo *T. canis*, *Toxoplasma*, incluyendo *T. gondii*, *Trichinella spiralis*, *Trypanosoma*, incluyendo *T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense*, *T. cruzi* o filarias *Wuchereria bancrofti*.

El analito puede ser un patógeno fúngico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el analito procede de un patógeno fúngico seleccionado entre *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cladosporium bantianum*, *Candida albicans*, *C. (Xylohypha) trichoides*, *Cryptococcus neoformans*, *Dactylaria galopava* (*Ochroconis gallopavum*), *Epidermophyton*, *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Microsporum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffeii*, *Pneumocystis carinii*, *Sporothrix schenckii*, *Trichophyton*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii*.

El analito puede ser una toxina. En algunas realizaciones, el analito es una toxina seleccionada entre abrina, neurotoxinas botulínicas, toxina épsilon de *Clostridium perfringens*, conotoxinas, diacetoxiscirpenol, ricina, saxitoxina, proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo Shiga, toxina Shiga, enterotoxinas estafilocócicas, toxina T-2 y tetrodotoxina.

En algunas realizaciones, el analito se selecciona entre el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), OspA de *B. burgdorferi*, LI del VPH, proteína F del VRS, hemaglutinina de la gripe, región de tallo-bucle de la gripe, M2 de la gripe, proteína 1-10 de superficie de merozoíto de *P. falciparum*, GLURP, SERA, antígeno S, familia 6-cys, AMA1, EBA175, 140, 181, MTRAP, PTRAMP, ASP, Rh1, 2a, 2b, 4, 5, RAP1, 2, 3, RAMA, RHOP1, 2, 3, proteína de circumsporozoíto de *P. vivax*, proteína 2 de superficie de esporozoítos, SSP2/TRAP, CSP-N, CSP-R, CSP-C, MSP-1, MSP-9, DBPRIII, AMA-1, Pvs25, Pvs28, polisacárido capsular de *S. aureus*, poli-N-acetilglucosamina, gp120 del VIH, gp41 y regiones conservadas del virus del dengue.

En otra realización, el analito comprende al menos un epítipo de un alérgeno. Los alérgenos pueden ser de origen natural o artificiales, tales como alérgenos contenidos en las vacunas contra la alergia. Los ejemplos de alérgenos incluyen, pero sin limitación, productos animales (por ejemplo, Fel d 1, caspa de pelaje, cáliz de cucaracha, lana, secreción de ácaros del polvo), fármacos (por ejemplo, penicilina, sulfonamidas, salicilatos, anestésico local), comida (por ejemplo, apio o apio-nabo, maíz, huevos (p. ej., albúmina), frutos, legumbres (por ejemplo, judías, guisantes, cacahuètes, soja), leche, mariscos (p. ej., moluscos), sésamo, soja, frutos secos arbóreos (por ejemplo, pacanas, almendras), trigo, veneno de insectos (por ejemplo, hormigas rojas, veneno de picadura de abeja, veneno de picadura de avispa), látex, metal, polen de plantas (por ejemplo, hierba (p. ej., raigrás, anea, malas hierbas (p. ej., ambrosía, *Plantago*, ortiga, *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, acedera) y árboles (p. ej., abedul, aliso, avellano, carpe, *Aesculus*, sauce, chopo, *Platanus*, *Tilia*, *Olea*, enebro de Ashe).

En algunas realizaciones, el analito es un alérgeno procedente de una proteína de látex, por ejemplo, savia de látex sin procesar, látex crudo que contiene amoníaco o producto de látex terminado en el que las proteínas han estado expuestas a productos químicos y altas temperaturas. En algunas realizaciones, el alérgeno es el alérgeno de un ácaro, por ejemplo, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Acarus siro*, *Blomia tropicalis*, *Chortoglyphus arcuatus*, *Euroglyphus cannei*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae* o *Glyphagus domesticus*. En algunas realizaciones, el alérgeno es de veneno, por ejemplo, *Bombus* spp., *Vespa crabro*, *Apis mellifera*, *Dolichovespula* spp., *Polistes* spp., *Vespula* spp., *Dolichovespula maculata* o *Dolichovespula arenaria*. En algunas realizaciones, el analito es un alérgeno de un insecto, por ejemplo, *Camponotus pennsylvanicus*, *Solenopsis invicta*, *Solenopsis richteri*, *Periplaneta americana*, *Blattella germanica*, *Blatta orientalis*, *Tebanus* spp., *Musca domestica*, *Ephemeroptera* spp., *Culicidae* sp. o *Heterocera* spp.

En algunas realizaciones, el analito alergénico es epitelio, caspa o pelo de un organismo, por ejemplo, *Serinus canaria*, *Felis catus* (*domesticus*), *Bos taurus*, *Gallus gallus* (*domesticus*), *Canis familiaris*, *Arias platyrhynchos*, *Meriones unguiculatus*, *Capra hircus*, *Anser domesticus*, *Cavia porcellus* (cobaya), *Mesocricetus auratus*, *Sus scrofa*, *Equus caballus*, *Mus musculus*, psitácidos, *Columba fasciata*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rattus norvegicus* u *Ovis aries*.

En algunas realizaciones, el analito alergénico es de hongos, por ejemplo, *Cephalosporium acremonium*, *Alternaria tenuis*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Aureobasidium pullulan* (*Pullularia pullulans*), *Drechslera sorokiniana*, *Helminthosporium sativum*, *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium sphaerospermum* (*Homodendrum hordei*), *Drechslera spicifera* (*Curvularia spicifera*), *Epicoccum nigrum* (*Epicoccum purpurascens*), *Epidermophyton floccosum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Geotrichum candidum*, *Glilocladium viride*, *Helminthosporium solani*, *Microsporium canis*, *Mucor circinelloides* *circinelloides*, *Mucor circinelloides* *lusitanicus*, *Mucor plumbeus*, *Mycogone perniciosus*, *Neurospora intermedia*, *Nigrospora oryzae*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium roquefortii*, *Phoma betae*, *Phoma herbarum*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Serpula lacrymans*, *Setosphaeria rostrata*, *Stemphylium botryosum*, *Stemphylium solani*, *Trichoderma harzianum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* o *Trichothecium roseum*. En algunas realizaciones, el alérgeno es de un tizón, por ejemplo, *Ustilago nuda*, *Ustilago cynodontis*, *Ustilago candis*, *Sporisorium cruentum*, *Ustilago avenae* o *Ustilago tritici*.

En algunas realizaciones, el analito alergénico es de una hierba, por ejemplo, *Paspalum notatum*, *Cynodon dactylon*, *Poa compressa*, *Bromus inennis*, *Phalaris arundinacea*, *Zea mays*, *Elytrigia repens* (*Agropyron repens*), *Sorghum halepense*, *Poa pratensis*, *Festuca pratensis* (*elatior*), *Avena sativa*, *Dactylis glomerata*, *Agrostis gigantea* (*alba*), *Secale cereale*, *Leymus* (*Elymus*) *condensatus*, *Lolium perenne* ssp. *multiflorum*, *Lolium perenne*, *Anthoxanthum odoratum*, *Phleum pratense*, *Holcus lanatus*, *Triticum aestivum* o *Elymus* (*Agropyron*) *smithii*.

En algunas realizaciones, el analito alergénico es de una mala hierba, por ejemplo, *Atriplex polycarpa*, *Baccharis halimifolia*, *Baccharis sarothroides*, *Hymenoclea salsola*, *Amaranthus hybridus*, *Xanthium strumarium* (*commune*), *Rumex crispus*, *Eupathium capillifolium*, *Solidago* spp., *Amaranthus tuberculatus* (*Acrida tamariscina*), *Allenrolfea occidentalis*, *Chenopodium botrys*, *Kochia scoparia*, *Chenopodium album*, *Iva xanthifolia*, *Iva angustifolia*, *Chenopodium ambrosioides*, *Artemisia vulgaris*, *Artemisia ludoviciana*, *Urtica dioica*, *Amaranthus spinosus*, *Plantago lanceolata*, *Iva axillaris*, *Atriplex lentiformis*, *Ambrosia dumosa*, *Ambrosia acanthicarpa*, *Ambrosia trifida*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Ambrosia confertiflora*, *Ambrosia bidentata*, *Ambrosia psilostachya*, *Salsola kali* (*pestifer*), *Artemisia californica*, *Artemisia frigida*, *Artemisia tridentata*, *Atriplex wrightii*, *Atriplex confertifolia* o *Artemisia annua*.

En algunas realizaciones, el analito alergénico es de un árbol, por ejemplo, *Acacia* spp., *Alnus glutinosa*, *Alnus rubra*, *Alnus incana* ssp. *rugosa*, *Alnus rhombifolia*, *Fraxinus velutina*, *Fraxinus pennsylvanica*, *Fraxinus latifolia*, *Fraxinus americana*, *Populus tremuloides*, *Myrica cerifera*, *Fagus grandifolia* (*americana*), *Casuarina equisetifolia*, *Betula lenta*, *Betula pendula*, *Betula nigra*, *Betula occidentalis* (*fontinalis*), *Betula populifolia*, *Acer negundo*, *Cryptomeria japonica*, *Juniperus ashei* (*sabinoideus*), *Juniperus virginiana*, *Tamarix gallica*, *Populus balsamifera* ssp. *trichocarpa*, *Populus deltoides*, *Populus remontii*, *Populus wislizeni*, *Populus monilifera* (*sargentii*), *Cupressus arizonica*, *Taxodium distichum*, *Cupressus sempervirens*, *Ulmus americana*, *Ulmus crassifolia*, *Ulmus pumila*, *Eucalyptus globulus*, *Celtis occidentalis*, *Corylus americana*, *Corylus avellana*, *Carya ovata*, *Carya laciniosa*, *Carya alba*, *Juniperus monosperma*, *Juniperus princhotii*, *Juniperus scopulorum*, *Juniperus occidentalis*, *Robinia pseudoacacia*, *Mangifera indica*, *Acer macrophyllum*, *Acer rubrum*, *Acer saccharum*, *Melaleuca quinquenervia* (*leucadendron*), *Prosopis glandulosa* (*juliflora*), *Broussonetia papyrifera*, *Morus rubra*, *Morus alba*, *Quercus gambelii*, *Quercus velutina*, *Quercus macrocarpa*, *Quercus kelloggii*, *Quercus agrifolia*, *Quercus lobata*, *Quercus ilex*, *Quercus stellata*, *Quercus rubra*, *Quercus dumosa*, *Quercus virginiana*, *Quercus nigra*, *Quercus garryana*, *Quercus alba*, *Olea europaea*, *Elaeagnus angustifolia*, *Citrus sinensis*, *Arecastum romanoffianum* (*Cocos plumosa*), *Carya illinoensis*, *Schinus molle*, *Schinus terebinthifolius*, *Pinus taeda*, *Pinus strobus*, *Pinus palustris*, *Pinus ponderosa*, *Pinus elliotii*, *Pinus virginiana*, *Pinus monticola*, *Pinus echinata*, *Populus nigra*, *Populus alba*, *Ligustrum vulgare*, *Liquidambar styraciflua*, *Platanus occidentalis*, *Platanus orientalis*, *Platanus racemosa*, *Platanus acerifolia*, *Juglans nigra*, *Juglans californica*, *Juglans regia*, *Salix lasiolepis*, *Salix nigra* o *Salix discolor*. En algunas realizaciones, el alérgeno es de una flor, por ejemplo, *Chrysanthemum leucanthemum*, *Taraxacum officinale* o *Helianthus annuus*. En algunas realizaciones, el alérgeno es de una planta agrícola, por ejemplo, *Medicago sativa*, *Ricinus communis*, *Trifolium pratense*, *Brassica* spp. o *Beta vulgaris*.

En algunas realizaciones, el analito alergénico es de un alimento vegetal (una planta comestible), por ejemplo, *Prunus dulcis*, *Malus pumila*, *Prunus armeniaca*, *Musa paradisiaca* (*sapientum*), *Hordeum vulgare*, *Phaseolus lanatus*, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus* sp., *Phaseolus* sp., *Phaseolus vulgaris*, *Rubus allegheniensis*, *Vaccinium* sp., *Brassica oleracea* var. *botrytis*, *Fagopyrum esculentum*, *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Theobroma cacao*, *Cucumis melo*, *Daucus carota*, *Brassica oleracea* var. *botrytis*, *Apium graveolens* var. *dulce*, *Prunus* sp., *Cinnamomum verum*, *Coffea arabica*, *Zea mays*, *Vaccinium macrocarpon*, *Cucumis sativus*, *Allium sativum*, *Zingiber officinale*, *Vitis* sp., *Citrus paradisi*, *Humulus lupulus*, *Citrus limon*, *Lactuca sativa*, *Agaricus campestris*, *Brassica* sp., *Myristica fragrans*, *Avena*

sativa, *Olea europaea*, *Allium cepa* var. *cepa*, *Citrus sinensis*, *Vigna unguiculata*, *Pisum sativum*, *Prunus persica*, *Pyrus communis*, *Piper nigrum*, *Capsicum annuum* var. *annuum*, *Ananas comosus*, *Ipomoea batatas*, *Solanum tuberosum*, *Rubus idaeus* var. *idaeus*, *Oryza sativa*, *Secale cereale*, *Sesamum orientale* (*indicum*), *Glycine max*, *Spinacia oleracea*, *Cucurbita pepo* var. *melopepo*, *Fragaria chiloensis*, *Lycopersicon esculentum* (*lycopersicum*), *Brassica rapa* var. *rapa*, *Vanilla planifolia*, *Citrullus lanatus* var. *lanatus* o *Triticum aestivum*.

En algunas realizaciones, el analito alergénico es de pescado o marisco, por ejemplo, *Micropterus* sp., *Ictalurus punctatus*, *Mercenaria mercenaria*, *Gadus morhua*, *Callinectes sapidus*, *Platichthys* sp., *Hippoglossus* sp., *Homarus americanus*, *Scomber scombrus*, *Crassostrea virginica*, *Sebastes marinus*, *Salmo salar*, *Clupeiformes*, *Pecten magellanicus*, *Penaeus* sp., *Salvelinus* sp. o *Thunnus* sp. En algunas realizaciones, el alérgeno es un producto alimenticio para animales, por ejemplo, de *Bos taurus*, *Ovis aries* o *Sus scrofa*. En algunas realizaciones, el alérgeno es un producto avícola, por ejemplo, productos de pollo (*Gallus gallus*) o productos de pavo (*Meleagris gallopavo*). En algunas realizaciones, el alérgeno es de un producto lácteo, por ejemplo, caseína bovina o leche bovina. En algunas realizaciones, el alérgeno es un fruto seco, por ejemplo, *Bertholletia excelsa*, *Anacardium occidentale*, *Cocos nucifera*, *Corylus americana*, *Arachis hypogaea*, *Carya illinoensis*, *Juglans nigra* o *Juglans regia*. En algunas realizaciones, el alérgeno es polvo, por ejemplo, polvo de grano de cebada, polvo de grano de maíz, polvo doméstico, polvo de colchón, polvo de grano de avena, polvo de grano de trigo, polvo de tapicería o polvo de látex.

En algunas realizaciones, el analito antigénico es un autoantígeno asociado con un trastorno autoinmunitario. En algunas realizaciones, el trastorno autoinmunitario es un trastorno autoinmunitario específico de un órgano o una célula, y el analito autoantigénico se selecciona entre: receptor de acetilcolina (miastenia grave), actina (hepatitis crónica activa, cirrosis biliar primaria), translocador de nucleótidos de adenina (ANT) (miocardiopatía dilatada, miocarditis), beta-adrenorreceptor (miocardiopatía de grado dilatado), descarboxilasa aromática de L-aminoácido (síndrome poliendocrino autoinmunitario de tipo I (APS-1)), receptor de asialoglucoproteína (hepatitis autoinmunitaria), proteína bactericida/que aumenta la permeabilidad (Bpi) (vasculitis por fibrosis quística), receptor sensible al calcio (hipoparatiroidismo adquirido), enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (CYP11a) (APS-1), cadena alfa 3 de colágeno de tipo IV (síndrome de Goodpasture), citocromo P450 2D6 (CYP2D6) (hepatitis autoinmunitaria), desmina (enfermedad de Crohn, enfermedad de las arterias coronarias), desmogleína 1 (pénfigo foliáceo), desmogleína 3 (pénfigo vulgar), F-actina (hepatitis autoinmunitaria), gangliósido GM (síndrome de Guillain-Barré), glutamato descarboxilasa (GAD65) (diabetes de tipo 1, síndrome del hombre rígido), receptor de glutamato (GLUR) (encefalitis de Rasmussen), ATPasa H/K (gastritis autoinmunitaria), 17-alfa-hidroxilasa (CYP17) (APS-1), 21-hidroxilasa (CYP21) (enfermedad de Addison), IA-2 (ICA512) (diabetes de tipo 1), insulina (diabetes de tipo 1, síndrome hipoglucémico de la insulina (enfermedad de Hirata), resistencia a la insulina de tipo B, acantosis, lupus eritematoso sistémico (LES)), factor intrínseco de tipo 1 (anemia perniciosa), antígeno asociado a la función leucocitaria (LFA-1) (artritis de Lyme resistente al tratamiento), glucoproteína asociada a mielina (MAG) (polineuropatía), proteína básica de mielina (esclerosis múltiple, enfermedad desmielinizante), glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) (esclerosis múltiple), miosina (fiebre reumática), p-80-coilina (dermatitis atópica), complejo de piruvato deshidrogenasa E2 (PDC E2) (cirrosis biliar primaria), simportador de yoduro de sodio (NIS) (enfermedad de Graves, hipotiroidismo autoinmunitario), SOX-10 (vitíligo), proteína compartida del tiroides y el músculo ocular (tiroiditis autoinmunitaria), peroxidasa tiroidea (tiroiditis autoinmunitaria de Hashimoto), receptor de tirotrópina (enfermedad de Graves), transglutaminasa tisular (enfermedad celíaca), coactivador de transcripción p75 (dermatitis atópica), triptófano hidroxilasa (APS-1), tirosinasa (vitíligo, melanoma metastásico) y tirosina hidroxilasa (APS-1), en donde el trastorno o los trastornos autoinmunitarios asociados se enumeran entre paréntesis inmediatamente después de cada analito autoantigénico.

En algunas realizaciones, el trastorno autoinmunitario es un trastorno autoinmunitario sistémico y el analito autoantigénico se selecciona entre: ACTH (deficiencia de ACTH), aminoacil-ARNt histidil sintetasa (miositis, dermatomiositis), aminoacil-ARNt sintetasa (polimiositis, dermatomiositis), cardiolipina (LES), anhidrasa carbónica II (LES, síndrome de Sjogren, esclerosis sistémica), colágeno (artritis reumatoide (AR), LES, esclerosis sistémica progresiva), proteína asociada al centrómero (esclerosis sistémica), ATPasa estimulada por nucleosoma dependiente de ADN (dermatomiositis), fibrilarina (esclerodermia), fibronectina (LES, AR, morfea), glucosa-6-fosfato isomerasa (AR), beta2-glucoproteína I (Beta2-GPI) (síndrome antifosfolipídico primario), golgina (95, 97, 160 y/o 180) (síndrome de Sjogren, LES, AR), proteína de choque térmico (diversos trastornos relacionados con el sistema inmunitario), proteína hemidesmosómica 180 (penfigoide ampolloso, herpes gestacional, penfigoide cicatricial, histona H2A-H2B-DNA (LES), receptor de IgE (urticaria idiopática crónica), queratina (AR), Ku-ADN-proteína cinasa (LES), Ku-nucleoproteína (síndromes del tejido conjuntivo), fosfoproteína La (La 55-B) (síndrome de Sjoren), mieloperoxidasa (glomerulonefritis necrotizante y semilunar (NCGN), vasculitis sistémica), proteinasa 3 (PR3) (granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg-Strauss), ARN polimerasa I-III (RNP) (esclerosis sistémica, LES), proteína de reconocimiento de señales (SRP54) (polimiositis), topoisomerasa-1 (Scl-70) (esclerodermia, síndrome de Raynaud), tubulina (hepatopatía crónica, leishmaniosis visceral) y vimentina (enfermedad autoinmunitaria sistémica), en donde el trastorno o trastornos autoinmunitarios asociados se enumeran entre paréntesis inmediatamente después de cada autoantígeno.

En algunas realizaciones, el trastorno autoinmunitario es un trastorno autoinmunitario de proteínas plasmáticas o un trastorno autoinmunitario de citocinas, y el analito autoantigénico se selecciona entre: inhibidor de C1 (deficiencia autoinmunitaria de C1), C1q (LES, glomerulonefritis proliferativa de membrana (MPGN)), citocina (p. ej., IL-1 alfa, IL-

1beta, IL-, IL-10, LIF) (AR, esclerosis sistémica), factor II (tiempo de coagulación prolongado), factor V (tiempo de coagulación prolongado), factor VII (tiempo de coagulación prolongado), factor VIII (tiempo de coagulación prolongado), factor IX (tiempo de coagulación prolongado), factor X (tiempo de coagulación prolongado), factor XI (tiempo de coagulación prolongado), factor XII (tiempo de coagulación prolongado), trombina (tiempo de coagulación prolongado), vWF (tiempo de coagulación prolongado), glucoproteína IIb/IIIg y Ib/IX (púrpura trombocitopénica autoinmunitaria), IgA (inmunodeficiencia) y LDL oxidada (OxLDL) (aterosclerosis), en donde el trastorno o trastornos autoinmunitarios asociados se enumeran entre paréntesis inmediatamente después de cada analito autoantigénico.

En algunas realizaciones, el trastorno autoinmunitario es un cáncer o trastorno autoinmunitario paraneoplásico y el analito autoantigénico se selecciona entre: anfifisina (neuropatía, cáncer microcítico de pulmón), ciclina B 1 (carcinoma hepatocelular), ADN topoisomerasa II (cáncer de hígado), desmoplaquina (pénfigo paraneoplásico), gefirina (síndrome paraneoplásico del hombre rígido), proteína Hu (encefalomielitis paraneoplásica), receptor de acetilcolina nicotínico neuronal (neuropatía autónoma subaguda, cáncer), p53 (cáncer, LES), p62 (proteína de unión a ARNm de IGF-II) (carcinoma hepatocelular), recoverina (retinopatía asociada al cáncer), proteína R1 (ataxia mioclónica opsoclónica paraneoplásica), espectrina beta IV (síndrome de las neuronas motoras inferiores), sinaptotagmina (síndrome miasténico de Lambert-Eaton), canales de calcio dependientes de la tensión (síndrome miasténico de Lambert-Eaton) y proteína Yo (degeneración cerebelosa paraneoplásica).

