



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 275 563**

51 Int. Cl.:  
**C07K 17/06** (2006.01)  
**C07K 16/26** (2006.01)  
**G01N 33/547** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00981290 .0**  
86 Fecha de presentación : **22.11.2000**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1242460**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.09.2002**

54 Título: **Inmovilización de proteínas mediante el uso de un segmento polipeptídico.**

30 Prioridad: **29.11.1999 EP 99309515**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.06.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.06.2007**

73 Titular/es: **UNILEVER N.V.**  
**Weena 455**  
**3013 AL Rotterdam, NL**

72 Inventor/es: **Grant, Steven, Daryl;**  
**Howell, Steven y**  
**Wilson, Stephen**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte-Enrique**

**ES 2 275 563 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**

Inmovilización de proteínas mediante el uso de un segmento polipeptídico.

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a la inmovilización de proteínas en superficies sólidas. Más particularmente, la invención se refiere a la preparación y uso de materiales, especialmente materiales inmunoadsorbentes, comprendiendo una proteína inmovilizada sobre una superficie sólida mediante un segmento polipeptídico comprendiendo uno o más sitios para un enlace covalente, dicho segmento siendo capaz de adoptar una estructura plegada.

**Antecedentes de la invención**

Los procesos dirigidos a la inmovilización de proteínas sobre una superficie sólida tienen un interés comercial importante. La funcionalización de superficies con materiales inmunológicos, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, forma la base de técnicas de inmunoabsorción tales como los procesos de purificación de la inmunoafinidad que son aplicados esencialmente en la recuperación o purificación de una gama de materiales comercialmente importantes.

Comúnmente, la unión de proteínas a superficies sólidas, como los medios cromatográficos, ha sido realizada mediante la exposición de la superficie a una solución de la proteína para que la proteína sea adsorbida sobre la superficie sólida mediante unos mecanismos