En algunas realizaciones, el analito antigénico es un antígeno endógeno que es un polipéptido expresado de forma aberrante. Los ejemplos de dichos antígenos endógenos incluyen, pero sin limitación, amiloide beta (A-beta o A.beta.), alfa sinucleína, cistatina C, tau, ABri, ADan, superóxido dismutasa (SOD), Huntington mutante, PrP.sup.sc o un fragmento de cualquiera de los anteriores.

En algunas realizaciones de la invención, el analito comprende al menos un epítipo de un implante que se va a introducir en un sujeto, productos metabólicos o de degradación de un material de implante o sustancias que se unen específicamente a un epítipo de un material de implante, tales como anticuerpos desarrollados para un material de implante o sus productos de degradación. Dichos implantes pueden incluir, por ejemplo, implantes eléctricos (por ejemplo, marcapasos artificiales), bioimplantes (biomaterial implantado quirúrgicamente en el cuerpo de un sujeto para reemplazar el tejido dañado (por ejemplo, prótesis reconstructiva ortopédica), prótesis cardíacas (válvulas artificiales), piel y córnea), implantes anticonceptivos, implantes dentales, implantes ortopédicos y dispositivos de prevención de adherencias. Los ejemplos de materiales de implante que pueden portar epítipos incluyen látex; silicona; metales, tales como aleaciones de cobalto y cromo (Co-Cr), titanio y aleaciones de titanio; polímeros, tales como polietileno de peso molecular ultra alto (UHMWPE) y cemento de metacrilato de polimetilo (PMMA); y biocerámicas, tales como hidroxiapatita y Bioglass.

Elemento transductor de señales distinto de anticuerpo

Las realizaciones ilustrativas de la presente invención incluyen diversos elementos transductores de señales distintos de anticuerpos. Cada elemento transductor de señal está adaptado para recibir, es decir, unirse a, una molécula detectora que está adaptada para recibir, es decir, unirse a, un analito específico de interés. En una realización, el elemento transductor de señales es una proteína de fusión quimérica transmembrana que se modifica y se expresa en la superficie de la célula biosensora, y que está adaptada para activar la ruta de transducción de señales que da lugar en última instancia a que la proteína indicadora emita una señal detectable. En otra realización, el elemento transductor de señales es una proteína de fusión quimérica soluble que está adaptada para unirse a un transductor de señales de la superficie celular, tal como un receptor nativo o una proteína receptora que está adaptada para activar la ruta de transducción de señales que da lugar en última instancia a que la proteína indicadora emita una señal detectable. En otra realización más, el elemento transductor de señales es una proteína de fusión quimérica soluble que se introduce por ingeniería en y es expresada por la célula biosensora. A continuación, la proteína de fusión quimérica soluble se secreta/excreta en el espacio extracelular donde se une a un transductor de señales de la superficie celular, tal como un receptor nativo o una proteína receptora que está adaptada para activar la ruta de transducción de señales que da lugar en última instancia a que la proteína indicadora emita una señal detectable.

Las proteínas de fusión quiméricas de la presente invención pueden incluir: (i) un componente de una proteína que está adaptado para unirse al al menos un tipo de molécula detectora (p. ej., un anticuerpo soluble); y (ii) un componente de un complejo receptor expresado normalmente por la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería. En algunas realizaciones, el componente de la proteína que está adaptado para unirse al al menos un tipo de molécula detectora puede proceder de una proteína de unión bacteriana (es decir, una proteína de unión a anticuerpo procedente de una bacteria) tal como, por ejemplo, el dominio de unión a IgG de una proteína estreptocócica G (denominada en el presente documento IgGbp o Igbp en las figuras). Pueden incluirse repeticiones en tándem de este dominio de unión a IgG para aumentar la afinidad de la proteína de unión por el anticuerpo soluble. En una realización alternativa, el componente de la proteína de fusión quimérica que está adaptado para unirse al al menos un tipo de molécula detectora es un dominio de unión a anticuerpo procedente de una proteína receptora tal como, por ejemplo, el receptor murino Fc gamma RI (FcγRI). En diversas realizaciones ilustrativas, el componente del complejo receptor expresado normalmente por la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, es IgM (para biosensores de linfocitos B); Igα/β (para biosensores de linfocitos B); IgE (para biosensores de mastocitos); CD19 (para biosensores de linfocitos B), CD3zeta (para biosensores de linfocitos T) o FcεRI (para biosensores de mastocitos).

Los elementos transductores de señales distintos de anticuerpos de la presente invención pueden incluir secuencias proteicas completas o fragmentos proteicos modificados por ingeniería genética, tales como dominios proteicos seleccionados procedentes de moléculas proteicas mayores. Un experto en la materia apreciará que se pueden crear fragmentos de moléculas mayores usando técnicas de ingeniería genética convencional, tales como tecnología de genes sintéticos. Cuando se usan fragmentos de proteínas mayores para diseñar motivos de unión a anticuerpos como aspectos de proteínas de fusión quiméricas, es importante diseñar las proteínas modificadas por ingeniería genética para garantizar el plegamiento conformacional adecuado de los fragmentos proteicos seleccionados. Por lo tanto, es útil incluir (en las proteínas de fusión) elementos conectores o espaciadores cortos que no forman fácilmente estructuras proteicas secundarias. Se pueden usar combinaciones cortas de aminoácidos tales como glicina, serina y alanina, por ejemplo, para estos elementos espaciadores o conectores. En una realización ilustrativa, se usa la secuencia de aminoácidos glicina (G), serina (S), alanina (A), serina (S), glicina (G), serina (S), glicina (G) para separar un dominio de unión de un componente de un complejo receptor en una molécula proteica modificada por ingeniería genética (véase la SEQ ID NO: 19). Con respecto al conector o espaciador peptídico usado para conectar el elemento detector al elemento transductor de señales o interconectar diferentes segmentos de un elemento transductor de señales: el conector normalmente une el extremo carboxilo de un elemento al extremo amino de otro. Los conectores peptídicos pueden variar de 0 a 25 aminoácidos de longitud o cualquier valor entero intermedio y, normalmente, pero no siempre, comprenden aminoácidos hidrófilos tales como glicina (G) y serina (S).

Como se ha indicado anteriormente, cada elemento transductor de señales se une a una molécula detectora que se une a un analito específico de interés. Una molécula detectora que se ha unido a un analito (i) se unirá a un elemento transductor de señales transmembrana; o (ii) a un elemento transductor de señales que se unirá a su vez a un transductor de señales de la superficie celular (p. ej., receptor nativo). En la primera situación, tras la unión de un número suficiente de analitos a un número suficiente de moléculas detectoras que se unen a su vez a elementos transmembrana transductores de señales distintos de anticuerpos, se produce una agregación de elementos transductores de señales en la superficie de la célula biosensora, se activa la ruta de transducción de señales, se produce el proceso biológico y la proteína indicadora emite la señal detectable. En el segundo caso, tras la unión de un número suficiente de analitos a un número suficiente de moléculas detectoras a un número suficiente de elementos transductores de señales distintos de anticuerpos que están a su vez unidos al receptor nativo adecuado, se produce una agregación de los receptores en la superficie celular, se activa la ruta de transducción de señales, se produce el aumento del calcio intracelular y la proteína indicadora emite luz detectable.

Un primer elemento transductor de señales distinto de anticuerpo de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención incluye una proteína de unión bacteriana (IgGbp) fusionada con el dominio constante de la cadena pesada de IgM (linfocito B) con un conector GSASGSG. La SEQ ID NO: 1 proporciona la secuencia de ADN para el elemento transductor de señales IgGbp-IgM y la SEQ ID NO: 2 proporciona la secuencia proteica para el elemento transductor de señales IgGbp-IgM.

Un segundo elemento transductor de señales distinto de anticuerpo de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención incluye una proteína de unión bacteriana (IgGbp) fusionada con el componente Igα/β del receptor de linfocitos B con un conector GSASGSG. La SEQ ID NO: 3 proporciona la secuencia de ADN para el elemento transductor de señales IgGbp-Igα/β y la SEQ ID NO: 4 proporciona la secuencia proteica para el elemento transductor de señales IgGbp-Igα/β.

Un tercer elemento transductor de señales distinto de anticuerpo de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención incluye una proteína de unión bacteriana (IgGbp) fusionada con la cadena zeta de CD3 del receptor de linfocitos T con un conector GSASGSG. La SEQ ID NO: 5 proporciona la secuencia de ADN para el elemento transductor de señales IgGbp-CD3ζ y la SEQ ID NO: 6 proporciona la secuencia proteica para el elemento transductor de señales IgGbp-CD3ζ.

Un cuarto elemento transductor de señales distinto de anticuerpo de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención incluye el dominio de unión a anticuerpo de FcγRI fusionado con el dominio constante de la cadena pesada de IgM (linfocito B) con un conector GSASGSG. La SEQ ID NO: 7 proporciona la secuencia de ADN para el elemento transductor de señales FcγRI-IgM y la SEQ ID NO: 8 proporciona la secuencia proteica para el elemento transductor de señales FcγRI-IgM.

Un quinto elemento transductor de señales distinto de anticuerpo de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención incluye el dominio de unión a anticuerpo FcγRI fusionado con el componente Igα/β del receptor de linfocitos B con un conector GSASGSG. La SEQ ID NO: 9 proporciona la secuencia de ADN para el elemento transductor de señales FcγRI-Igα/β y la SEQ ID NO: 10 proporciona la secuencia proteica para el elemento transductor de señales FcγRI-Igα/β.

Un sexto elemento transductor de señales distinto de anticuerpo de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención incluye una proteína de unión a anticuerpo FcγRI fusionada con la cadena zeta de CD3 del receptor de linfocitos T con un conector GSASGSG. La SEQ ID NO: 11 proporciona la secuencia de ADN para el elemento transductor de señales FcγRI-CD3ζ y la SEQ ID NO: 12 proporciona la secuencia proteica para el elemento transductor

de señales FcγRI-CD3ζ.

Un séptimo elemento transductor de señales distinto de anticuerpo ilustrativo de acuerdo con la presente invención incluye una proteína de unión bacteriana (IgGbp) fusionada con el dominio constante de IgE (linfocito B) con un conector GSASGSG. La SEQ ID NO: 13 proporciona la secuencia de ADN para el elemento transductor de señales IgGbp-IgE y la SEQ ID NO: 14 proporciona la secuencia proteica para el elemento transductor de señales IgGbp-IgE.

Un octavo elemento transductor de señales distinto de anticuerpo ilustrativo de acuerdo con la presente invención incluye el dominio de unión a anticuerpo FcγRI fusionado con el dominio constante de IgE (linfocito B) con un conector GSASGSG. La SEQ ID NO: 15 proporciona la secuencia de ADN para el elemento transductor de señales FcγRI-IgE y la SEQ ID NO: 16 proporciona la secuencia proteica para el elemento transductor de señales FcγRI-IgE.

Un noveno elemento transductor de señales distinto de anticuerpo ilustrativo de acuerdo con la presente invención incluye estreptavidina monomérica fusionada con la cadena zeta CD3 del receptor de linfocitos T con un conector GSASGSG. La SEQ ID NO: 17 proporciona la secuencia de ADN para el elemento transductor de señales mSA-CD3ζ y la SEQ ID NO: 18 proporciona la secuencia proteica para el elemento transductor de señales mSA-CD3ζ. La estreptavidina monomérica es una forma recombinante de estreptavidina que incluye mutaciones que rompen el tetrámero de estreptavidina en un monómero y mejoran la solubilidad de la subunidad aislada resultante.

Biosensor ilustrativo I

Con referencia a las figs. 1a-b, un primer biosensor 100 de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención incluye células T Jurkat 102 que se han modificado por ingeniería para producir ecuatorina 104 y que se han cargado con CTZ 106 para formar un complejo de ecuatorina/CTZ, como se ha descrito anteriormente. Este biosensor en particular también se ha diseñado por ingeniería genética para expresar el elemento transductor de señales transmembrana 108 distinto de anticuerpo, que es IgGbp-CD3ζ (SEQ ID NO: 5-6), aunque el elemento transductor de señal transmembrana distinto de anticuerpo FcγRI-CD3ζ (SEQ ID NO: 11-12) también puede usarse con el biosensor 100. La célula 102 biosensora también incluye al menos una ruta 110 de transducción de señales, cuya activación da lugar a un aumento del Ca²⁺ 112 intracelular. Como se muestra en la fig. 1b, cuando un número suficiente de moléculas 114 detectoras (p. ej., anticuerpos solubles) a las que se une el analito 116 diana (p. ej., *E. coli* 0157) se unen a elementos 108 transductores de señales transmembrana distintos de anticuerpos, se activa la ruta 110 de transducción de señales, aumenta el Ca²⁺ 112 intracelular, el complejo ecuatorina/CTZ experimenta un cambio conformacional y emite una señal (fotón) de luz 118 que es detectada por el tubo 120 fotomultiplicador y el pico 122 se muestra gráficamente en un dispositivo de análisis (véase la descripción a continuación), que indica la presencia del analito 116 diana en una muestra que se está analizando. La visualización puede ser tanto cualitativa como cuantitativa con respecto al analito 116 diana.

Biosensor ilustrativo II

Con referencia a las figs. 2a-b, un segundo biosensor 200 de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención incluye mastocitos 202 MC/9 (ATCC® CRL-8306™) que se han modificado por ingeniería genética para producir ecuatorina 204 y que se han cargado con CTZ 206 para formar un complejo de ecuatorina/CTZ, como se ha descrito anteriormente. Este biosensor en particular expresa el receptor 207 épsilon de Fc nativo (es decir, FcεRI), que se une al elemento 208 transductor de señales distinto de anticuerpo soluble, que es IgGbp-IgE (SEQ ID NO: 13-14), aunque el elemento transductor de señales distinto de anticuerpo FcγRI-IgE. (SEQ ID NO: 15-16) también se puede usar con el biosensor 200. Como se muestra en la fig. 2b, cuando un número suficiente de moléculas 214 detectoras (p. ej., anticuerpos solubles) a las que se une el analito 216 diana (p. ej., *E. coli* 0157) se unen a elementos 208 transductores de señales distintos de anticuerpos que se han unido previamente a receptores 207 épsilon Fc nativo, se activa la ruta 210 de transducción de señales, aumenta el Ca²⁺ 212 intracelular, el complejo ecuatorina/CTZ experimenta un cambio conformacional y emite una señal (fotón) de luz 218 que es detectada por el tubo 220 fotomultiplicador y el pico 222 se muestra gráficamente en un dispositivo de análisis (véase la descripción a continuación), que indica la presencia del analito 216 diana en una muestra que se está analizando. La visualización puede ser tanto cualitativa como cuantitativa con respecto al analito 216 diana.

Biosensor ilustrativo III

Con referencia a las figs. 3a-b, un tercer biosensor 300 de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención incluye mastocitos 302 MC/9 (ATCC® CRL-8306™) que se han modificado por ingeniería genética para producir ecuatorina 304 y que se han cargado con CTZ 306 para formar un complejo de ecuatorina/CTZ, como se ha descrito anteriormente. Este biosensor en particular expresa el receptor 307 épsilon de Fc nativo (es decir, FcεRI), que se une al elemento 308 transductor de señales distinto de anticuerpo, que es IgGbp-IgE (SEQ ID NO: 13-14), aunque el elemento transductor de señales distinto de anticuerpo FcγRI-IgE. (SEQ ID NO: 15-16) también se puede usar con el biosensor 300. En esta realización particular, las células 302 biosensoras se han modificado adicionalmente por ingeniería genética para expresar IgGbp-IgE y excretar este elemento transductor de señales distinto de anticuerpo en el espacio extracelular, en donde se une al FcεRI nativo expresado en la superficie celular. Como se muestra en la fig. 3b, cuando un número suficiente de moléculas 314 detectoras (p. ej., anticuerpos solubles) a las que se une el

analito 316 diana (p. ej., *E. coli* 0157) se unen a elementos 308 transductores de señales distintos de anticuerpos que se han unido previamente a receptores 307 épsilon Fc nativo, se activa la ruta 310 de transducción de señales, aumenta el Ca^{2+} 312 intracelular, el complejo ecurina/CTZ experimenta un cambio conformacional y emite una señal (fotón) de luz 318 que es detectada por el tubo 320 fotomultiplicador y el pico 322 se muestra gráficamente en un dispositivo de análisis (véase la descripción a continuación), que indica la presencia del analito 316 diana en una muestra que se está analizando. La visualización puede ser tanto cualitativa como cuantitativa con respecto al analito 316 diana.

Biosensor ilustrativo IV

Con referencia a las figs. 4, un cuarto biosensor 400 de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención incluye células 402 biosensoras que se han diseñado por ingeniería genética para producir ecurina y para expresar el elemento transductor de señales transmembrana distinto de anticuerpo 408, que es mSA-CD3 ζ (SEQ ID NO: 17-18). El elemento transductor de señales distinto de anticuerpo mSA-CD3 ζ (estreptavidina monomérica-CD3 ζ) se une a una molécula detectora biotinilada 414, que se une específicamente a una molécula diana 416 tal como, por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico (EGF). Un anticuerpo 417 antimolécula diana tal como, por ejemplo, anti-EGF, crea multímeros diana que agrupan múltiples elementos de transducción de señales e inducen la transducción de señales como se ha descrito anteriormente. En otras realizaciones, el componente de estreptavidina monomérico se reemplaza con un componente biotinilado y se pueden emplear medios de enlace alternativos.

Biosensor ilustrativo V

Con referencia a la fig. 5, un quinto biosensor 500 de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención incluye células 502 biosensoras que se han diseñado por ingeniería genética para producir ecurina y para expresar el elemento transductor de señales transmembrana distinto de anticuerpo 508, que es mSA-CD3 ζ (SEQ ID NO: 17-18). El elemento transductor de señales distinto de anticuerpo mSA-CD3 ζ (estreptavidina monomérica-CD3 ζ) se une a una molécula detectora biotinilada 514, que en algunas realizaciones es una molécula de autoantígeno. La molécula 514 detectora biotinilada se une específicamente a una molécula diana 516, que en algunas realizaciones es una molécula antiautoantígeno. Los autoanticuerpos en una muestra de suero crean multímeros diana que agrupan múltiples elementos transductores de señales e inducen la transducción de señales como se ha descrito anteriormente. En otras realizaciones, el componente de estreptavidina monomérico se reemplaza con un componente biotinilado y se pueden emplear medios de enlace alternativos.

Las secuencias de aminoácidos del polipéptido transductor de señales usadas para producir las proteínas quiméricas de la invención pueden tener al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87,5 %, 90 %, 92,5 %, 95 %, 97,5 %, 98 %, 99 % de identidad o similitud de secuencia con las proteínas o dominios identificados por o en los siguientes números de referencia: cadena pesada de IgM (GenBank: CAC20458.1), Tg-alfa (P11912.2, GI:547896), Ig-beta (P40259.1 GI:728994), CD19 (AAA69966.1 GI:901823), CD3zeta (P20963.2, GI: 23830999), IgE alfa (1F2Q A, GI:9257150) y subunidad alfa de Fc-épsilonR1 (P12319.1, GI: 119865).

La proteína A de *Staphylococcus aureus* (P02976.3, GI: 110283003) está codificada por el gen *spa* de *Staphylococcus aureus* y su estructura, incluyendo sus segmentos de unión a Ig y las propiedades de unión a inmunoglobulina son bien conocidas y se incorporan por referencia a Graille, *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 9 de mayo de 2000; 97 (10): 5399-404; y Roben, *et al.* J Immunol. 15 de jun de 1995; 154 (12): 6437-45. Pueden producirse variantes de la proteína A o sus segmentos de unión a inmunoglobulina que tengan al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87,5 %, 90 %, 92,5 %, 95 %, 97,5 %, 98 %, 99 % de identidad o similitud de secuencia con secuencias conocidas de aminoácidos de la proteína A y la capacidad de unirse a una inmunoglobulina u otro analito, tal como los descritos por Graille, *et al.* y Roban, *et al.*, mediante técnicas de biología molecular bien conocidas en este campo, incluyendo mediante síntesis directa de un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de unión a inmunoglobulina.

Otras proteínas bacterianas de unión a inmunoglobulina, tales como proteína G de *Streptococcus* y variantes modificadas por ingeniería genética de dichas proteínas, son conocidos y se incorporan por referencia a Bailey, *et al.*, J Immunol Methods. 15 de diciembre de 2014; 415: 24-30 (doi: 10.1016/j.jim.2014.10.003) (publicación electrónica, 22 de octubre de 2014); y a Watanabe, *et al.*, J Biol Chem. 1 de mayo de 2009; 284 (18): 12373-8 (doi: 10.1074/jbc.M809236200) (publicación electrónica del 6 de marzo de 2009). Pueden producirse variantes de la proteína G o sus segmentos de unión a inmunoglobulina que tengan al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87,5 %, 90 %, 92,5 %, 95 %, 97,5 %, 98 %, 99 % de identidad o similitud de secuencia con secuencias conocidas de aminoácidos de la proteína G y la capacidad de unirse a una inmunoglobulina u otro analito, tal como los descritos por Bailey, *et al.* y Watanabe, *et al.*, mediante técnicas de biología molecular bien conocidas en este campo, incluyendo mediante síntesis directa de un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de unión a inmunoglobulina.

Los receptores de Fc (FcR) se unen a la parte Fc de una inmunoglobulina y se conocen muchos tipos de dichos receptores de Fc, incluyendo Fc γ RI y Fc ϵ RI. Las características de unión estructurales y funcionales de estos FcR se incorporan por referencia a Fridman, FASEB J. septiembre de 1991; 5 (12): 2684-90. Se pueden producir variantes de FcR o sus segmentos de unión a inmunoglobulina que tengan al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87,5 %, 90 %, 92,5 %, 95 %, 97,5 %, 98 %, 99 % de identidad o similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos de FcR

conocida, tal como una secuencia descrita por Fridman, mediante técnicas de biología molecular bien conocidas en este campo, incluyendo la síntesis directa de un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de unión a inmunoglobulina.

- 5 Una proteína transductora de señales según la invención puede tener al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87,5 %, 90 %, 92,5 %, 95 %, 97,5 %, 98 %, 99 % de identidad o similitud de secuencia con las proteínas transductoras de señales químéricas desveladas descritas por las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18 y también tienen la capacidad de unirse a un analito, tal como una inmunoglobulina, y después transducir una señal a la célula biosensora diseñada por ingeniería genética. Dichas variantes pueden construirse mediante métodos bien conocidos en las técnicas de biología molecular o mediante síntesis química de polinucleótidos que codifican las proteínas indicadoras químéricas variantes, inserción de las secuencias codificantes en un vector y transformación o transfección de una célula competente con el vector.

Clasificación y clonación de células

- 15 El diseño y la construcción de los biosensores de la presente invención dieron lugar a una población mixta de células biosensoras cuando se cultivaron. Algunas células no expresaron los factores diseñados por ingeniería genética, mientras que otras expresaron los factores en diferentes niveles. Después de una electroporación e inserción de genes exitosas, se cultivaron células biosensoras y se analizaron para determinar la respuesta biológica (señal de destellos) como poblaciones mixtas. Se realizó clasificación de células individuales usando un citómetro de flujo. Las células se aislaron y después se expandieron para su análisis para seleccionar las que expresaban altos niveles de las proteínas deseadas. Para este proceso, se usaron anticuerpos marcados con fluorescencia para dirigirse a diferentes receptores en las células biosensoras, permitiendo de este modo el proceso de clasificación. Los clones individuales se exploraron para determinar la señalización y se seleccionaron los mejores clones. Mediante este proceso, se identificaron y aislaron los clones más adecuados. Se realizó clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y tinción de células vivas para la proteína extracelular como se describe a continuación.

- Las células biosensoras diseñadas por ingeniería genética se contaron, se centrifugaron suavemente y se resuspendieron en tampón de lavado (HBSS + BSA al 2 %) hasta una concentración final de 1×10^7 - 1×10^8 células/ml. En cada experimento, se usó un anticuerpo completo con la región Fc o F(ab)₂. Cuando se usó el anticuerpo completo, se añadieron 1-0,5 µg de anticuerpo de bloqueo del receptor de Fc a cada tubo vacío de 12 x 15 mm que iba a recibir células. En cada uno de estos tubos, se añadieron 100 µl de células (de 1×10^6 a 1×10^7 células) encima del anticuerpo de bloqueo de Fc. Las células se mezclaron suavemente y se incubaron durante 15 minutos a 4 °C o temperatura ambiente. Cuando se usó F(ab)₂, se omitió la etapa anterior de bloqueo de Fc. Se añadió un total de 1 µg de anticuerpo primario (contra el receptor elegido) y las células se mezclaron después suavemente antes de incubar durante 20-40 minutos en hielo (o a 4 °C). Esta temperatura evitó la internalización del receptor. Las células se agitaron suavemente (se hicieron girar) de forma intermitente para estimular el marcaje. Se añadió un volumen de 2 ml de tampón de lavado frío, después se centrifugaron las células a 4 °C y se desechó el sobrenadante. La etapa de lavado se repitió antes de resuspender las células en 100 µl de tampón de lavado/clasificación. Se añadió un anticuerpo secundario marcado con FITC (0,5-1 µg) a las células y se mezcló antes de incubar en hielo (o a 4 °C) durante 20-40 minutos. Las células se protegieron de la luz durante todo el proceso. Se añadió un volumen de 2 ml de tampón de lavado frío, después se centrifugaron las células y se desechó el sobrenadante. Se repitió la etapa de lavado y las células se resuspendieron en 0,5-1 ml de tampón de lavado. Las células se incubaron en hielo hasta el momento de la clasificación. La clasificación se realizó lo antes posible (al menos el mismo día). La clonación y el cultivo de células después de la clasificación de células individuales se realizaron como se describe a continuación.

- Las células biosensoras se clasificaron en placas de 96 pocillos, conteniendo cada pocillo una célula y 100-200 µl de medio de cultivo celular. Las placas se exploraron/supervisaron durante los siguientes 10 a 14 días para determinar la velocidad de crecimiento y valorar cuándo transferir a una placa de 24 pocillos. Durante la exploración, se usaron diferentes marcas para diferentes condiciones. Algunos pozos se marcaron si contenían células vivas, pero no estaban listos para la transferencia y también se marcaron los pocillos contaminados. Las células se transfirieron a una placa de 24 pocillos que contenía 1,0 ml del medio adecuado en cada pocillo. En casos de células contaminadas, el lavado se realizó añadiendo toda la suspensión celular de un pocillo en 5 ml de PBS 1x estéril en un tubo cónico de 15 ml. A continuación, las células se centrifugaron a 170 FCR durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 1,0 ml de medio nuevo en una placa de 24 pocillos para cultivar. Tras un crecimiento continuo, las células se transfirieron a una placa de 12 pocillos con 1,5 ml de medio nuevo por pocillo.

- Para el cribado de clones, después de su cultivo en una placa de 12 pocillos, se contaron las células para determinar si estaban listas para la carga y la prueba de destello. Durante la prueba de destello, una sola iteración implicó 25 000 células. Se cultivaron suficientes células para adaptarse a las pruebas y también dejar algunas para continuar el cultivo. Esta etapa marcó el primer ciclo de cribado de clones. Los clones seleccionados se cultivaron adicionalmente y se sometieron a pruebas posteriores dependiendo de las propiedades deseadas. Para la respuesta biológica, por ejemplo, se cribaron clones Jurkat-FcγRI-CD3ζ usando anticuerpos anti-CD3ε (control positivo) y anticuerpos monoclonales contra bacterias con las bacterias respectivas, mientras que se usó digitonina para la prueba de respuesta química. Los clones MC/9-Aeq se cribaron usando anticuerpos anti-FcεRI (respuesta biológica) y digitonina (respuesta química).

En resumen, se realizó clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) usando marcadores de anticuerpos fluorescentes para seleccionar y aislar las células que expresaban en gran medida las proteínas deseadas, que en este caso eran los receptores diseñados por ingeniería genética. Este proceso dio lugar a una población de células biosensoras de alta expresión que se confirmó adicionalmente mediante pruebas de destello usando el PMT en el dispositivo de análisis. Durante todo el proceso, las células se contaron usando un contador celular automático para eliminar el error humano y mejorar la uniformidad y la eficiencia. Diferentes clones de Jurkat-FcγRI-CD3ζ dieron diferentes niveles de respuesta biológica cuando se probaron con mAb anti-*E. coli* O111 y bacterias *E. coli* O111. Se probaron muchos clones de la misma manera y los que tuvieron la respuesta más alta se guardaron en un banco de clones. De manera análoga, los resultados de respuesta química obtenidos de la prueba de diferentes clones de MC/9-Aeq usando el producto químico digitonina indicaron que diferentes clones dieron diferentes niveles de respuesta química dependiendo del nivel de expresión de eucorina. Los clones con la señal más alta se guardaron en el banco de clones.

Cultivo de células biosensoras

Se usaron diferentes formulaciones de medios de cultivo para diferentes líneas celulares para garantizar condiciones de crecimiento óptimas. Se cultivaron mastocitos MC/9 en medios completos de mastocitos (DMEM - Sigma, Cat. n.º D5796; pen/estrep 1x; FBS al 10 %; complemento de T-Stim al 10 %; β-mercaptoetanol 50 μM). Se cultivaron linfocitos T Jurkat en medio RPMI completo (RPMI-ThermoFisher; FBS al 10 %; pen/estrep 1x). Dependiendo de las características de las construcciones electroporadas, se usaron diferentes antibióticos para la selección en cultivo celular. Se añadieron antibióticos adecuados al medio de cultivo 2-3 días después de la electroporación para seleccionar células que habían integrado con éxito las construcciones de ADN linealizado. La concentración celular se mantuvo entre $4,0 \times 10^5$ y $1,0 \times 10^6$ células/ml para crecimiento celular óptimo. Se procesaron diferentes líneas celulares y clones para almacenamiento a largo plazo y las reservas se congelaron en nitrógeno líquido de la siguiente manera: (i) las células se centrifugaron a 150 FCR durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante; (ii) el sedimento celular se resuspendió en medio de congelación (RPMI; FBS al 50 %; DMSO al 10 %) a una concentración de $5,0 \times 10^5$ células/ml; y (iii) se separaron alícuotas de volúmenes de 1 ml en viales Nunc Cryo de 2 ml y se congelaron a -80 °C durante 24 horas antes de transferirlos a nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

Carga de células biosensoras

Las células biosensoras de la presente invención se centrifugaron en tubos cónicos de 50 ml a 150 FCR durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en medio de carga (RPMI; FBS empobrecido en anticuerpos al 10 %; pen/estrep 1x; Pluronic F68 al 0,1 % y coelenteracina 1,5 mM) a una concentración de 25 000 células/180 μl. Adicionalmente, las células también se cargaron a diferentes concentraciones tales como, por ejemplo, 100 000 células/180 μl y 400 000 células/180 μl. Las células se cargaron a temperatura ambiente con agitación/balanceo suave durante 24-26 horas. Antes de su uso, el FBS empobrecido en anticuerpos disponible en el mercado puede purificarse adicionalmente usando otros sistemas de agotamiento de anticuerpos.

Concentración de células

Se demostró que las células biosensoras de la presente invención se cargan más eficazmente a concentraciones menores que a concentraciones mayores. Por ejemplo, se ha mostrado que la carga de células a una densidad de 25 000 células/180 μl frente a 400 000 células/180 μl da lugar a un aumento de dos veces en la señal detectable. Se cargaron células P5G7 del clon Jurkat-FcγRI-CD3ζ tanto a 400 000 células/180 μl como a 25 000 células/180 μl y después se probaron a 400 000 células/180 μl en cada reacción. Durante una noche se usó cultivo de bacterias de *E. coli* O111 con mAb anti-*E. coli* O111 23 nM. Las células biosensoras cargadas a una concentración menor dieron una señal mayor para el mismo número de células bacterianas analizadas. La densidad de las células biosensoras se modifica principalmente mediante la concentración de las células después de la carga para permitir una detección óptima de patógenos. Se usaron diferentes concentraciones para la detección de patógenos dependiendo del patógeno diana y la calidad del anticuerpo, cuando la molécula detectora es un anticuerpo soluble. Las células biosensoras se concentran mediante centrifugación a 150 FCR durante 10 minutos y el sedimento celular se resuspende en el volumen deseado del medio de prueba. El medio de carga también puede actuar como medio de prueba. En determinados casos, la adición de FBS normal al medio desencadenó una respuesta biológica que dio lugar a una señal de biosensor (destello) debido a la alta concentración de anticuerpos en FBS normal. Por lo tanto, se usó FBS empobrecido en anticuerpos disponible en el mercado en el proceso de carga, lo que redujo la señal desencadenada por anticuerpos sin eliminarla por completo. Se usaron métodos adicionales para agotar más las trazas de anticuerpos en el FBS empobrecido en anticuerpos disponible en el mercado.

Bioensayo

En realizaciones ilustrativas de la presente invención, el bioensayo de analito se formatea con la célula biosensora y un anticuerpo monoclonal soluble (mAb) que es específico para ese analito (p. ej., patógeno). En estas realizaciones, la especificidad del bioensayo está directamente relacionada con la unión selectiva del anticuerpo soluble al analito diana y la especificidad y sensibilidad del biosensor se determina mediante la detección y medición de la

bioluminiscencia. En este proceso, las células biosensoras se cargan inicialmente usando la molécula emisora de luz, coelenteracina (CTZ). A continuación, se añaden el anticuerpo soluble elegido y la muestra que se está analizando. Si está presente un patógeno diana en la muestra, este interactúa con el anticuerpo soluble, que se une a una proteína de fusión expresada por la célula biosensora, desencadenando, en última instancia, una cascada de señales que da lugar a la emisión de luz de la célula biosensora. La luz emitida es detectada por un tubo fotomultiplicador (PMT) en el dispositivo de análisis y la señal emitida por la célula biosensora se presenta como recuentos de fotones por segundo. Como se describe a continuación, se han desarrollado diversos métodos para detectar patógenos basados en el anticuerpo soluble y el patógeno diana. Tres de dichos métodos, que se describen en detalle a continuación, incluyen: (i) adición instantánea de moléculas detectoras (p. ej., anticuerpos); (ii) recubrir las células biosensoras con moléculas detectoras (p. ej., anticuerpos); y (iii) recubrir analitos (p. ej., bacterias) con anticuerpos.

Unidad de análisis

El aspecto de bioensayo de la presente invención en el presente documento puede llevarse a cabo en una subunidad de análisis o un cartucho de análisis diseñado para su uso con un sistema y dispositivo de análisis portátil o de sobremesa tal como el desvelado en la solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 13/711 296 (patente de los Estados Unidos n.º 9 023 640), que se incorpora en el presente documento por referencia, en su totalidad. El cartucho de análisis, que puede ser un artículo desechable de un solo uso, recibe tanto la muestra como el biosensor y al introducir el biosensor en el cartucho de análisis se mezcla la muestra y el biosensor de una manera predecible y controlada. El cartucho de análisis incluye además una cámara de reacción para recibir la muestra de prueba y el biosensor, en donde la cámara de reacción tiene una geometría interna predeterminada y se ha adaptado además para minimizar o eliminar el ruido de fondo con el fin de mejorar la relación general de señal con respecto a ruido. Se puede colocar al menos un estabilizador en la cámara de reacción para minimizar el daño por fuerza de cizallamiento en la muestra de prueba y el biosensor durante el proceso de mezcla.

En una realización ilustrativa, la cámara de reacción y los canales de líquido que conducen a la cámara de reacción dentro del cartucho de análisis están diseñados para lograr varios objetivos. Un canal de entrada para el líquido que entra en la cámara de reacción incluye una forma tubular y el diámetro del tubo es relativamente pequeño y se estrecha para hacerse más pequeño en la entrada de la cámara de reacción. Esto aumenta la velocidad del líquido que entra en la cámara de reacción y promueve una mezcla más vigorosa y homogénea debido al movimiento masivo de los reactivos dentro de la cámara de reacción. Es deseable mezclar los reactivos y la muestra de manera que se promueva la mezcla más allá de la difusión molecular, para minimizar la duración de la prueba, garantizando que cualquier agente infeccioso presente en la muestra se encuentre rápidamente con el biosensor. El canal de entrada se puede desviar del eje central de la cámara de reacción para promover un movimiento de rotación en sentido horario o antihorario de los reactivos alrededor del eje central de la cámara de prueba a medida que se mezclan los líquidos para aumentar la homogeneidad de la mezcla. El canal de entrada también es aproximadamente tangente a la superficie interior de la cámara de reacción para permitir que el líquido entrante viaje desde el canal de entrada a la cámara de reacción mientras permanece en contacto con la superficie lateral de la cámara de reacción, lo que permite un flujo mínimamente turbulento y una mínima introducción de burbujas de aire en los líquidos mezclados. Las burbujas no son deseables debido a la refracción impredecible de la luz que provocan cuando la luz emitida por los reactivos viaja a través de burbujas dentro de los reactivos mezclados o en la superficie de los reactivos mezclados. El eje del canal de entrada puede tener un ángulo por encima de la horizontal (p. ej., aproximadamente 30 grados) para proporcionar una dirección parcialmente hacia abajo al flujo de fluido entrante para asegurar que el reactivo se mezcle con el fluido que reside en el fondo de la cámara de reacción. Como alternativa, los reactivos pueden introducirse en la cámara de prueba usando medios alternativos de suministro de fluido, tales como un canal vertical para suministrar los reactivos al fondo de la cámara de reacción, o suministrando el fluido directamente en el eje central de la cámara de prueba para crear una columna de reactivo que fluye hacia la cámara de prueba promoviendo de este modo la mezcla a través del arrastre.

La forma (es decir, la geometría predeterminada) de la cámara de reacción puede ser una sección giratoria que facilite el movimiento en sentido horario o antihorario de los líquidos de mezcla alrededor del eje central de la cámara de reacción. Como alternativa, si se desea, se puede utilizar una forma de cámara de reacción distinta de una sección giratoria, tal como una forma rectangular o irregular. En una realización, la sección giratoria usada para formar la cámara de reacción es una parte de una elipse para facilitar la captación de luz lateral emitida por los reactivos y reflejar esta luz hacia la superficie del detector, que puede ser un tubo fotomultiplicador (PMT) (Hamamatsu). La superficie de la cámara de reacción puede ser reflectante, para mejorar las propiedades de captación de luz de la forma elíptica. En algunas realizaciones, el diámetro máximo de la superficie del PMT está limitado para lograr una relación máxima de señal con respecto a ruido de la salida del sistema. El diámetro de la cámara de reacción puede diseñarse para que coincida aproximadamente con el diámetro del PMT, lo que influye en la forma elíptica que se puede lograr en una cámara de reacción diseñada para contener un volumen específico de líquidos. Debido a la forma elíptica restringida, el color de la superficie de la cámara de reacción puede ser un blanco parcialmente difuso debido a la captación de luz adicional que se produce cuando la luz que de otro modo no se reflejaría directamente en la superficie de la PMT se difunde parcialmente por la superficie blanca y una fracción de esta se dirige hacia la superficie del PMT. Como alternativa, si se desea, se pueden usar otros acabados de superficie y materiales tales como un aluminio con acabado casi especular o un material transparente. Además, es deseable que el material de la cámara de reacción sea mínimamente fosforescente, con el fin de evitar que la luz emitida por la propia cámara de reacción

eclipse cualquier luz emitida por los reactivos y evite la detección. Aunque se ha descubierto que los materiales poliméricos blancos tales como el acrilonitrilo butadieno estireno u otros materiales poliméricos similares presentan un bajo nivel de fosforescencia, se ha descubierto que la captación de luz adicional proporcionada por la combinación de reflexión y difusión de luz es un beneficio para la relación de señal con respecto a ruido de la salida del circuito sensor de luz.

En una realización ilustrativa, la subunidad de prueba proporciona un sistema para su uso en el análisis de muestras. El sistema incluye un reactivo biosensor, en el que el reactivo biosensor incluye células biológicas vivas; una tarjeta de depósito, que tiene una parte de bucle largo y una parte de bucle corto, en donde la tarjeta de depósito almacena el reactivo biosensor; y una base de cartucho de análisis, en donde la base del cartucho de análisis está configurada para aceptar la tarjeta de depósito. La base del cartucho de análisis incluye además: (i) una cámara de reacción que tiene un eje central, en donde la cámara de reacción tiene la forma de una media elipse girada; y (ii) un canal de entrada conectado a la cámara de reacción, en donde el canal de entrada se sitúa por encima de la cámara de reacción en un ángulo de 15-60 grados por encima de la horizontal, en donde el canal de entrada está desplazado del eje central de la cámara de reacción y en donde, al introducir una muestra para analizar en la base del cartucho de análisis a través del canal de entrada, la muestra se mezcla homogéneamente con el reactivo biosensor mientras se minimiza el daño a las células biológicas vivas.

En otra realización ilustrativa, la subunidad de análisis proporciona un sistema para detectar rápidamente la presencia de un analito en una muestra biológica. Este sistema incluye un reactivo biosensor que incluye al menos un anticuerpo específico para un analito predeterminado y un agente bioluminiscente, en donde el al menos un anticuerpo se expresa en la superficie de los linfocitos vivos, modificados por ingeniería genética, y en donde el agente bioluminiscente es expresado por los linfocitos vivos, modificados por ingeniería genética, siendo el reactivo biosensor operativo para: (i) detectar la presencia de un analito específico en una muestra para analizar y (ii) emitir una señal luminosa detectable cuando el reactivo biosensor reacciona con la muestra y detecta la presencia del analito específico en la muestra. También se incluye un cartucho de análisis. El cartucho de análisis incluye además: (i) una tarjeta de depósito, en donde la tarjeta de depósito incluye además el reactivo biosensor; y (ii) una base de cartucho de análisis, en donde la base del cartucho de análisis está configurada para aceptar la tarjeta de depósito. La base del cartucho de análisis incluye además: a) una cámara de reacción que tiene un eje central, en donde la cámara de reacción tiene la forma de una media elipse girada; b) un canal de entrada conectado a la cámara de reacción, en donde el canal de entrada se sitúa por encima de la cámara de reacción en un ángulo de 15-60 grados por encima de la horizontal y en donde el canal de entrada está desplazado del eje central de la cámara de reacción; y c) en donde al introducir la muestra en la base del cartucho de análisis a través del canal de entrada, la muestra se mezcla homogéneamente con el reactivo biosensor mientras se minimiza el daño a los linfocitos vivos, modificados por ingeniería genética, y se minimiza cualquier burbujeo del reactivo biosensor mezclado y la muestra en la cámara de reacción. También se incluye una unidad de análisis adaptada para recibir el cartucho de análisis. La unidad de análisis incluye un sensor para detectar la señal de luz detectable emitida por el reactivo biosensor al reaccionar con la muestra, siendo la detección de la señal luminosa detectable emitida indicativa de la presencia del analito en la muestra y, en donde la detección del analito específico en la muestra ocurre en tiempo real.

Bioensayo ilustrativo 1: adición instantánea de anticuerpos

En una realización ilustrativa del bioensayo de la presente invención, en donde la molécula detectora es un anticuerpo soluble, el anticuerpo soluble y la muestra para analizar se mezclan entre sí inmediatamente antes de la introducción de las células biosensoras en la muestra de prueba. En esta realización, las células biosensoras cargadas se centrifugan y concentran hasta aproximadamente 400 000 células/180 µl (adecuado para una única reacción) en el medio de carga. A continuación, se carga una alícuota de 180 µl (aproximadamente 400 000 células) de las células biosensoras cargadas en la parte de bucle largo de la tarjeta de depósito. Para un control positivo, se cargan 30 µl de anticuerpo anti-CD3ε en medio RPMI en la parte de bucle corto de la tarjeta de depósito. A continuación, la tarjeta de depósito se fija en la base del cartucho de análisis. Se mezcla un volumen de 2 µl de un anticuerpo (a 0,5 mg/ml) contra el patógeno diana, tal como anti-*E. coli* O111 (en donde el patógeno diana es *E. coli* O111), con 28 µl de la muestra para analizar en la cámara de mezcla del cartucho. La base del cartucho de análisis se inserta en el dispositivo de análisis y las células biosensoras cargadas se inyectan en la cámara de reacción para iniciar la reacción. La señal resultante se registra durante 4 a 8 minutos y, al final del periodo de prueba, los 30 µl de anticuerpo anti-CD3ε se inyectan desde el bucle corto del depósito en la cámara de reacción como una reacción de control positivo que se registra durante 2 minutos. Como control positivo alternativo, se pueden usar 30 µl de digitonina 0,61 mM en lugar de anticuerpo anti-CD3ε. Se puede realizar una prueba de control negativo usando un patógeno predeterminado que no es específico para el anticuerpo que se usa.

Bioensayo ilustrativo 2: recubrimiento de células biosensoras con anticuerpos

En otra realización ilustrativa del bioensayo de la presente invención, en donde la molécula detectora es un anticuerpo soluble, las células biosensoras se recubren con el anticuerpo soluble durante un periodo de tiempo antes de mezclar la muestra que se va a analizar con las células biosensoras. En esta realización, las células biosensoras cargadas se centrifugan y concentran hasta aproximadamente 400 000 células/180 µl (adecuado para una reacción) en el medio de carga. A continuación, se mezcla una alícuota de 180 µl (aproximadamente 400 000 células) de las células

biosensoras con un volumen de 2 µl de un anticuerpo (a 0,5 mg/ml) contra el patógeno diana, tal como anti-*E. coli* O111 (en donde el patógeno diana es *E. coli* O111), en un tubo Eppendorf. Las células biosensoras mezcladas con el anticuerpo se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se cargan en la parte de bucle largo de la tarjeta de depósito. Para un control positivo, se cargan 30 µl de anticuerpo anti-CD3ε en medio RPMI en la parte de bucle corto de la tarjeta de depósito. A continuación, la tarjeta de depósito se fija en la base del cartucho de análisis. Se añade un volumen de 30 µl de la muestra para ensayar a la cámara de reacción. La base del cartucho de análisis se inserta en el dispositivo de análisis y las células biosensoras cargadas se inyectan en la cámara de mezcla para iniciar la reacción. La señal resultante se registra durante 4 a 8 minutos y, al final del periodo de prueba, los 30 µl de anticuerpo anti-CD3ε se inyectan desde el bucle corto del depósito en la cámara de reacción como una reacción de control positivo que se registra durante 2 minutos. Como control positivo alternativo, se pueden usar 30 µl de digitonina 0,61 mM en lugar de anticuerpo anti-CD3ε. Se puede realizar una prueba de control negativo usando un patógeno predeterminado que no es específico para el anticuerpo que se usa.

Bioensayo ilustrativo 3: recubrimiento del analito con anticuerpos

En otra realización ilustrativa del bioensayo de la presente invención, en donde la molécula detectora es un anticuerpo soluble, el analito (p. ej., bacterias patógenas) se recubre con el anticuerpo soluble durante un periodo de tiempo antes de mezclar la muestra para analizar con el biosensor. En esta realización, las células biosensoras cargadas se centrifugan y concentran hasta aproximadamente 400 000 células/180 µl (adecuado para una reacción) en el medio de carga. Se carga una alícuota de 180 µl (aproximadamente 400 000 células) de las células biosensoras en la parte de bucle largo de la tarjeta de depósito. Para un control positivo, se cargan 30 µl de anticuerpo anti-CD3ε en medio RPMI en la parte de bucle corto de la tarjeta de depósito. A continuación, la tarjeta de depósito se fija en la base del cartucho. Se mezcla un volumen de 2 µl de un anticuerpo (a 0,5 mg/ml) contra el patógeno diana, tal como anti-*E. coli* O111 (en donde el patógeno diana es *E. coli* O111), con 28 µl de la muestra para analizar en un tubo Eppendorf. La muestra se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se añade a la cámara de mezcla del cartucho. El cartucho se inserta en el PMT y las células biosensoras se inyectan en la cámara de mezcla para iniciar la reacción. La señal resultante se registra durante 4 a 8 minutos y, al final del periodo de prueba, los 30 µl de anticuerpo anti-CD3ε se inyectan desde el bucle corto del depósito en la cámara de reacción como una reacción de control positivo que se registra durante 2 minutos. Como control positivo alternativo, se pueden usar 30 µl de digitonina 0,61 mM en lugar de anticuerpo anti-CD3ε. Se puede realizar una prueba de control negativo usando un patógeno predeterminado que no es específico para el anticuerpo que se usa.

Los bioensayos ilustrativos descritos en el presente documento pueden incluir otros aditivos que reducen el ruido de fondo y mejoran la señal. Usando anticuerpo anti-CD3ε como control positivo, se ha demostrado que el sistema detecta menos de 10 células biosensoras cargadas en una mezcla de 50 000 células biosensoras sin carga. Se ha demostrado que el propio biosensor detecta 230 UFC de bacterias en una muestra de 30 µl. En los bioensayos descritos anteriormente, se usó un anticuerpo monoclonal patentado (1F11) contra bacterias *E. coli* O111 para detectar bacterias *E. coli* O111 usándose *E. coli* O157 como control negativo. Se demostró que *E. coli* O157 daba resultados negativos, lo que demuestra la especificidad del sistema. También se pueden usar numerosos anticuerpos disponibles en el mercado con el bioensayo descrito. Con respecto al anticuerpo monoclonal patentado (1F11), se realizaron análisis de anticuerpos y selección del anticuerpo monoclonal como se describe a continuación.

La producción de anticuerpos se determinó mediante un ELISA realizado en placas multipocillo de 96 pocillos. Cada pocillo se recubrió con diferentes LPS (*E. coli* O157, *E. coli* O127, *E. coli* O111, *E. coli* O26, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterioa* y sueros sin exposición previa) o células bacterianas (*E. coli* O157, *E. coli* O111, *E. coli* 26 y *E. coli* DH5α). Se añadió a los pocillos sobrenadante de hibridoma de diferentes clones de mAb O157 o mAb O111. Para la detección se utilizó IgG de cabra antirratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (apéndice III.A.3). Los dos clones de hibridoma (1B10 y 6G1) de *E. coli* O157 reconocen exclusivamente LPS de *E. coli* O157 y *E. coli* O157. Los nueve clones de hibridoma de *E. coli* O111 reconocen específicamente LPS de *E. coli* O111 y *E. coli* O111. Se eligieron los clones de la lectura de mayor densidad óptica (DO) para la validación, que se realizó como se describe a continuación.

Los sedimentos celulares de hibridoma se recogieron y almacenaron a -80 °C antes de la extracción de ARN. El ARN extraído se usó como molde para la transcripción inversa a ADNc, seguido de amplificación por PCR anidada. Todos los productos de PCR positivos se clonaron en vectores de clonación TA y se enviaron para secuenciación. Las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada se determinaron después del análisis de secuencias. Cuatro anticuerpos monocatenarios (scFv) de O157 (1B10) (mAb personalizado producido por FSC) y ATCC HB 10452, así como dos anticuerpos monocatenarios de O111 producidos por FSC (1F11 y 1F2) se expresaron de forma recombinante y se purificaron mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC). La secuencia de scFv se construyó en el siguiente orden: señal de secreción pel B + aminoácido alanina + marcador de histidina + aminoácidos glicina-serina-serina-glicina + sitio de escisión del TEV + aminoácidos glicina-serina-serina-glicina + región variable de cadena pesada + región conectora serina-alanina-ácido aspártico-ácido aspártico-alanina-lisina-lisina-ácido aspártico-alanina-alanina-lisina-lisina-ácido aspártico-ácido aspártico-alanina-lisina-lisina-ácido aspártico-ácido aspártico + región variable de cadena ligera. Los scFv purificados se probaron usando placas de pocillos múltiples recubiertas con LPS de O157 u O111.

El fin de este estudio fue investigar las interacciones del anticuerpo monoclonal (mAb) con células bacterianas completas. (*E. coli* 0157 o *E. coli* O111) y estimar la constante cinética (KD) de la interacción anticuerpo-bacteria. En estos ensayos, se usaron anticuerpo policlonal de cabra anti-*E. coli* 0157, anticuerpo policlonal de cabra anti-*E. coli* O111, tres anticuerpos monoclonales (1022, 1024 y 1061) contra *E. coli* 0157 y un anticuerpo monoclonal contra *E. coli* O111. También se usaron un chip sensor CM5 y un equipo de acoplamiento de amina. Todos los ensayos se realizaron en un instrumento Biacore X100. En el protocolo, se inmovilizó un anticuerpo policlonal (contra una bacteria seleccionada) en un chip sensor CM5. A continuación, se unieron las bacterias seleccionadas seguido de la inyección de un anticuerpo monoclonal contra las mismas bacterias en un flujo de tampón continuo. La interacción se supervisó en tiempo real. La unión relativa del anticuerpo a cada bacteria se registró en unidades de resonancia (UR). Los resultados del análisis BIAcore de la unión de un anticuerpo específico de *E. coli* 0157 (mAb FF754) a *E. coli* 0157 y *E. coli* O111 indicó que el mAb 0157 era específico para su antígeno diana.

La presente invención se ha ilustrado mediante la descripción de realizaciones ilustrativas de la misma. A los expertos en la materia les resultarán evidentes ventajas y modificaciones adicionales.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundamental Solutions Corporation
Zupancic, Thomas J.
Zeng, Lingchun
Vedamoorthy, Srikanth
Lwande, Joel S.
Joseph, Kittle D.

<120> Sistemas para la detección rápida de analitos

<130> 35044-0006

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1929
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína quimérica: BBP-IgM

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1929)

<400> 1

ES 2 893 879 T3

atg gtg ctg cag acg caa gtg ttt atc tcc ctg ctg ctc tgg atc agc Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser 1 5 10 15	48
gga gcg tac ggc act tac aag ctg gtg atc aac ggt aaa acc ttg aag Gly Ala Tyr Gly Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys 20 25 30	96
ggt gag acc acc act gag gca gtc gac gcc gcc act gcc gag aag gtc Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val 35 40 45	144
ttt aaa cag tat gcc aat gat aac ggc gtg gac ggc gag tgg acc tac Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr 50 55 60	192
gat gac gcc act aag aca ttc act gtg act gaa aag ccc gag gtg att Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile 65 70 75 80	240
gac gcg tcc gaa ttg aca cct gcg gtg acc acc tac aaa ctg gtt atc Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile 85 90 95	288
aac ggc aag act ctg aag ggc gag acc acc aca gag gca gtc gat gcc Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala 100 105 110	336
gcc acc gcc gag aag gtc ttc aag caa tat gcc aac gac aac ggg gtg Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val 115 120 125	384

gac ggg gag tgg acc tac gat gat gcc acc aag acc ttc acc gtg acc Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr 130 135 140	432
gag aag ccc gaa gtg atc gat gcg agt gaa ctg act ccc gcc gtg aca Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr 145 150 155 160	480
ggt tct gct tct ggt tct ggt ggt tca gca tca gca cca act ttg ttt Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe 165 170 175	528
cca ctt gtc tca tgt gag aac tcg cca tcg gat acc tcg agc gta gcg Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala 180 185 190	576
gtc gga tgt ctc gct caa gac ttt ctt ccg gac agc atc acg ttt tca Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser 195 200 205	624
tgg aag tat aag aac aat tcg gat att tcg agc acg cga gga ttt ccc Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro 210 215 220	672
agc gta ttg aga ggg gga aag tac gcg gca aca agc cag gtg ctg ctc Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu 225 230 235 240	720
cca agc aag gat gtg atg cag ggc act gac gag cat gta gta tgc aag Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys 245 250 255	768
gta cag cac ccc aat gga aac aag gaa aag aat gtc cct ctg cct gta Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val 260 265 270	816
att gcc gag ctc cct cct aaa gtg tca gtg ttc gtg ccg ccc aga gat Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp 275 280 285	864
ggg ttc ttt gga aac ccg cga tcg aag tcg aaa ctg atc tgc cag gcc Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Ser Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala 290 295 300	912
acg gga ttc agc cct cgg cag att caa gtg tcg tgg ttg cgg gag gga Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly 305 310 315 320	960
aaa cag gtg gga tcg ggg gtg acc aca gac cag gtg cag gcg gag gct Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala 325 330 335	1008
aaa gaa agc ggt ccc acc aca tat aag gtc act tcc acc ctt act att Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile 340 345 350	1056
aag gaa tcg gat tgg ttg tca cag tcg atg ttc aca tgt aga gtc gat Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp 355 360 365	1104
cat cgc gga ctc acg ttt caa cag aac gcg tca tca atg tgt gta ccc His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro 370 375 380	1152

gat	caa	gat	acg	gcg	atc	aga	gta	ttc	gcc	att	ccg	cct	agc	ttc	gca	1200
Asp	Gln	Asp	Thr	Ala	Ile	Arg	Val	Phe	Ala	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	Ala	
385					390				395						400	
tcc	att	ttt	ctc	acc	aaa	agc	aca	aag	ctg	aca	tgt	ctt	gtg	aca	gac	1248
Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Asp	
			405					410						415		
ctc	aca	acg	tac	gat	tca	gtc	aca	att	tca	tgg	acc	agg	cag	aat	ggg	1296
Leu	Thr	Thr	Tyr	Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Trp	Thr	Arg	Gln	Asn	Gly	
			420					425					430			
gag	gcg	gta	aag	acg	cac	acc	aac	att	tcg	gaa	agc	cat	ccc	aac	gcc	1344
Glu	Ala	Val	Lys	Thr	His	Thr	Asn	Ile	Ser	Glu	Ser	His	Pro	Asn	Ala	
		435					440					445				
acg	ttt	tcg	gcg	gtc	ggg	gag	gca	tcg	att	tgt	gag	gac	gat	tgg	aat	1392
Thr	Phe	Ser	Ala	Val	Gly	Glu	Ala	Ser	Ile	Cys	Glu	Asp	Asp	Trp	Asn	
	450				455						460					
tca	ggg	gag	cgc	ttc	aca	tgc	acg	gtc	act	cac	acg	gat	ctc	cca	tcc	1440
Ser	Gly	Glu	Arg	Phe	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	His	Thr	Asp	Leu	Pro	Ser	
465					470					475					480	
ccg	ttg	aag	cag	aca	atc	tcg	cga	ccc	aaa	ggt	gtc	gca	ctg	cac	agg	1488
Pro	Leu	Lys	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Lys	Gly	Val	Ala	Leu	His	Arg	
			485					490						495		
ccc	gac	gtc	tac	ctc	ctg	cct	cct	gcc	agg	gaa	cag	ctc	aac	ctc	cgg	1536
Pro	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Pro	Ala	Arg	Glu	Gln	Leu	Asn	Leu	Arg	
			500					505					510			
gaa	tca	gca	acg	atc	acg	tgt	ctt	gta	acc	ggg	ttt	tca	ccg	gct	gac	1584
Glu	Ser	Ala	Thr	Ile	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Gly	Phe	Ser	Pro	Ala	Asp	
		515					520					525				
gtc	ttt	gtc	caa	tgg	atg	cag	cgg	gga	caa	ccc	ttg	tca	cca	gag	aag	1632
Val	Phe	Val	Gln	Trp	Met	Gln	Arg	Gly	Gln	Pro	Leu	Ser	Pro	Glu	Lys	
	530					535					540					
tat	gtg	aca	tca	gcg	ccc	atg	ccc	gag	cca	cag	gct	ccg	ggt	agg	tat	1680
Tyr	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Met	Pro	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Gly	Arg	Tyr	
545					550					555					560	
ttt	gcc	cat	tcc	atc	ctc	act	gtg	tcc	gag	gaa	gag	tgg	aac	acc	ggc	1728
Phe	Ala	His	Ser	Ile	Leu	Thr	Val	Ser	Glu	Glu	Glu	Trp	Asn	Thr	Gly	
			565					570						575		
gaa	acg	tac	acg	tgc	gtc	gta	gca	cac	gaa	gcg	ttg	ccc	aat	aga	gtg	1776
Glu	Thr	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Ala	His	Glu	Ala	Leu	Pro	Asn	Arg	Val	
			580					585					590			
act	gag	aga	act	gta	gat	aag	tcc	act	gag	ggc	gaa	gta	agc	gcg	gat	1824
Thr	Glu	Arg	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Glu	Gly	Glu	Val	Ser	Ala	Asp	
		595					600					605				
gaa	gaa	ggt	ttc	gaa	aac	ttg	tgg	gct	aca	gcg	agc	acg	ttt	atc	gtg	1872
Glu	Glu	Gly	Phe	Glu	Asn	Leu	Trp	Ala	Thr	Ala	Ser	Thr	Phe	Ile	Val	
	610					615					620					
ttg	ttc	ttg	ctt	tca	ctc	ttc	tac	tcc	aca	act	gta	acc	ctg	ttc	aag	1920
Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Leu	Phe	Tyr	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Leu	Phe	Lys	

ES 2 893 879 T3

	625	630	635	640	
	gtc aag tag				1929
	Val Lys				
5	<210> 2				
	<211> 642				
	<212> PRT				
	<213> Secuencia artificial				
10	<220>				
	<223> Construcción sintética				
	<400> 2				

ES 2 893 879 T3

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

Val	Gly	Cys	Leu	Ala	Gln	Asp	Phe	Leu	Pro	Asp	Ser	Ile	Thr	Phe	Ser	195	200	205	
Trp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Arg	Gly	Phe	Pro	210	215	220	
Ser	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Lys	Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser	Gln	Val	Leu	Leu	225	230	235	240
Pro	Ser	Lys	Asp	Val	Met	Gln	Gly	Thr	Asp	Glu	His	Val	Val	Cys	Lys	245	250	255	
Val	Gln	His	Pro	Asn	Gly	Asn	Lys	Glu	Lys	Asn	Val	Pro	Leu	Pro	Val	260	265	270	
Ile	Ala	Glu	Leu	Pro	Pro	Lys	Val	Ser	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Arg	Asp	275	280	285	
Gly	Phe	Phe	Gly	Asn	Pro	Arg	Ser	Lys	Ser	Lys	Leu	Ile	Cys	Gln	Ala	290	295	300	
Thr	Gly	Phe	Ser	Pro	Arg	Gln	Ile	Gln	Val	Ser	Trp	Leu	Arg	Glu	Gly	305	310	315	320
Lys	Gln	Val	Gly	Ser	Gly	Val	Thr	Thr	Asp	Gln	Val	Gln	Ala	Glu	Ala	325	330	335	
Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	Tyr	Lys	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	340	345	350	
Lys	Glu	Ser	Asp	Trp	Leu	Ser	Gln	Ser	Met	Phe	Thr	Cys	Arg	Val	Asp	355	360	365	
His	Arg	Gly	Leu	Thr	Phe	Gln	Gln	Asn	Ala	Ser	Ser	Met	Cys	Val	Pro	370	375	380	
Asp	Gln	Asp	Thr	Ala	Ile	Arg	Val	Phe	Ala	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	Ala	385	390	395	400
Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Asp	405	410	415	
Leu	Thr	Thr	Tyr	Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Trp	Thr	Arg	Gln	Asn	Gly	420	425	430	
Glu	Ala	Val	Lys	Thr	His	Thr	Asn	Ile	Ser	Glu	Ser	His	Pro	Asn	Ala				

435	440	445
Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn		
450	455	460
Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser		
465	470	475
Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg		
485	490	495
Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg		
500	505	510
Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp		
515	520	525
Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys		
530	535	540
Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr		
545	550	555
Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly		
565	570	575
Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val		
580	585	590
Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Glu Gly Glu Val Ser Ala Asp		
595	600	605
Glu Glu Gly Phe Glu Asn Leu Trp Ala Thr Ala Ser Thr Phe Ile Val		
610	615	620
Leu Phe Leu Leu Ser Leu Phe Tyr Ser Thr Thr Val Thr Leu Phe Lys		
625	630	635
640		

Val Lys

<210> 3
 <211> 1884
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Proteína quimérica: BBP-IgAB

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1884)

5 <400> 3

atg ccg ggt gga ccc gga gtg ctc cag gca ttg cct gca acc atc ttc Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe 1 5 10 15	48
ctg ctg ttc ttg ttg tcc gcc gtc tac ctt gga cct ggt tgc cag gca Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala 20 25 30	96
act tac aag ctg gtg atc aac ggt aaa acc ttg aag ggt gag acc acc Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr 35 40 45	144
act gag gca gtc gac gcc gcc act gcc gag aag gtc ttt aaa cag tat Thr Glu Ala Val Asp Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr 50 55 60	192
gcc aat gat aac ggc gtg gac ggc gag tgg acc tac gat gac gcc act Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr 65 70 75 80	240
aag aca ttc act gtg act gaa aag ccc gag gtg att gac gcg tcc gaa Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu 85 90 95	288
ttg aca cct gcg gtg acc acc tac aaa ctg gtt atc aac ggc aag act Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr 100 105 110	336
ctg aag ggc gag acc acc aca gag gca gtc gat gcc gcc acc gcc gag Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu 115 120 125	384
aag gtc ttc aag caa tat gcc aac gac aac ggg gtg gac ggg gag tgg Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp 130 135 140	432
acc tac gat gat gcc acc aag acc ttc acc gtg acc gag aag ccc gaa Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu 145 150 155 160	480
gtg atc gat gcg agt gaa ctg act ccc gcc gtg aca ggt tct gct tcg Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Gly Ser Ala Ser 165 170 175	528
ggc tca gga ctg tgg atg cat aag gtg cct gca tcg ctc atg gtg agc Gly Ser Gly Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser 180 185 190	576
ctg ggc gaa gat gca cat ttt cag tgt ccc cat aac agc tcc aac aac Leu Gly Glu Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn 195 200 205	624
gcg aac gtg acc tgg tgg cgg gtg ctc cat ggc aat tac acc tgg ccg Ala Asn Val Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro 210 215 220	672
cct gaa ttt ctc gga ccg gga gag gac ccg aat ggg acc ctt atc atc	720

ES 2 893 879 T3

Pro 225	Glu	Phe	Leu	Gly	Pro 230	Gly	Glu	Asp	Pro	Asn 235	Gly	Thr	Leu	Ile	Ile 240	
cag Gln	aac Asn	gtg Val	aat Asn	aag Lys	tcc Ser	cac His	gga Gly	gga Gly	atc Ile	tac Tyr	gtc Val	tgc Cys	cgc Arg	gtg Val	caa Gln	768
gag Glu	gga Gly	aat Asn	gag Glu	agc Ser	tac Tyr	caa Gln	cag Gln	tca Ser	tgc Cys	gga Gly	acg Thr	tac Tyr	ctc Leu	cgc Arg	gtc Val	816
cgg Arg	cag Gln	cca Pro	cca Pro	ccg Pro	agg Arg	ccg Pro	ttc Phe	ctc Leu	gat Asp	atg Met	gga Gly	gag Glu	gga Gly	act Thr	aag Lys	864
aac Asn	cgg Arg	atc Ile	att Ile	acc Thr	gcc Ala	gaa Glu	ggc Gly	atc Ile	atc Ile	ctc Leu	ctc Leu	ttc Phe	tgc Cys	gcc Ala	gtc Val	912
gtg Val	ccg Pro	ggg Gly	act Thr	ctg Leu	ctt Leu	ctg Leu	ttc Phe	cgg Arg	aaa Lys	agg Arg	tgg Trp	caa Gln	aac Asn	gaa Glu	aag Lys	960
ctg Leu	ggt Gly	ctg Leu	gac Asp	gct Ala	ggg Gly	gac Asp	gaa Glu	tac Tyr	gag Glu	gat Asp	gaa Glu	aac Asn	ttg Leu	tac Tyr	gag Glu	1008
ggc Gly	ctg Leu	aat Asn	ctg Leu	gac Asp	gat Asp	tgc Cys	tcg Ser	atg Met	tat Tyr	gag Glu	gac Asp	att Ile	agc Ser	aga Arg	gga Gly	1056
ctg Leu	cag Gln	ggt Gly	acc Thr	tac Tyr	caa Gln	gac Asp	gtg Val	gga Gly	agc Ser	ctg Leu	aac Asn	atc Ile	ggg Gly	gat Asp	gtg Val	1104
cag Gln	ctc Leu	gag Glu	aaa Lys	cca Pro	agg Arg	aaa Lys	aga Arg	aga Arg	gct Ala	agc Ser	gaa Glu	gga Gly	cgc Arg	gga Gly	tca Ser	1152
ctg Leu	ctt Leu	act Thr	tgc Cys	ggc Gly	gat Asp	gtc Val	gaa Glu	gaa Glu	aat Asn	ccc Pro	gga Gly	cca Pro	atg Met	gcc Ala	aga Arg	1200
ttg Leu	gcg Ala	ctg Leu	tcg Ser	ccg Pro	gtc Val	cct Pro	tcg Ser	cac His	tgg Trp	atg Met	gtg Val	gcc Ala	ctg Leu	ctg Leu	ctc Leu	1248
ttg Leu	ctt Leu	tcg Ser	gcg Ala	gct Ala	gag Glu	ccg Pro	gtg Val	cca Pro	gcg Ala	gct Ala	aga Arg	tcg Ser	gag Glu	gac Asp	cgc Arg	1296
tac Tyr	aga Arg	aat Asn	ccg Pro	aag Lys	ggt Gly	tcc Ser	gct Ala	tgc Cys	tca Ser	cgc Arg	atc Ile	tgg Trp	caa Gln	tca Ser	cca Pro	1344
cgc Arg	ttc Phe	atc Ile	gcg Ala	cgc Arg	aaa Lys	cgc Arg	ggc Gly	ttc Phe	act Thr	gtc Val	aag Lys	atg Met	cac His	tgc Cys	tat Tyr	1392
atg Met	aac Asn	tcg Ser	gcc Ala	agc Ser	ggg Gly	aat Asn	gtg Val	tcg Ser	tgg Trp	ctg Leu	tgg Trp	aag Lys	cag Gln	gaa Glu	atg Met	1440

gac gag aat ccg cag caa ctg aaa ctg gag aag ggc cgg atg gaa gaa 1488
 Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu Lys Gly Arg Met Glu Glu
 485 490 495

tcc cag aat gag tcg ctg gcc acc ctt act atc caa ggt atc cgg ttt 1536
 Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr Ile Gln Gly Ile Arg Phe
 500 505 510

gaa gat aac ggg atc tac ttc tgt caa cag aag tgt aac aac act tca 1584
 Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Lys Cys Asn Asn Thr Ser
 515 520 525

gag gtg tac cag gga tgc ggc acc gaa ctc cgc gtc atg gga ttc tcc 1632
 Glu Val Tyr Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly Phe Ser
 530 535 540

acc ctc gcc caa ctg aag cag cgc aac acg ctg aag gac ggc atc att 1680
 Thr Leu Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile
 545 550 555 560

atg atc cag acc ctg ctg atc atc ctg ttc atc att gtg ccg atc ttt 1728
 Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe
 565 570 575

ctg ctc ttg gat aag gac gac tcg aaa gcc gga atg gaa gag gac cac 1776
 Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His
 580 585 590

acg tac gaa ggt ctg gac atc gac caa act gcg act tac gag gac att 1824
 Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile
 595 600 605

gtg acc ctc cgg act ggc gaa gtc aag tgg tcc gtg ggt gaa cac cct 1872
 Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His Pro
 610 615 620

gga cag gaa tag 1884
 Gly Gln Glu
 625

<210> 4
 <211> 627
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 4

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

Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala
 20 25 30

Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr
 35 40 45

ES 2 893 879 T3

Thr	Glu	Ala	Val	Asp	Ala	Ala	Thr	Ala	Glu	Lys	Val	Phe	Lys	Gln	Tyr	50	55	60	
Ala	Asn	Asp	Asn	Gly	Val	Asp	Gly	Glu	Trp	Thr	Tyr	Asp	Asp	Ala	Thr	65	70	75	80
Lys	Thr	Phe	Thr	Val	Thr	Glu	Lys	Pro	Glu	Val	Ile	Asp	Ala	Ser	Glu	85	90	95	
Leu	Thr	Pro	Ala	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Leu	Val	Ile	Asn	Gly	Lys	Thr	100	105	110	
Leu	Lys	Gly	Glu	Thr	Thr	Thr	Glu	Ala	Val	Asp	Ala	Ala	Thr	Ala	Glu	115	120	125	
Lys	Val	Phe	Lys	Gln	Tyr	Ala	Asn	Asp	Asn	Gly	Val	Asp	Gly	Glu	Trp	130	135	140	
Thr	Tyr	Asp	Asp	Ala	Thr	Lys	Thr	Phe	Thr	Val	Thr	Glu	Lys	Pro	Glu	145	150	155	160
Val	Ile	Asp	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Pro	Ala	Val	Thr	Gly	Ser	Ala	Ser	165	170	175	
Gly	Ser	Gly	Leu	Trp	Met	His	Lys	Val	Pro	Ala	Ser	Leu	Met	Val	Ser	180	185	190	
Leu	Gly	Glu	Asp	Ala	His	Phe	Gln	Cys	Pro	His	Asn	Ser	Ser	Asn	Asn	195	200	205	
Ala	Asn	Val	Thr	Trp	Trp	Arg	Val	Leu	His	Gly	Asn	Tyr	Thr	Trp	Pro	210	215	220	
Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Pro	Asn	Gly	Thr	Leu	Ile	Ile	225	230	235	240
Gln	Asn	Val	Asn	Lys	Ser	His	Gly	Gly	Ile	Tyr	Val	Cys	Arg	Val	Gln	245	250	255	
Glu	Gly	Asn	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Ser	Cys	Gly	Thr	Tyr	Leu	Arg	Val	260	265	270	
Arg	Gln	Pro	Pro	Pro	Arg	Pro	Phe	Leu	Asp	Met	Gly	Glu	Gly	Thr	Lys	275	280	285	
Asn	Arg	Ile	Ile	Thr	Ala	Glu	Gly	Ile	Ile	Leu	Leu	Phe	Cys	Ala	Val	290	295	300	

ES 2 893 879 T3

Val	Pro	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Phe	Arg	Lys	Arg	Trp	Gln	Asn	Glu	Lys	305	310	315	320
Leu	Gly	Leu	Asp	Ala	Gly	Asp	Glu	Tyr	Glu	Asp	Glu	Asn	Leu	Tyr	Glu	325	330	335	
Gly	Leu	Asn	Leu	Asp	Asp	Cys	Ser	Met	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Arg	Gly	340	345	350	
Leu	Gln	Gly	Thr	Tyr	Gln	Asp	Val	Gly	Ser	Leu	Asn	Ile	Gly	Asp	Val	355	360	365	
Gln	Leu	Glu	Lys	Pro	Arg	Lys	Arg	Arg	Ala	Ser	Glu	Gly	Arg	Gly	Ser	370	375	380	
Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Ala	Arg	385	390	395	400
Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Val	Pro	Ser	His	Trp	Met	Val	Ala	Leu	Leu	Leu	405	410	415	
Leu	Leu	Ser	Ala	Ala	Glu	Pro	Val	Pro	Ala	Ala	Arg	Ser	Glu	Asp	Arg	420	425	430	
Tyr	Arg	Asn	Pro	Lys	Gly	Ser	Ala	Cys	Ser	Arg	Ile	Trp	Gln	Ser	Pro	435	440	445	
Arg	Phe	Ile	Ala	Arg	Lys	Arg	Gly	Phe	Thr	Val	Lys	Met	His	Cys	Tyr	450	455	460	
Met	Asn	Ser	Ala	Ser	Gly	Asn	Val	Ser	Trp	Leu	Trp	Lys	Gln	Glu	Met	465	470	475	480
Asp	Glu	Asn	Pro	Gln	Gln	Leu	Lys	Leu	Glu	Lys	Gly	Arg	Met	Glu	Glu	485	490	495	
Ser	Gln	Asn	Glu	Ser	Leu	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Gly	Ile	Arg	Phe	500	505	510	
Glu	Asp	Asn	Gly	Ile	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Lys	Cys	Asn	Asn	Thr	Ser	515	520	525	
Glu	Val	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gly	Thr	Glu	Leu	Arg	Val	Met	Gly	Phe	Ser	530	535	540	
Thr	Leu	Ala	Gln	Leu	Lys	Gln	Arg	Asn	Thr	Leu	Lys	Asp	Gly	Ile	Ile	545	550	555	560

Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe
565 570 575

Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His
580 585 590

Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile
595 600 605

Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His Pro
610 615 620

Gly Gln Glu
625

<210> 5
<211> 936
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína quimérica: BBP-CD3Z

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(936)

<400> 5

atg aag tgg aag gcg ctt ttc acc gcg gcc atc ctg cag gca cag ttg	48
Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu	
1 5 10 15	
ccg att aca gag gca act tac aag ctg gtg atc aac ggt aaa acc ttg	96
Pro Ile Thr Glu Ala Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu	
20 25 30	
aag ggt gag acc acc act gag gca gtc gac gcc gcc act gcc gag aag	144
Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys	
35 40 45	
gtc ttt aaa cag tat gcc aat gat aac ggc gtg gac ggc gag tgg acc	192
Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr	
50 55 60	
tac gat gac gcc act aag aca ttc act gtg act gaa aag ccc gag gtg	240
Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val	
65 70 75 80	
att gac gcg tcc gaa ttg aca cct gcg gtg acc acc tac aaa ctg gtt	288
Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val	
85 90 95	
atc aac ggc aag act ctg aag ggc gag acc acc aca gag gca gtc gat	336
Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp	
100 105 110	

gcc gcc acc gcc gag aag gtc ttc aag caa tat gcc aac gac aac ggg Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly 115 120 125	384
gtg gac ggg gag tgg acc tac gat gat gcc acc aag acc ttc acc gtg Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val 130 135 140	432
acc gag aag ccc gaa gtg atc gat gcg agt gaa ctg act ccc gcc gtg Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val 145 150 155 160	480
aca ggt tct gct tct ggt tct ggt cag agc ttt ggc ctg ctg gat ccc Thr Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro 165 170 175	528
aaa ctc tgc tac ctg ctg gat gga atc ctc ttc atc tat ggt gtc att Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile 180 185 190	576
ctc act gcc ttg ttc ctg aga gtg aag ttc agc agg agc gca gac gcc Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala 195 200 205	624
ccc gcg tac cag cag ggc cag aac cag ctc tat aac gag ctc aat cta Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu 210 215 220	672
gga cga aga gag gag tac gat gtt ttg gac aag aga cgt ggc cgg gac Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp 225 230 235 240	720
cct gag atg ggg gga aag ccg cag aga agg aag aac cct cag gaa ggc Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly 245 250 255	768
ctg tac aat gaa ctg cag aaa gat aag atg gcg gag gcc tac agt gag Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu 260 265 270	816
att ggg atg aaa ggc gag cgc cgg agg ggc aag ggg cac gat ggc ctt Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu 275 280 285	864
tac cag ggt ctc agt aca gcc acc aag gac acc tac gac gcc ctt cac Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His 290 295 300	912
atg cag gcc ctg ccc cct cgc taa Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg 305 310	936

<210> 6
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 6

ES 2 893 879 T3

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

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
260 265 270

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
275 280 285

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
290 295 300

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
305 310

<210> 7

<211> 2340

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica: FcγRI-IgM

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2340)

<400> 7

atg att ctt acc agc ttt gga gat gac atg tgg ctt cta aca act ctg	48
Met Ile Leu Thr Ser Phe Gly Asp Asp Met Trp Leu Leu Thr Thr Leu	
1 5 10 15	
cta ctt tgg gtt cca gtc ggt ggg gaa gtg gtt aat gcc acc aag gct	96
Leu Leu Trp Val Pro Val Gly Gly Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala	
20 25 30	
gtg atc acc ttg cag cct cca tgg gtc agt att ttc cag aag gaa aat	144
Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn	
35 40 45	
gtc act tta tgg tgt gag ggg cct cac ctg cct gga gac agt tcc aca	192
Val Thr Leu Trp Cys Glu Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr	
50 55 60	
caa tgg ttt atc aac gga aca gcc gtt cag atc tcc acg cct agt tat	240
Gln Trp Phe Ile Asn Gly Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr	
65 70 75 80	
agc atc cca gag gcc agt ttt cag gac agt ggc gaa tac agg tgt cag	288
Ser Ile Pro Glu Ala Ser Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln	
85 90 95	
ata ggt tcc tca atg cca agt gac cct gtg cag ttg caa atc cac aat	336
Ile Gly Ser Ser Met Pro Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn	
100 105 110	
gat tgg ctg cta ctc cag gcc tcc cgc aga gtc ctc aca gaa gga gaa	384
Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu	
115 120 125	

ES 2 893 879 T3

ccc	ctg	gcc	ttg	agg	tgt	cac	gga	tgg	aag	aat	aaa	ctg	gtg	tac	aat	432
Pro	Leu	Ala	Leu	Arg	Cys	His	Gly	Trp	Lys	Asn	Lys	Leu	Val	Tyr	Asn	
	130					135					140					
gtg	gtt	ttc	tat	aga	aat	gga	aaa	tcc	ttt	cag	ttt	tct	tca	gat	tcg	480
Val	Val	Phe	Tyr	Arg	Asn	Gly	Lys	Ser	Phe	Gln	Phe	Ser	Ser	Asp	Ser	
	145				150					155					160	
gag	gtc	gcc	att	ctg	aaa	acc	aac	ctg	agt	cac	agc	ggc	atc	tac	cac	528
Glu	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Thr	Asn	Leu	Ser	His	Ser	Gly	Ile	Tyr	His	
				165					170					175		
tgc	tca	ggc	acg	gga	aga	cac	cgc	tac	aca	tct	gca	gga	gtg	tcc	atc	576
Cys	Ser	Gly	Thr	Gly	Arg	His	Arg	Tyr	Thr	Ser	Ala	Gly	Val	Ser	Ile	
			180					185					190			
acg	gtg	aaa	gag	ctg	ttt	acc	acg	cca	gtg	ctg	aga	gca	tcc	gtg	tca	624
Thr	Val	Lys	Glu	Leu	Phe	Thr	Thr	Pro	Val	Leu	Arg	Ala	Ser	Val	Ser	
		195					200					205				
tct	ccc	ttc	ccg	gag	ggg	agt	ctg	gtc	acc	ctg	aac	tgt	gag	acg	aat	672
Ser	Pro	Phe	Pro	Glu	Gly	Ser	Leu	Val	Thr	Leu	Asn	Cys	Glu	Thr	Asn	
	210					215					220					
ttg	ctc	ctg	cag	aga	ccc	ggc	tta	cag	ctt	cac	ttc	tcc	ttc	tac	gtg	720
Leu	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Leu	Gln	Leu	His	Phe	Ser	Phe	Tyr	Val	
	225				230					235					240	
ggc	agc	aag	atc	ctg	gag	tac	agg	aac	aca	tcc	tca	gag	tac	cat	ata	768
Gly	Ser	Lys	Ile	Leu	Glu	Tyr	Arg	Asn	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	His	Ile	
				245					250					255		
gca	agg	gcg	gaa	aga	gaa	gat	gct	gga	ttc	tac	tgg	tgt	gag	gta	gcc	816
Ala	Arg	Ala	Glu	Arg	Glu	Asp	Ala	Gly	Phe	Tyr	Trp	Cys	Glu	Val	Ala	
			260					265					270			
acg	gag	gac	agc	agt	gtc	ctt	aag	cgc	agc	cct	gag	ttg	gag	ctc	caa	864
Thr	Glu	Asp	Ser	Ser	Val	Leu	Lys	Arg	Ser	Pro	Glu	Leu	Glu	Leu	Gln	
		275					280					285				
gtg	ctt	ggt	ccc	cag	tca	tca	gct	cct	ggt	tct	gct	tct	ggt	tct	ggt	912
Val	Leu	Gly	Pro	Gln	Ser	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	
	290					295					300					
ggt	tca	gca	tca	gca	cca	act	ttg	ttt	cca	ctt	gtc	tca	tgt	gag	aac	960
Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Thr	Leu	Phe	Pro	Leu	Val	Ser	Cys	Glu	Asn	
	305				310					315					320	
tcg	cca	tcg	gat	acc	tcg	agc	gta	gcg	gtc	gga	tgt	ctc	gct	caa	gac	1008
Ser	Pro	Ser	Asp	Thr	Ser	Ser	Val	Ala	Val	Gly	Cys	Leu	Ala	Gln	Asp	
				325					330					335		
ttt	ctt	ccg	gac	agc	atc	acg	ttt	tca	tgg	aag	tat	aag	aac	aat	tcg	1056
Phe	Leu	Pro	Asp	Ser	Ile	Thr	Phe	Ser	Trp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Ser	
			340					345					350			
gat	att	tcg	agc	acg	cga	gga	ttt	ccc	agc	gta	ttg	aga	ggg	gga	aag	1104
Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Arg	Gly	Phe	Pro	Ser	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Lys	
		355					360					365				
tac	gcg	gca	aca	agc	cag	gtg	ctg	ctc	cca	agc	aag	gat	gtg	atg	cag	1152
Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser	Gln	Val	Leu	Leu	Pro	Ser	Lys	Asp	Val	Met	Gln	

ES 2 893 879 T3

370					375					380										
ggc Gly 385	act Thr	gac Asp	gag Glu	cat His	gta Val 390	gta Val	tgc Cys	aag Lys	gta Val	cag Gln 395	cac His	ccc Pro	aat Asn	gga Gly	aac Asn 400	1200				
aag Lys	gaa Glu	aag Lys	aat Asn	gtc Val 405	cct Pro	ctg Leu	cct Pro	gta Val	att Ile 410	gcc Ala	gag Glu	ctc Leu	cct Pro	cct Pro	aaa Lys 415	1248				
gtg Val	tca Ser	gtg Val	ttc Phe 420	gtg Val	ccg Pro	ccc Pro	aga Arg	gat Asp 425	ggg Gly	ttc Phe	ttt Phe	gga Gly	aac Asn 430	ccg Pro	cga Arg	1296				
tcg Ser	aag Lys	tcg Ser 435	aaa Lys	ctg Leu	atc Ile	tgc Cys	cag Gln 440	gcc Ala	acg Thr	gga Gly	ttc Phe	agc Ser 445	cct Pro	cgg Arg	cag Gln	1344				
att Ile	caa Gln 450	gtg Val	tcg Ser	tgg Trp	ttg Leu 455	cgg Arg	gag Glu	gga Gly	aaa Lys	cag Gln 460	gtg Val	gga Gly	tcg Ser	ggg Gly	gtg Val	1392				
acc Thr 465	aca Thr	gac Asp	cag Gln	gtg Val 470	cag Gln	gcg Ala	gag Glu	gct Ala	aaa Lys	gaa Glu 475	agc Ser	ggt Gly	ccc Pro	acc Thr	aca Thr 480	1440				
tat Tyr	aag Lys	gtc Val	act Thr	tcc Ser 485	acc Thr	ctt Leu	act Thr	att Ile	aag Lys 490	gaa Glu	tcg Ser	gat Asp	tgg Trp	ttg Leu	tca Ser 495	1488				
cag Gln	tcg Ser	atg Met 500	ttc Phe	aca Thr	tgt Cys	aga Arg	gtc Val	gat Asp 505	cat His	cgc Arg	gga Gly	ctc Leu	acg Thr 510	ttt Phe	caa Gln	1536				
cag Gln	aac Asn 515	gcg Ala	tca Ser	tca Ser	atg Met	tgt Cys	gta Val 520	ccc Pro	gat Asp	caa Gln	gat Asp	acg Thr 525	gcg Ala	atc Ile	aga Arg	1584				
gta Val 530	ttc Phe	gcc Ala	att Ile	ccg Pro	cct Pro	agc Ser 535	ttc Phe	gca Ala	tcc Ser	att Ile	ttt Phe	ctc Leu	acc Thr	aaa Lys	agc Ser	1632				
aca Thr 545	aag Lys	ctg Leu	aca Thr	tgt Cys 550	ctt Leu	gtg Val	aca Thr	gac Asp	ctc Leu	aca Thr 555	acg Thr	tac Tyr	gat Asp	tca Ser	gtc Val 560	1680				
aca Thr	att Ile	tca Ser	tgg Trp	acc Thr 565	agg Arg	cag Gln	aat Asn	ggg Gly	gag Glu	gcg Ala	gta Val	aag Lys	acg Thr	cac His	acc Thr 575	1728				
aac Asn	att Ile	tcg Ser 580	gaa Glu	agc Ser	cat His	ccc Pro	aac Asn	gcc Ala 585	acg Thr	ttt Phe	tcg Ser	gcg Ala	gtc Val 590	ggg Gly	gag Glu	1776				
gca Ala	tcg Ser	att Ile 595	tgt Cys	gag Glu	gac Asp	gat Asp	tgg Trp 600	aat Asn	tca Ser	ggg Gly	gag Glu	cgc Arg	ttc Phe	aca Thr	tgc Cys	1824				
acg Thr	gtc Val 610	act Thr	cac His	acg Thr	gat Asp	ctc Leu 615	cca Pro	tcc Ser	ccg Pro	ttg Leu	aag Lys 620	cag Gln	aca Thr	atc Ile	tcg Ser	1872				
cga	ccc	aaa	ggt	gtc	gca	ctg	cac	agg	ccc	gac	gtc	tac	ctc	ctg	cct	1920				

Arg	Pro	Lys	Gly	Val	Ala	Leu	His	Arg	Pro	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro		
625					630					635					640		
cct	gcc	agg	gaa	cag	ctc	aac	ctc	cgg	gaa	tca	gca	acg	atc	acg	tgt		1968
Pro	Ala	Arg	Glu	Gln	Leu	Asn	Leu	Arg	Glu	Ser	Ala	Thr	Ile	Thr	Cys		
				645					650					655			
ctt	gta	acc	ggg	ttt	tca	ccg	gct	gac	gtc	ttt	gtc	caa	tgg	atg	cag		2016
Leu	Val	Thr	Gly	Phe	Ser	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Val	Gln	Trp	Met	Gln		
			660					665					670				
cgg	gga	caa	ccc	ttg	tca	cca	gag	aag	tat	gtg	aca	tca	gcg	ccc	atg		2064
Arg	Gly	Gln	Pro	Leu	Ser	Pro	Glu	Lys	Tyr	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Met		
		675					680					685					
ccc	gag	cca	cag	gct	ccg	ggg	agg	tat	ttt	gcc	cat	tcc	atc	ctc	act		2112
Pro	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Gly	Arg	Tyr	Phe	Ala	His	Ser	Ile	Leu	Thr		
	690					695					700						
gtg	tcc	gag	gaa	gag	tgg	aac	acc	ggc	gaa	acg	tac	acg	tgc	gtc	gta		2160
Val	Ser	Glu	Glu	Glu	Trp	Asn	Thr	Gly	Glu	Thr	Tyr	Thr	Cys	Val	Val		
	705				710				715					720			
gca	cac	gaa	gcg	ttg	ccc	aat	aga	gtg	act	gag	aga	act	gta	gat	aag		2208
Ala	His	Glu	Ala	Leu	Pro	Asn	Arg	Val	Thr	Glu	Arg	Thr	Val	Asp	Lys		
				725				730						735			
tcc	act	gag	ggc	gaa	gta	agc	gcg	gat	gaa	gaa	ggg	ttc	gaa	aac	ttg		2256
Ser	Thr	Glu	Gly	Glu	Val	Ser	Ala	Asp	Glu	Glu	Gly	Phe	Glu	Asn	Leu		
			740					745					750				
tgg	gct	aca	gcg	agc	acg	ttt	atc	gtg	ttg	ttc	ttg	ctt	tca	ctc	ttc		2304
Trp	Ala	Thr	Ala	Ser	Thr	Phe	Ile	Val	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Leu	Phe		
		755				760						765					
tac	tcc	aca	act	gta	acc	ctg	ttc	aag	gtc	aag	tag						2340
Tyr	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Leu	Phe	Lys	Val	Lys							
	770					775											

<210> 8
 <211> 779
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 8

Met	Ile	Leu	Thr	Ser	Phe	Gly	Asp	Asp	Met	Trp	Leu	Leu	Thr	Thr	Leu		
1				5					10					15			
Leu	Leu	Trp	Val	Pro	Val	Gly	Gly	Glu	Val	Val	Asn	Ala	Thr	Lys	Ala		
			20					25					30				
Val	Ile	Thr	Leu	Gln	Pro	Pro	Trp	Val	Ser	Ile	Phe	Gln	Lys	Glu	Asn		
			35				40					45					
Val	Thr	Leu	Trp	Cys	Glu	Gly	Pro	His	Leu	Pro	Gly	Asp	Ser	Ser	Thr		

ES 2 893 879 T3

50						55										60
Gln	Trp	Phe	Ile	Asn	Gly	Thr	Ala	Val	Gln	Ile	Ser	Thr	Pro	Ser	Tyr	
65					70					75					80	
Ser	Ile	Pro	Glu	Ala	Ser	Phe	Gln	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	
				85					90					95		
Ile	Gly	Ser	Ser	Met	Pro	Ser	Asp	Pro	Val	Gln	Leu	Gln	Ile	His	Asn	
			100					105					110			
Asp	Trp	Leu	Leu	Leu	Gln	Ala	Ser	Arg	Arg	Val	Leu	Thr	Glu	Gly	Glu	
		115						120				125				
Pro	Leu	Ala	Leu	Arg	Cys	His	Gly	Trp	Lys	Asn	Lys	Leu	Val	Tyr	Asn	
	130					135					140					
Val	Val	Phe	Tyr	Arg	Asn	Gly	Lys	Ser	Phe	Gln	Phe	Ser	Ser	Asp	Ser	
145					150					155					160	
Glu	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Thr	Asn	Leu	Ser	His	Ser	Gly	Ile	Tyr	His	
				165					170					175		
Cys	Ser	Gly	Thr	Gly	Arg	His	Arg	Tyr	Thr	Ser	Ala	Gly	Val	Ser	Ile	
			180					185					190			
Thr	Val	Lys	Glu	Leu	Phe	Thr	Thr	Pro	Val	Leu	Arg	Ala	Ser	Val	Ser	
		195					200					205				
Ser	Pro	Phe	Pro	Glu	Gly	Ser	Leu	Val	Thr	Leu	Asn	Cys	Glu	Thr	Asn	
	210					215					220					
Leu	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Leu	Gln	Leu	His	Phe	Ser	Phe	Tyr	Val	
225					230					235					240	
Gly	Ser	Lys	Ile	Leu	Glu	Tyr	Arg	Asn	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	His	Ile	
				245					250					255		
Ala	Arg	Ala	Glu	Arg	Glu	Asp	Ala	Gly	Phe	Tyr	Trp	Cys	Glu	Val	Ala	
			260					265					270			
Thr	Glu	Asp	Ser	Ser	Val	Leu	Lys	Arg	Ser	Pro	Glu	Leu	Glu	Leu	Gln	
		275					280					285				
Val	Leu	Gly	Pro	Gln	Ser	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	
	290					295					300					

ES 2 893 879 T3

Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Thr	Leu	Phe	Pro	Leu	Val	Ser	Cys	Glu	Asn	305	310	315	320
Ser	Pro	Ser	Asp	Thr	Ser	Ser	Val	Ala	Val	Gly	Cys	Leu	Ala	Gln	Asp	325	330	335	
Phe	Leu	Pro	Asp	Ser	Ile	Thr	Phe	Ser	Trp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Ser	340	345	350	
Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Arg	Gly	Phe	Pro	Ser	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Lys	355	360	365	
Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser	Gln	Val	Leu	Leu	Pro	Ser	Lys	Asp	Val	Met	Gln	370	375	380	
Gly	Thr	Asp	Glu	His	Val	Val	Cys	Lys	Val	Gln	His	Pro	Asn	Gly	Asn	385	390	395	400
Lys	Glu	Lys	Asn	Val	Pro	Leu	Pro	Val	Ile	Ala	Glu	Leu	Pro	Pro	Lys	405	410	415	
Val	Ser	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Arg	Asp	Gly	Phe	Phe	Gly	Asn	Pro	Arg	420	425	430	
Ser	Lys	Ser	Lys	Leu	Ile	Cys	Gln	Ala	Thr	Gly	Phe	Ser	Pro	Arg	Gln	435	440	445	
Ile	Gln	Val	Ser	Trp	Leu	Arg	Glu	Gly	Lys	Gln	Val	Gly	Ser	Gly	Val	450	455	460	
Thr	Thr	Asp	Gln	Val	Gln	Ala	Glu	Ala	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	465	470	475	480
Tyr	Lys	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Lys	Glu	Ser	Asp	Trp	Leu	Ser	485	490	495	
Gln	Ser	Met	Phe	Thr	Cys	Arg	Val	Asp	His	Arg	Gly	Leu	Thr	Phe	Gln	500	505	510	
Gln	Asn	Ala	Ser	Ser	Met	Cys	Val	Pro	Asp	Gln	Asp	Thr	Ala	Ile	Arg	515	520	525	
Val	Phe	Ala	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	Ala	Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Lys	Ser	530	535	540	
Thr	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Thr	Tyr	Asp	Ser	Val	545	550	555	560

Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr
565 570 575

Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu
580 585 590

Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys
595 600 605

Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser
610 615 620

Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro
625 630 635 640

Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys
645 650 655

Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln
660 665 670

Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met
675 680 685

Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr
690 695 700

Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val
705 710 715 720

Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys
725 730 735

Ser Thr Glu Gly Glu Val Ser Ala Asp Glu Glu Gly Phe Glu Asn Leu
740 745 750

Trp Ala Thr Ala Ser Thr Phe Ile Val Leu Phe Leu Leu Ser Leu Phe
755 760 765

Tyr Ser Thr Thr Val Thr Leu Phe Lys Val Lys
770 775

<210> 9
 <211> 2259
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Proteína quimérica: FcgammaRI-IgAB

<220>

<221> CDS

5 <222> (1) .. (2259)

<400> 9

atg att ctt acc agc ttt gga gat gac atg tgg ctt cta aca act ctg	48
Met Ile Leu Thr Ser Phe Gly Asp Asp Met Trp Leu Leu Thr Thr Leu	
1 5 10 15	
cta ctt tgg gtt cca gtc ggt ggg gaa gtg gtt aat gcc acc aag gct	96
Leu Leu Trp Val Pro Val Gly Gly Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala	
20 25 30	
gtg atc acc ttg cag cct cca tgg gtc agt att ttc cag aag gaa aat	144
Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn	
35 40 45	
gtc act tta tgg tgt gag ggg cct cac ctg cct gga gac agt tcc aca	192
Val Thr Leu Trp Cys Glu Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr	
50 55 60	
caa tgg ttt atc aac gga aca gcc gtt cag atc tcc acg cct agt tat	240
Gln Trp Phe Ile Asn Gly Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr	
65 70 75 80	
agc atc cca gag gcc agt ttt cag gac agt ggc gaa tac agg tgt cag	288
Ser Ile Pro Glu Ala Ser Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln	
85 90 95	
ata ggt tcc tca atg cca agt gac cct gtg cag ttg caa atc cac aat	336
Ile Gly Ser Ser Met Pro Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn	
100 105 110	
gat tgg ctg cta ctc cag gcc tcc cgc aga gtc ctc aca gaa gga gaa	384
Asp Trp Leu Leu Gln Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu	
115 120 125	
ccc ctg gcc ttg agg tgt cac gga tgg aag aat aaa ctg gtg tac aat	432
Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn	
130 135 140	
gtg gtt ttc tat aga aat gga aaa tcc ttt cag ttt tct tca gat tcg	480
Val Val Phe Tyr Arg Asn Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser	
145 150 155 160	
gag gtc gcc att ctg aaa acc aac ctg agt cac agc ggc atc tac cac	528
Glu Val Ala Ile Leu Lys Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His	
165 170 175	
tgc tca ggc acg gga aga cac cgc tac aca tct gca gga gtg tcc atc	576
Cys Ser Gly Thr Gly Arg His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile	
180 185 190	
acg gtg aaa gag ctg ttt acc acg cca gtg ctg aga gca tcc gtg tca	624
Thr Val Lys Glu Leu Phe Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser	
195 200 205	
tct ccc ttc ccg gag ggg agt ctg gtc acc ctg aac tgt gag acg aat	672
Ser Pro Phe Pro Glu Gly Ser Leu Val Thr Leu Asn Cys Glu Thr Asn	
210 215 220	

ES 2 893 879 T3

ttg ctc ctg cag aga ccc ggc tta cag ctt cac ttc tcc ttc tac gtg	720
Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln Leu His Phe Ser Phe Tyr Val	
225 230 235 240	
ggc agc aag atc ctg gag tac agg aac aca tcc tca gag tac cat ata	768
Gly Ser Lys Ile Leu Glu Tyr Arg Asn Thr Ser Ser Glu Tyr His Ile	
245 250 255	
gca agg gcg gaa aga gaa gat gct gga ttc tac tgg tgt gag gta gcc	816
Ala Arg Ala Glu Arg Glu Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Glu Val Ala	
260 265 270	
acg gag gac agc agt gtc ctt aag cgc agc cct gag ttg gag ctc caa	864
Thr Glu Asp Ser Ser Val Leu Lys Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln	
275 280 285	
gtg ctt ggt ccc cag tca tca gct cct ggt tct gct tcg ggc tca gga	912
Val Leu Gly Pro Gln Ser Ser Ala Pro Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly	
290 295 300	
ctg tgg atg cat aag gtg cct gca tcg ctc atg gtg agc ctg ggc gaa	960
Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser Leu Gly Glu	
305 310 315 320	
gat gca cat ttt cag tgt ccc cat aac agc tcc aac aac gcg aac gtg	1008
Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn Ala Asn Val	
325 330 335	
acc tgg tgg cgg gtg ctc cat ggc aat tac acc tgg ccg cct gaa ttt	1056
Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro Pro Glu Phe	
340 345 350	
ctc gga ccg gga gag gac ccg aat ggg acc ctt atc atc cag aac gtg	1104
Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr Leu Ile Ile Gln Asn Val	
355 360 365	
aat aag tcc cac gga gga atc tac gtc tgc cgc gtg caa gag gga aat	1152
Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Gln Glu Gly Asn	
370 375 380	
gag agc tac caa cag tca tgc gga acg tac ctc cgc gtc ccg cag cca	1200
Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val Arg Gln Pro	
385 390 395 400	
cca ccg agg ccg ttc ctc gat atg gga gag gga act aag aac ccg atc	1248
Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile	
405 410 415	
att acc gcc gaa ggc atc atc ctc ctc ttc tgc gcc gtc gtg ccg ggg	1296
Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly	
420 425 430	
act ctg ctt ctg ttc cgg aaa agg tgg caa aac gaa aag ctg ggt ctg	1344
Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu	
435 440 445	
gac gct ggg gac gaa tac gag gat gaa aac ttg tac gag ggc ctg aat	1392
Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn	
450 455 460	
ctg gac gat tgc tcg atg tat gag gac att agc aga gga ctg cag ggt	1440
Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly	

ES 2 893 879 T3

465					470					475					480	
acc tac caa gac gtg gga agc ctg aac atc ggg gat gtg cag ctc gag																1488
Thr Tyr Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu																
				485					490						495	
aaa cca agg aaa aga aga gct agc gaa gga cgc gga tca ctg ctt act																1536
Lys Pro Arg Lys Arg Arg Ala Ser Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr				500				505						510		
tgc ggc gat gtc gaa gaa aat ccc gga cca atg gcc aga ttg gcg ctg																1584
Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Arg Leu Ala Leu				515				520						525		
tcg ccg gtc cct tcg cac tgg atg gtg gcc ctg ctg ctc ttg ctt tcg																1632
Ser Pro Val Pro Ser His Trp Met Val Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ser				530				535					540			
gcg gct gag ccg gtg cca gcg gct aga tcg gag gac cgc tac aga aat																1680
Ala Ala Glu Pro Val Pro Ala Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn								545				550		555		560
ccg aag ggt tcc gct tgc tca cgc atc tgg caa tca cca cgc ttc atc																1728
Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile				565					570						575	
gcg cgc aaa cgc ggc ttc act gtc aag atg cac tgc tat atg aac tcg																1776
Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser				580				585						590		
gcc agc ggg aat gtg tcg tgg ctg tgg aag cag gaa atg gac gag aat																1824
Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn				595				600					605			
ccg cag caa ctg aaa ctg gag aag ggc cgg atg gaa gaa tcc cag aat																1872
Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn				610				615					620			
gag tcg ctg gcc acc ctt act atc caa ggt atc cgg ttt gaa gat aac																1920
Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn				625				630				635			640	
ggg atc tac ttc tgt caa cag aag tgt aac aac act tca gag gtg tac																1968
Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr				645					650						655	
cag gga tgc ggc acc gaa ctc cgc gtc atg gga ttc tcc acc ctc gcc																2016
Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala				660				665						670		
caa ctg aag cag cgc aac acg ctg aag gac ggc atc att atg atc cag																2064
Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln				675				680					685			
acc ctg ctg atc atc ctg ttc atc att gtg ccg atc ttt ctg ctc ttg																2112
Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu				690				695				700				
gat aag gac gac tcg aaa gcc gga atg gaa gag gac cac acg tac gaa																2160
Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr Glu				705				710				715			720	
ggt ctg gac atc gac caa act gcg act tac gag gac att gtg acc ctc																2208

ES 2 893 879 T3

Gly	Leu	Asp	Ile	Asp	Gln	Thr	Ala	Thr	Tyr	Glu	Asp	Ile	Val	Thr	Leu	
				725					730					735		
cgg	act	ggc	gaa	gtc	aag	tgg	tcc	gtg	ggt	gaa	cac	cct	gga	cag	gaa	2256
Arg	Thr	Gly	Glu	Val	Lys	Trp	Ser	Val	Gly	Glu	His	Pro	Gly	Gln	Glu	
			740					745					750			
tag																2259

<210> 10
 <211> 752
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 10

ES 2 893 879 T3

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

ES 2 893 879 T3

Cys	Ser	Gly	Thr	Gly	Arg	His	Arg	Tyr	Thr	Ser	Ala	Gly	Val	Ser	Ile	180	185	190
Thr	Val	Lys	Glu	Leu	Phe	Thr	Thr	Pro	Val	Leu	Arg	Ala	Ser	Val	Ser	195	200	205
Ser	Pro	Phe	Pro	Glu	Gly	Ser	Leu	Val	Thr	Leu	Asn	Cys	Glu	Thr	Asn	210	215	220
Leu	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Leu	Gln	Leu	His	Phe	Ser	Phe	Tyr	Val	225	230	235
Gly	Ser	Lys	Ile	Leu	Glu	Tyr	Arg	Asn	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	His	Ile	245	250	255
Ala	Arg	Ala	Glu	Arg	Glu	Asp	Ala	Gly	Phe	Tyr	Trp	Cys	Glu	Val	Ala	260	265	270
Thr	Glu	Asp	Ser	Ser	Val	Leu	Lys	Arg	Ser	Pro	Glu	Leu	Glu	Leu	Gln	275	280	285
Val	Leu	Gly	Pro	Gln	Ser	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	290	295	300
Leu	Trp	Met	His	Lys	Val	Pro	Ala	Ser	Leu	Met	Val	Ser	Leu	Gly	Glu	305	310	315
Asp	Ala	His	Phe	Gln	Cys	Pro	His	Asn	Ser	Ser	Asn	Asn	Ala	Asn	Val	325	330	335
Thr	Trp	Trp	Arg	Val	Leu	His	Gly	Asn	Tyr	Thr	Trp	Pro	Pro	Glu	Phe	340	345	350
Leu	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Pro	Asn	Gly	Thr	Leu	Ile	Ile	Gln	Asn	Val	355	360	365
Asn	Lys	Ser	His	Gly	Gly	Ile	Tyr	Val	Cys	Arg	Val	Gln	Glu	Gly	Asn	370	375	380
Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Ser	Cys	Gly	Thr	Tyr	Leu	Arg	Val	Arg	Gln	Pro	385	390	395
Pro	Pro	Arg	Pro	Phe	Leu	Asp	Met	Gly	Glu	Gly	Thr	Lys	Asn	Arg	Ile	405	410	415
Ile	Thr	Ala	Glu	Gly	Ile	Ile	Leu	Leu	Phe	Cys	Ala	Val	Val	Pro	Gly	420	425	430

ES 2 893 879 T3

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

675	680	685													
Thr	Leu	Leu	Ile	Ile	Leu	Phe	Ile	Ile	Val	Pro	Ile	Phe	Leu	Leu	Leu
690						695					700				
Asp	Lys	Asp	Asp	Ser	Lys	Ala	Gly	Met	Glu	Glu	Asp	His	Thr	Tyr	Glu
705					710					715					720
Gly	Leu	Asp	Ile	Asp	Gln	Thr	Ala	Thr	Tyr	Glu	Asp	Ile	Val	Thr	Leu
				725					730					735	
Arg	Thr	Gly	Glu	Val	Lys	Trp	Ser	Val	Gly	Glu	His	Pro	Gly	Gln	Glu
			740					745					750		

<210> 11

<211> 1335

5 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica: FcgammaRI-CD3Z

10

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1335)

15

<400> 11

ES 2 893 879 T3

atg aag tgg aag gcg ctt ttc acc gcg gcc atc ctg cag gca cag ttg	48
Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu	
1 5 10 15	
ccg att aca gag gca gaa gtg gtt aat gcc acc aag gct gtg atc acc	96
Pro Ile Thr Glu Ala Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala Val Ile Thr	
20 25 30	
ttg cag cct cca tgg gtc agt att ttc cag aag gaa aat gtc act tta	144
Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn Val Thr Leu	
35 40 45	
tgg tgt gag ggg cct cac ctg cct gga gac agt tcc aca caa tgg ttt	192
Trp Cys Glu Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr Gln Trp Phe	
50 55 60	
atc aac gga aca gcc gtt cag atc tcc acg cct agt tat agc atc cca	240
Ile Asn Gly Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr Ser Ile Pro	
65 70 75 80	
gag gcc agt ttt cag gac agt ggc gaa tac agg tgt cag ata ggt tcc	288
Glu Ala Ser Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ile Gly Ser	
85 90 95	
tca atg cca agt gac cct gtg cag ttg caa atc cac aat gat tgg ctg	336
Ser Met Pro Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn Asp Trp Leu	
100 105 110	
cta ctc cag gcc tcc cgc aga gtc ctc aca gaa gga gaa ccc ctg gcc	384
Leu Leu Gln Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala	

ES 2 893 879 T3

115	120	125	
ttg agg tgt cac gga tgg aag aat aaa ctg gtg tac aat gtg gtt ttc			432
Leu Arg Cys His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn Val Val Phe			
130	135	140	
tat aga aat gga aaa tcc ttt cag ttt tct tca gat tcg gag gtc gcc			480
Tyr Arg Asn Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser Glu Val Ala			
145	150	155	160
att ctg aaa acc aac ctg agt cac agc ggc atc tac cac tgc tca ggc			528
Ile Leu Lys Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His Cys Ser Gly			
	165	170	175
acg gga aga cac cgc tac aca tct gca gga gtg tcc atc acg gtg aaa			576
Thr Gly Arg His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile Thr Val Lys			
	180	185	190
gag ctg ttt acc acg cca gtg ctg aga gca tcc gtg tca tct ccc ttc			624
Glu Leu Phe Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser Ser Pro Phe			
	195	200	205
ccg gag ggg agt ctg gtc acc ctg aac tgt gag acg aat ttg ctc ctg			672
Pro Glu Gly Ser Leu Val Thr Leu Asn Cys Glu Thr Asn Leu Leu Leu			
	210	215	220
cag aga ccc ggc tta cag ctt cac ttc tcc ttc tac gtg ggc agc aag			720
Gln Arg Pro Gly Leu Gln Leu His Phe Ser Phe Tyr Val Gly Ser Lys			
225	230	235	240
atc ctg gag tac agg aac aca tcc tca gag tac cat ata gca agg gcg			768
Ile Leu Glu Tyr Arg Asn Thr Ser Ser Glu Tyr His Ile Ala Arg Ala			
	245	250	255
gaa aga gaa gat gct gga ttc tac tgg tgt gag gta gcc acg gag gac			816
Glu Arg Glu Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Glu Val Ala Thr Glu Asp			
	260	265	270
agc agt gtc ctt aag cgc agc cct gag ttg gag ctc caa gtg ctt ggt			864
Ser Ser Val Leu Lys Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly			
	275	280	285
ccc cag tca tca gct cct ggt tct gct tct ggt tct ggt cag agc ttt			912
Pro Gln Ser Ser Ala Pro Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly Gln Ser Phe			
	290	295	300
ggc ctg ctg gat ccc aaa ctc tgc tac ctg ctg gat gga atc ctc ttc			960
Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe			
305	310	315	320
atc tat ggt gtc att ctc act gcc ttg ttc ctg aga gtg aag ttc agc			1008
Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser			
	325	330	335
agg agc gca gac gcc ccc gcg tac cag cag ggc cag aac cag ctc tat			1056
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr			
	340	345	350
aac gag ctc aat cta gga cga aga gag gag tac gat gtt ttg gac aag			1104
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys			
	355	360	365
aga cgt ggc cgg gac cct gag atg ggg gga aag ccg cag aga agg aag			1152

Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Gln	Arg	Arg	Lys	
370						375					380					
aac	cct	cag	gaa	ggc	ctg	tac	aat	gaa	ctg	cag	aaa	gat	aag	atg	gcg	1200
Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	
385					390					395					400	
gag	gcc	tac	agt	gag	att	ggg	atg	aaa	ggc	gag	cgc	cgg	agg	ggc	aag	1248
Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	
				405					410					415		
ggg	cac	gat	ggc	ctt	tac	cag	ggg	ctc	agt	aca	gcc	acc	aag	gac	acc	1296
Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	
			420					425					430			
tac	gac	gcc	ctt	cac	atg	cag	gcc	ctg	ccc	cct	cgc	taa				1335
Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg					
		435					440									

<210> 12
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 12

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

ES 2 893 879 T3

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

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
385 390 395 400

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
405 410 415

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
420 425 430

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
435 440

<210> 13

<211> 1848

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica: FcγRI-IgE

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1848)

<400> 13

cat atg gaa gtg gtt aat gcc acc aag gct gtg atc acc ttg cag cct	48
His Met Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro	
1 5 10 15	
cca tgg gtc agt att ttc cag aag gaa aat gtc act tta tgg tgt gag	96
Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn Val Thr Leu Trp Cys Glu	
20 25 30	
ggg cct cac ctg cct gga gac agt tcc aca caa tgg ttt atc aac gga	144
Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr Gln Trp Phe Ile Asn Gly	
35 40 45	
aca gcc gtt cag atc tcc acg cct agt tat agc atc cca gag gcc agt	192
Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr Ser Ile Pro Glu Ala Ser	
50 55 60	
ttt cag gac agt ggc gaa tac agg tgt cag ata ggt tcc tca atg cca	240
Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ile Gly Ser Ser Met Pro	
65 70 75 80	
agt gac cct gtg cag ttg caa atc cac aat gat tgg ctg cta ctc cag	288
Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn Asp Trp Leu Leu Leu Gln	
85 90 95	
gcc tcc cgc aga gtc ctc aca gaa gga gaa ccc ctg gcc ttg agg tgt	336
Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys	
100 105 110	
cac gga tgg aag aat aaa ctg gtg tac aat gtg gtt ttc tat aga aat	384
His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn Val Val Phe Tyr Arg Asn	
115 120 125	
gga aaa tcc ttt cag ttt tct tca gat tcg gag gtc gcc att ctg aaa	432

ES 2 893 879 T3

Gly	Lys	Ser	Phe	Gln	Phe	Ser	Ser	Asp	Ser	Glu	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	
130						135					140					
acc	aac	ctg	agt	cac	agc	ggc	atc	tac	cac	tgc	tca	ggc	acg	gga	aga	480
Thr	Asn	Leu	Ser	His	Ser	Gly	Ile	Tyr	His	Cys	Ser	Gly	Thr	Gly	Arg	
145					150					155					160	
cac	cgc	tac	aca	tct	gca	gga	gtg	tcc	atc	acg	gtg	aaa	gag	ctg	ttt	528
His	Arg	Tyr	Thr	Ser	Ala	Gly	Val	Ser	Ile	Thr	Val	Lys	Glu	Leu	Phe	
				165					170					175		
acc	acg	cca	gtg	ctg	aga	gca	tcc	gtg	tca	tct	ccc	ttc	ccg	gag	ggg	576
Thr	Thr	Pro	Val	Leu	Arg	Ala	Ser	Val	Ser	Ser	Pro	Phe	Pro	Glu	Gly	
			180					185					190			
agt	ctg	gtc	acc	ctg	aac	tgt	gag	acg	aat	ttg	ctc	ctg	cag	aga	ccc	624
Ser	Leu	Val	Thr	Leu	Asn	Cys	Glu	Thr	Asn	Leu	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	
		195					200					205				
ggc	tta	cag	ctt	cac	ttc	tcc	ttc	tac	gtg	ggc	agc	aag	atc	ctg	gag	672
Gly	Leu	Gln	Leu	His	Phe	Ser	Phe	Tyr	Val	Gly	Ser	Lys	Ile	Leu	Glu	
210					215						220					
tac	agg	aac	aca	tcc	tca	gag	tac	cat	ata	gca	agg	gcg	gaa	aga	gaa	720
Tyr	Arg	Asn	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	His	Ile	Ala	Arg	Ala	Glu	Arg	Glu	
225					230					235					240	
gat	gct	gga	ttc	tac	tgg	tgt	gag	gta	gcc	acg	gag	gac	agc	agt	gtc	768
Asp	Ala	Gly	Phe	Tyr	Trp	Cys	Glu	Val	Ala	Thr	Glu	Asp	Ser	Ser	Val	
				245					250					255		
ctt	aag	cgc	agc	cct	gag	ttg	gag	ctc	caa	gtg	ctt	ggt	ccc	cag	tca	816
Leu	Lys	Arg	Ser	Pro	Glu	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Leu	Gly	Pro	Gln	Ser	
			260					265					270			
tca	gct	cct	ggt	tct	gct	tct	ggt	tct	ggt	gtt	cga	cca	gtt	aac	atc	864
Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Val	Arg	Pro	Val	Asn	Ile	
		275					280					285				
acc	gag	ccc	aca	ctg	gaa	ctg	ctg	cac	agc	agc	tgc	gac	ccc	aac	gcc	912
Thr	Glu	Pro	Thr	Leu	Glu	Leu	Leu	His	Ser	Ser	Cys	Asp	Pro	Asn	Ala	
		290				295					300					
ttc	cac	agc	acc	atc	cag	ctg	tat	tgc	ttc	atc	tac	ggc	cac	atc	ctg	960
Phe	His	Ser	Thr	Ile	Gln	Leu	Tyr	Cys	Phe	Ile	Tyr	Gly	His	Ile	Leu	
305					310					315					320	
aac	gac	gtg	tcc	gtg	tcc	tgg	ctg	atg	gac	gac	aga	gag	atc	acc	gac	1008
Asn	Asp	Val	Ser	Val	Ser	Trp	Leu	Met	Asp	Asp	Arg	Glu	Ile	Thr	Asp	
				325					330					335		
acc	ctg	gcc	cag	acc	gtg	ctg	atc	aaa	gag	gaa	ggc	aag	ctg	gcc	tct	1056
Thr	Leu	Ala	Gln	Thr	Val	Leu	Ile	Lys	Glu	Glu	Gly	Lys	Leu	Ala	Ser	
			340					345					350			
acc	tgc	agc	aag	ctg	aat	atc	aca	gag	cag	cag	tgg	atg	agc	gag	agc	1104
Thr	Cys	Ser	Lys	Leu	Asn	Ile	Thr	Glu	Gln	Gln	Trp	Met	Ser	Glu	Ser	
		355					360					365				
acc	ttc	acc	tgt	aaa	gtg	acc	tcc	cag	ggc	gtg	gac	tac	ctg	gcc	cac	1152
Thr	Phe	Thr	Cys	Lys	Val	Thr	Ser	Gln	Gly	Val	Asp	Tyr	Leu	Ala	His	
		370				375					380					

acc aga aga tgc ccc gac cac gaa ccc aga ggc gtg atc acc tac ctg	1200
Thr Arg Arg Cys Pro Asp His Glu Pro Arg Gly Val Ile Thr Tyr Leu	
385 390 395 400	
atc ccc cct agc ccc ctg gac ctg tac cag aac ggc gct cct aag ctg	1248
Ile Pro Pro Ser Pro Leu Asp Leu Tyr Gln Asn Gly Ala Pro Lys Leu	
405 410 415	
acc tgc ctg gtg gtg gac ctg gaa agc gag aag aac gtg aac gtg aca	1296
Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Glu Ser Glu Lys Asn Val Asn Val Thr	
420 425 430	
tgg aac cag gaa aag aaa acc agc gtg tcc gcc agc cag tgg tac acc	1344
Trp Asn Gln Glu Lys Lys Thr Ser Val Ser Ala Ser Gln Trp Tyr Thr	
435 440 445	
aag cac cac aac aac gcc acc acc tcc atc acc agc atc ctg ccc gtg	1392
Lys His His Asn Asn Ala Thr Ser Ile Thr Ser Ile Leu Pro Val	
450 455 460	
gtg gcc aag gac tgg atc gag ggc tac ggc tac cag tgc atc gtg gac	1440
Val Ala Lys Asp Trp Ile Glu Gly Tyr Gly Tyr Gln Cys Ile Val Asp	
465 470 475 480	
cac ccc gac ttc cct aag ccc atc gtg cgg agc atc acc aag acc cct	1488
His Pro Asp Phe Pro Lys Pro Ile Val Arg Ser Ile Thr Lys Thr Pro	
485 490 495	
ggc cag aga tct gcc ccc gag gtg tac gtg ttc ccc cca cct gag gaa	1536
Gly Gln Arg Ser Ala Pro Glu Val Tyr Val Phe Pro Pro Pro Glu Glu	
500 505 510	
gag tcc gag gac aag aga acc ctg acc tgt ctg atc cag aac ttc ttc	1584
Glu Ser Glu Asp Lys Arg Thr Leu Thr Cys Leu Ile Gln Asn Phe Phe	
515 520 525	
cca gag gac atc agc gtg cag tgg ctg ggc gac ggc aag ctg atc tcc	1632
Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu Gly Asp Gly Lys Leu Ile Ser	
530 535 540	
aac agc cag cac agc aca acc acc cct ctg aag tcc aac ggc agc aac	1680
Asn Ser Gln His Ser Thr Thr Thr Pro Leu Lys Ser Asn Gly Ser Asn	
545 550 555 560	
cag ggc ttc ttc atc ttc agc aga ctg gaa gtg gcc aag acc ctg tgg	1728
Gln Gly Phe Phe Ile Phe Ser Arg Leu Glu Val Ala Lys Thr Leu Trp	
565 570 575	
acc cag aga aag cag ttt aca tgc caa gtg atc cat gag gcc ctg cag	1776
Thr Gln Arg Lys Gln Phe Thr Cys Gln Val Ile His Glu Ala Leu Gln	
580 585 590	
aag ccc aga aag ctg gaa aag acc atc agc acc agc ctg ggc aac acc	1824
Lys Pro Arg Lys Leu Glu Lys Thr Ile Ser Thr Ser Leu Gly Asn Thr	
595 600 605	
tcc ctg cgc cct agt tag ctc gag	1848
Ser Leu Arg Pro Ser Leu Glu	
610 615	

<210> 14
 <211> 613
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<400> 14

His Met Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro
1 5 10 15

Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn Val Thr Leu Trp Cys Glu
20 25 30

Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr Gln Trp Phe Ile Asn Gly
35 40 45

Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr Ser Ile Pro Glu Ala Ser
50 55 60

Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ile Gly Ser Ser Met Pro
65 70 75 80

Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn Asp Trp Leu Leu Leu Gln
85 90 95

Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys
100 105 110

His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn Val Val Phe Tyr Arg Asn
115 120 125

Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser Glu Val Ala Ile Leu Lys
130 135 140

Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His Cys Ser Gly Thr Gly Arg
145 150 155 160

His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile Thr Val Lys Glu Leu Phe
165 170 175

Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser Ser Pro Phe Pro Glu Gly
180 185 190

Ser Leu Val Thr Leu Asn Cys Glu Thr Asn Leu Leu Leu Gln Arg Pro
195 200 205

Gly Leu Gln Leu His Phe Ser Phe Tyr Val Gly Ser Lys Ile Leu Glu
210 215 220

ES 2 893 879 T3

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

ES 2 893 879 T3

His Pro Asp Phe Pro Lys Pro Ile Val Arg Ser Ile Thr Lys Thr Pro
485 490 495

Gly Gln Arg Ser Ala Pro Glu Val Tyr Val Phe Pro Pro Pro Glu Glu
500 505 510

Glu Ser Glu Asp Lys Arg Thr Leu Thr Cys Leu Ile Gln Asn Phe Phe
515 520 525

Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu Gly Asp Gly Lys Leu Ile Ser
530 535 540

Asn Ser Gln His Ser Thr Thr Thr Pro Leu Lys Ser Asn Gly Ser Asn
545 550 555 560

Gln Gly Phe Phe Ile Phe Ser Arg Leu Glu Val Ala Lys Thr Leu Trp
565 570 575

Thr Gln Arg Lys Gln Phe Thr Cys Gln Val Ile His Glu Ala Leu Gln
580 585 590

Lys Pro Arg Lys Leu Glu Lys Thr Ile Ser Thr Ser Leu Gly Asn Thr
595 600 605

Ser Leu Arg Pro Ser
610

<210> 15
<211> 1449
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína quimérica: BBP-IgE

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1449)

<400> 15

cat atg act tac aag ctg gtg atc aac ggt aaa acc ttg aag ggt gag	48
His Met Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu	
1 5 10 15	
acc acc act gag gca gtc gac gcc gcc act gcc gag aag gtc ttt aaa	96
Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys	
20 25 30	
cag tat gcc aat gat aac ggc gtg gac ggc gag tgg acc tac gat gac	144
Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp	
35 40 45	

ES 2 893 879 T3

gcc Ala 50	act Thr	aag Lys	aca Thr	ttc Phe	act Thr	gtg Val 55	act Thr	gaa Glu	aag Lys	ccc Pro 60	gag Glu	gtg Val	att Ile	gac Asp	gcg Ala	192
tcc Ser 65	gaa Glu	ttg Leu	aca Thr	cct Pro	gcg Ala 70	gtg Val	acc Thr	acc Thr	tac Tyr	aaa Lys 75	ctg Leu	gtt Val	atc Ile	aac Asn	ggc Gly 80	240
aag Lys	act Thr	ctg Leu	aag Lys	ggc Gly 85	gag Glu	acc Thr	acc Thr	aca Thr	gag Glu 90	gca Ala	gtc Val	gat Asp	gcc Ala 95	gcc Ala	acc Thr	288
gcc Ala	gag Glu	aag Lys	gtc Val 100	ttc Phe	aag Lys	caa Gln	tat Tyr	gcc Ala 105	aac Asn	gac Asp	aac Asn	ggg Gly	gtg Val 110	gac Asp	ggg Gly	336
gag Glu	tgg Trp 115	acc Thr	tac Tyr	gat Asp	gat Asp	gcc Ala 120	acc Thr	aag Lys	acc Thr	ttc Phe	acc Thr	gtg Val 125	acc Thr	gag Glu	aag Lys	384
ccc Pro 130	gaa Glu	gtg Val	atc Ile	gat Asp	gcg Ala 135	agt Ser	gaa Glu	ctg Leu	act Thr	ccc Pro	gcc Ala 140	gtg Val	aca Thr	ggt Gly	tct Ser	432
gct Ala 145	tct Ser	ggt Gly	tct Ser	ggt Gly	gtt Val 150	cga Arg	cca Pro	gtt Val	aac Asn	atc Ile 155	acc Thr	gag Glu	ccc Pro	aca Thr	ctg Leu 160	480
gaa Glu	ctg Leu	ctg Leu	cac His	agc Ser 165	agc Ser	tgc Cys	gac Asp	ccc Pro	aac Asn 170	gcc Ala	ttc Phe	cac His	agc Ser	acc Thr 175	atc Ile	528
cag Gln	ctg Leu	tat Tyr	tgc Cys 180	ttc Phe	atc Ile	tac Tyr	ggc Gly 185	cac His	atc Ile	ctg Leu	aac Asn	gac Asp	gtg Val 190	tcc Ser	gtg Val	576
tcc Ser	tgg Trp 195	ctg Leu	atg Met	gac Asp	gac Asp	aga Arg	gag Glu 200	atc Ile	acc Thr	gac Asp	acc Thr	ctg Leu 205	gcc Ala	cag Gln	acc Thr	624
gtg Val 210	ctg Leu	atc Ile	aaa Lys	gag Glu	gaa Glu	ggc Gly 215	aag Lys	ctg Leu	gcc Ala	tct Ser	acc Thr 220	tgc Cys	agc Ser	aag Lys	ctg Leu	672
aat Asn 225	atc Ile	aca Thr	gag Glu	cag Gln	cag Gln 230	tgg Trp	atg Met	agc Ser	gag Glu	agc Ser 235	acc Thr	ttc Phe	acc Thr	tgt Cys	aaa Lys 240	720
gtg Val	acc Thr	tcc Ser	cag Gln	ggc Gly 245	gtg Val	gac Asp	tac Tyr	ctg Leu	gcc Ala 250	cac His	acc Thr	aga Arg	aga Arg	tgc Cys 255	ccc Pro	768
gac Asp	cac His	gaa Glu 260	ccc Pro	aga Arg	ggc Gly	gtg Val	atc Ile	acc Thr 265	tac Tyr	ctg Leu	atc Ile	ccc Pro	cct Pro 270	agc Ser	ccc Pro	816
ctg Leu	gac Asp	ctg Leu	tac Tyr	cag Gln	aac Asn	ggc Gly	gct Ala 280	cct Pro	aag Lys	ctg Leu	acc Thr	tgc Cys	ctg Leu	gtg Val	gtg Val	864
gac Asp	ctg Leu	gaa Glu	agc Ser	gag Glu	aag Lys	aac Asn	gtg Val	aac Asn	gtg Val	aca Thr	tgg Trp	aac Asn	cag Gln	gaa Glu	aag Lys	912

ES 2 893 879 T3

290	295	300	
aaa acc agc gtg tcc gcc agc cag tgg tac acc aag cac cac aac aac Lys Thr Ser Val Ser Ala Ser Gln Trp Tyr Thr Lys His His Asn Asn 305 310 315 320			960
gcc acc acc tcc atc acc agc atc ctg ccc gtg gtg gcc aag gac tgg Ala Thr Thr Ser Ile Thr Ser Ile Leu Pro Val Val Ala Lys Asp Trp 325 330 335			1008
atc gag ggc tac ggc tac cag tgc atc gtg gac cac ccc gac ttc cct Ile Glu Gly Tyr Gly Tyr Gln Cys Ile Val Asp His Pro Asp Phe Pro 340 345 350			1056
aag ccc atc gtg cgg agc atc acc aag acc cct ggc cag aga tct gcc Lys Pro Ile Val Arg Ser Ile Thr Lys Thr Pro Gly Gln Arg Ser Ala 355 360 365			1104
ccc gag gtg tac gtg ttc ccc cca cct gag gaa gag tcc gag gac aag Pro Glu Val Tyr Val Phe Pro Pro Glu Glu Ser Glu Asp Lys 370 375 380			1152
aga acc ctg acc tgt ctg atc cag aac ttc ttc cca gag gac atc agc Arg Thr Leu Thr Cys Leu Ile Gln Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile Ser 385 390 395 400			1200
gtg cag tgg ctg ggc gac ggc aag ctg atc tcc aac agc cag cac agc Val Gln Trp Leu Gly Asp Gly Lys Leu Ile Ser Asn Ser Gln His Ser 405 410 415			1248
aca acc acc cct ctg aag tcc aac ggc agc aac cag ggc ttc ttc atc Thr Thr Thr Pro Leu Lys Ser Asn Gly Ser Asn Gln Gly Phe Phe Ile 420 425 430			1296
ttc agc aga ctg gaa gtg gcc aag acc ctg tgg acc cag aga aag cag Phe Ser Arg Leu Glu Val Ala Lys Thr Leu Trp Thr Gln Arg Lys Gln 435 440 445			1344
ttt aca tgc caa gtg atc cat gag gcc ctg cag aag ccc aga aag ctg Phe Thr Cys Gln Val Ile His Glu Ala Leu Gln Lys Pro Arg Lys Leu 450 455 460			1392
gaa aag acc atc agc acc agc ctg ggc aac acc tcc ctg cgc cct agt Glu Lys Thr Ile Ser Thr Ser Leu Gly Asn Thr Ser Leu Arg Pro Ser 465 470 475 480			1440
tag ctc gag Leu Glu			1449

<210> 16
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 16

His Met Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu
 1 5 10 15

ES 2 893 879 T3

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

ES 2 893 879 T3

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

<210> 17

<211> 864

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica: mSa-CD3Z

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(864)

5 <400> 17

atg aag tgg aaa gcc ctt ttt acc gcc gcc att ctg caa gcg caa ttg	48
Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu	
1 5 10 15	
ccg atc act gaa gcc gca tgc gcc gag gcc ggt atc act gga acc tgg	96
Pro Ile Thr Glu Ala Ala Ser Ala Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp	
20 25 30	
tac aac cag cac gga tcc aca ttc acc gtg acc gcc ggt gct gac gga	144
Tyr Asn Gln His Gly Ser Thr Phe Thr Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly	
35 40 45	
aat ctg acc gga cag tac gag aat cgg gct cag ggc acc ggt tgt cag	192
Asn Leu Thr Gly Gln Tyr Glu Asn Arg Ala Gln Gly Thr Gly Cys Gln	
50 55 60	
aac tcc cct tac acc ctc act ggg aga tac aac ggc acc aag ctg gaa	240
Asn Ser Pro Tyr Thr Leu Thr Gly Arg Tyr Asn Gly Thr Lys Leu Glu	
65 70 75 80	
tgg agg gtg gaa tgg aac aac tcc acc gaa aac tgc cat tcc cgc act	288
Trp Arg Val Glu Trp Asn Asn Ser Thr Glu Asn Cys His Ser Arg Thr	
85 90 95	
gag tgg cgc gga cag tat cag ggg gga gcc gaa gcg cgg atc aac acc	336
Glu Trp Arg Gly Gln Tyr Gln Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr	
100 105 110	
caa tgg aac ctg acc tac gag ggc ggg agc gga ccc gcg act gag cag	384
Gln Trp Asn Leu Thr Tyr Glu Gly Gly Ser Gly Pro Ala Thr Glu Gln	
115 120 125	
ggc cag gat acg ttc act aag gtc aag ggc agc gca tca ggc tcg gga	432
Gly Gln Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly	
130 135 140	
cag agc ttt ggc ctg ctg gat ccc aaa ctc tgc tac ctg ctg gat gga	480
Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly	
145 150 155 160	
atc ctc ttc atc tat ggt gtc att ctc act gcc ttg ttc ctg aga gtg	528
Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val	
165 170 175	
aag ttc agc agg agc gca gac gcc ccc gcg tac cag cag ggc cag aac	576
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn	
180 185 190	
cag ctc tat aac gag ctc aat cta gga cga aga gag gag tac gat gtt	624
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val	
195 200 205	
ttg gac aag aga cgt ggc cgg gac cct gag atg ggg gga aag ccg cag	672
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln	
210 215 220	
aga agg aag aac cct cag gaa ggc ctg tac aat gaa ctg cag aaa gat	720

ES 2 893 879 T3

Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	
225					230					235					240	
aag	atg	gcg	gag	gcc	tac	agt	gag	att	ggg	atg	aaa	ggc	gag	cgc	cgg	768
Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	
			245						250					255		
agg	ggc	aag	ggg	cac	gat	ggc	ctt	tac	cag	ggg	ctc	agt	aca	gcc	acc	816
Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	
			260					265					270			
aag	gac	acc	tac	gac	gcc	ctt	cac	atg	cag	gcc	ctg	ccc	cct	cgc	taa	864
Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg		
		275					280					285				

<210> 18
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 18

ES 2 893 879 T3

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

Pro Ile Thr Glu Ala Ala Ser Ala Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp
20 25 30

Tyr Asn Gln His Gly Ser Thr Phe Thr Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly
35 40 45

Asn Leu Thr Gly Gln Tyr Glu Asn Arg Ala Gln Gly Thr Gly Cys Gln
50 55 60

Asn Ser Pro Tyr Thr Leu Thr Gly Arg Tyr Asn Gly Thr Lys Leu Glu
65 70 75 80

Trp Arg Val Glu Trp Asn Asn Ser Thr Glu Asn Cys His Ser Arg Thr
85 90 95

Glu Trp Arg Gly Gln Tyr Gln Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr
100 105 110

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

Gly Gln Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly
130 135 140

Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly

145		150		155		160									
Ile	Leu	Phe	Ile	Tyr	Gly	Val	Ile	Leu	Thr	Ala	Leu	Phe	Leu	Arg	Val
			165						170					175	
Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn
			180					185					190		
Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val
		195					200					205			
Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Gln
	210					215					220				
Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp
225					230					235					240
Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg
				245					250					255	
Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr
			260					265					270		
Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	
		275					280					285			

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Enlazador

<400> 19

Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para la detección rápida de analitos, que comprende:

- 5 (a) una célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, en donde la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, procede de un componente celular del sistema inmunitario de un mamífero;
 (b) una proteína indicadora, en donde la proteína indicadora se introduce por ingeniería en y es expresada por la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, y en donde la proteína indicadora emite una señal detectable en respuesta a determinados cambios citosólicos predeterminados en la célula viva, diseñada por ingeniería;
 10 (c) una ruta de transducción de señales introducida por ingeniería en o que aparece de forma natural dentro de la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, en donde la ruta de transducción de señales controla un proceso biológico dentro del citosol de la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, y en donde el proceso biológico, cuando aparece, hace que la proteína indicadora emita una señal detectable;
 (d) al menos un tipo de molécula detectora, en donde cada molécula detectora está adaptada para unirse a un analito específico;
 15 (e) al menos un analito, en donde el al menos un analito se une a la molécula detectora que es específica de ese analito;
 (f) una pluralidad de elementos transductores de señales transmembrana distintos de anticuerpos, expresados por la célula biosensora viva, diseñada por ingeniería, en donde cada elemento transductor de señales está adaptado para recibir una molécula detectora; y
 20 (g) en donde tras la unión de un número suficiente de analitos a un número suficiente de moléculas detectoras que se unen a su vez a elementos transductores de señales transmembrana distintos de anticuerpos, se produce una agregación de elementos transductores de señales en la superficie de la célula biosensora, se activa la ruta de transducción de señales, se produce el proceso biológico y la proteína indicadora emite la señal detectable.

25 2. El sistema de la reivindicación 1, en donde la célula viva, diseñada por ingeniería, procede de una célula B o una célula T, la proteína indicadora es ecuatorina, la ruta de transducción de señales implica un aumento del calcio intracelular, la molécula detectora es un anticuerpo que se une a un patógeno transmitido por los alimentos, el analito es un patógeno transmitido por los alimentos y la pluralidad de elementos transductores de señales está adaptada para recibir un anticuerpo mediante la unión a una parte de una proteína de unión a IgG bacteriana.

3. El sistema de la reivindicación 1, en donde la célula biosensora procede de una célula B o una célula T.

35 4. El sistema de la reivindicación 1, en donde la proteína indicadora es ecuatorina y la señal detectable es un destello de luz azul.

5. El sistema de la reivindicación 1, en donde el proceso biológico controlado por la ruta de transducción de señales incluye además un aumento del calcio intracelular.

40 6. El sistema de la reivindicación 1, en donde el elemento transductor de señales distinto de anticuerpo es una proteína de fusión quimérica expresada por la célula biosensora y en donde la proteína de fusión incluye además:

- (a) al menos un componente de una proteína que está adaptado para unirse al al menos un tipo de molécula detectora; y
 45 (b) al menos un componente de un complejo receptor expresado normalmente en la superficie de un tipo de inmunocito del que procedía la célula biosensora;

y en donde, opcionalmente,

50 el al menos un componente de la proteína que está adaptado para unirse al al menos un tipo de molécula detectora procede de una proteína de unión a anticuerpos bacterianos;
 o en donde, opcionalmente,
 el al menos un componente de la proteína que está adaptado para unirse al al menos un tipo de molécula detectora es un dominio de unión a anticuerpo procedente de una proteína receptora FcR u otra proteína receptora.

55 7. El sistema de la reivindicación 6, en donde el al menos un componente del complejo receptor expresado normalmente en la superficie del inmunocito es IgM; IgA/β; IgE; CD19; CD3ζ o combinaciones de los mismos.

8. El sistema de la reivindicación 1, en donde el elemento transductor de señales distinto de anticuerpo está codificado por una secuencia de ADN que tiene al menos 95 % de identidad con una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 17.

9. El sistema de la reivindicación 1, en donde el elemento transductor de señales distinto de anticuerpo es una proteína de fusión quimérica que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 18.

65 10. El sistema de la reivindicación 1, en donde la al menos una molécula detectora es un anticuerpo soluble.

11. El sistema de la reivindicación 1, en donde la al menos una molécula detectora es IgG soluble.
- 5 12. El sistema de la reivindicación 1, en donde el analito es un agente infeccioso transmitido por alimentos.
13. El sistema de la reivindicación 1, en donde el analito es una bacteria o un virus.
14. Un método para detectar un analito, que comprende poner en contacto una muestra que contiene el analito con el sistema de la reivindicación 1 y detectar el analito cuando la proteína indicadora emite una señal.
- 10 15. Un método para producir el sistema de la reivindicación 1, que comprende transfectar o transformar un inmunocito con uno o más polinucleótidos que codifican los elementos (b), (c) y (f) del sistema.

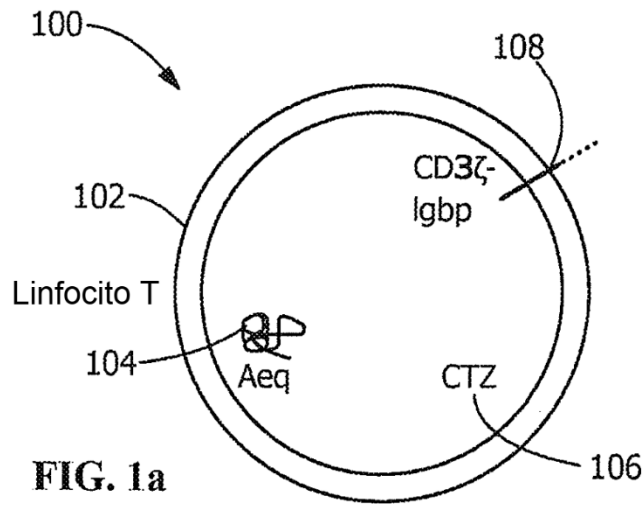


FIG. 1a

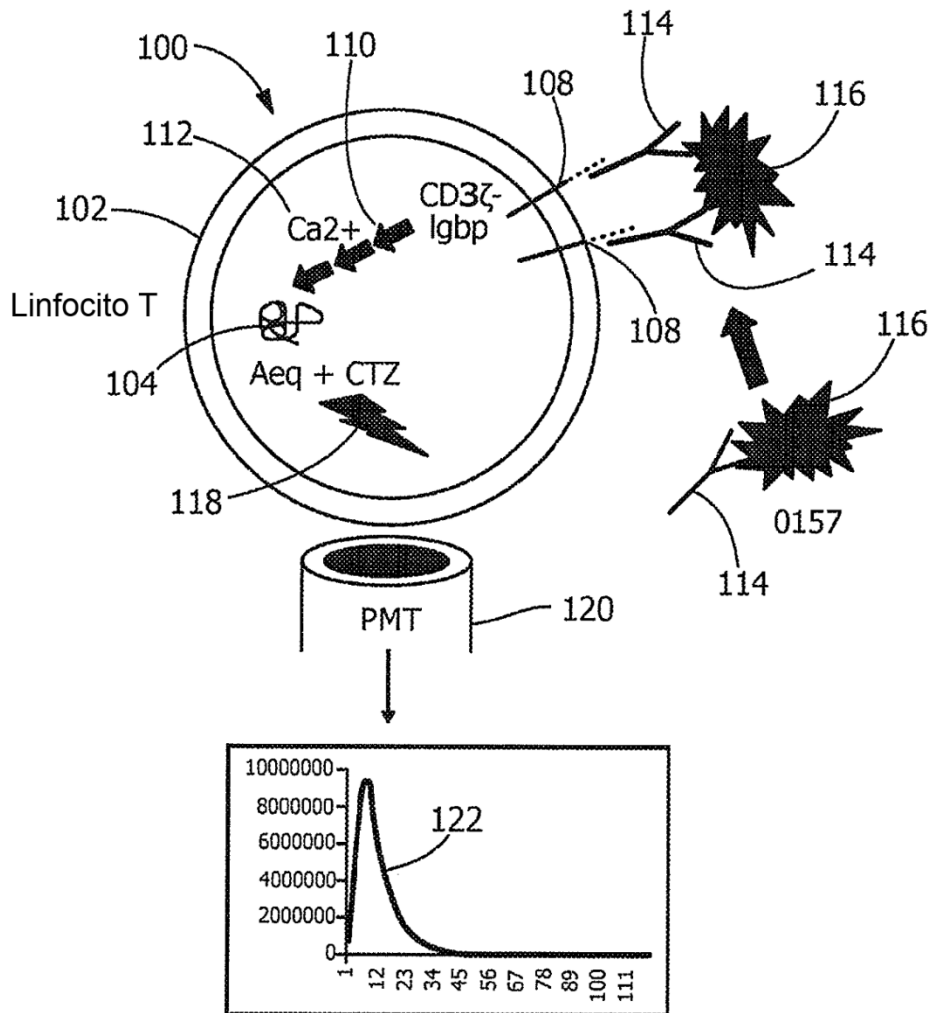
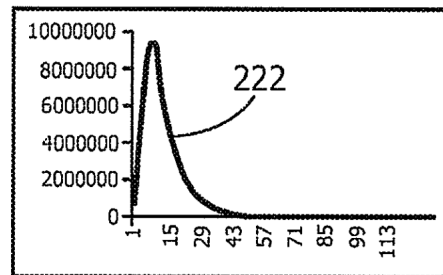
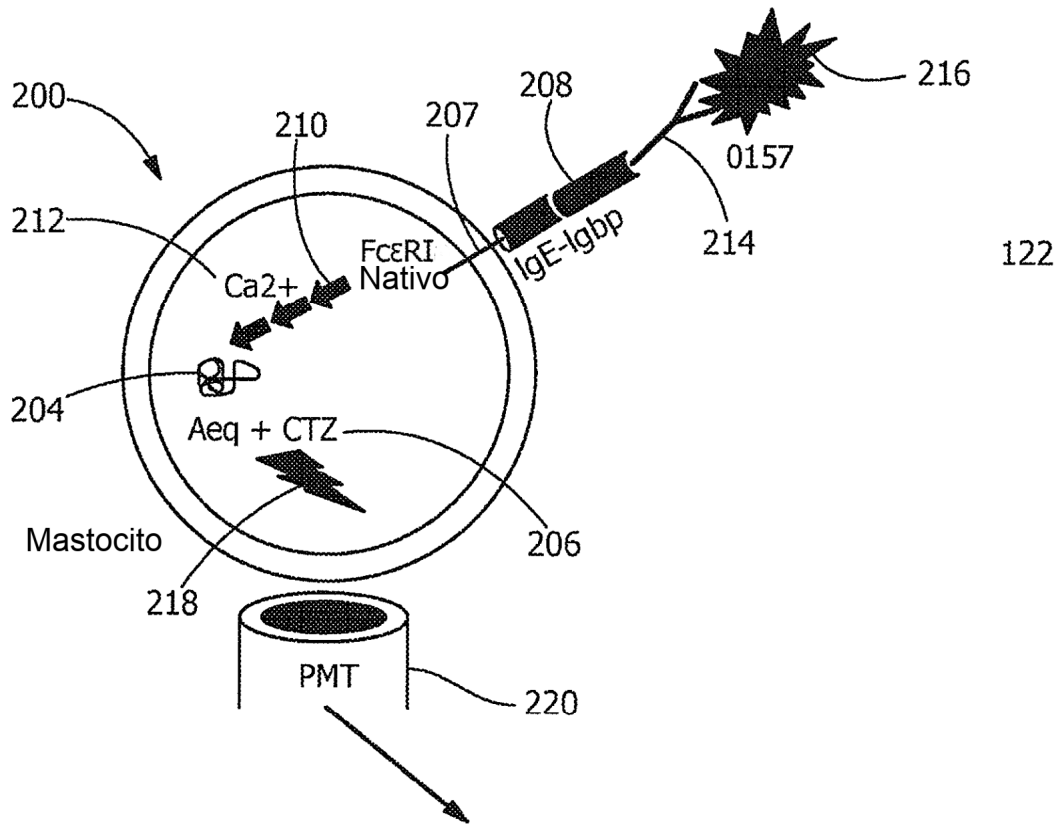
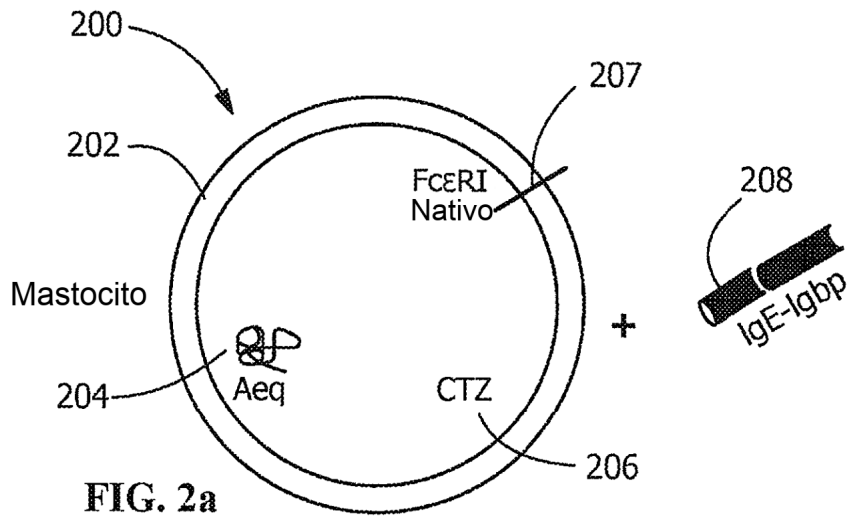


FIG. 1b



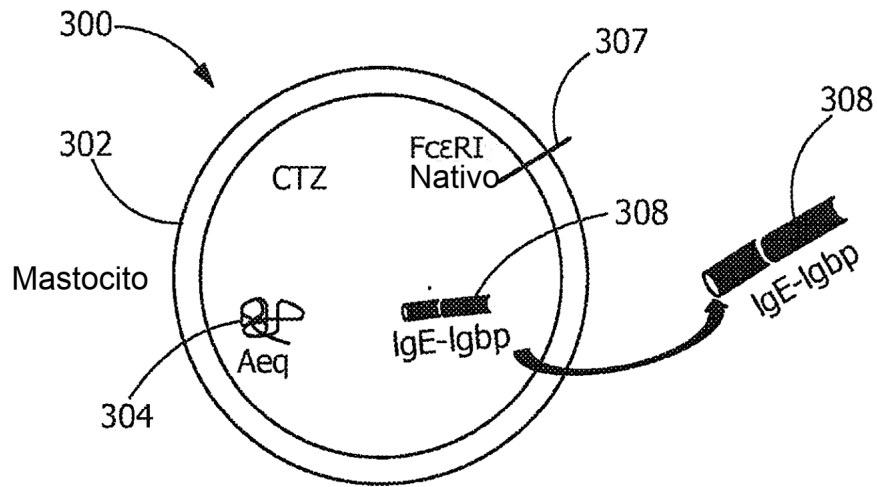


FIG. 3a

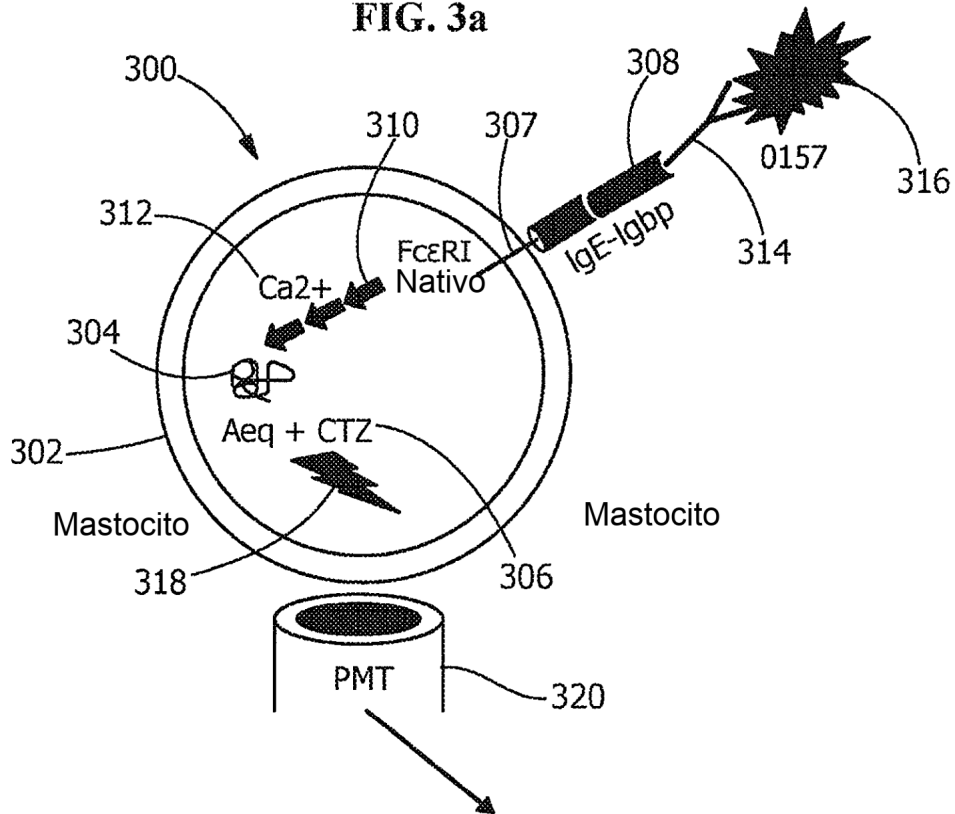


FIG. 3b

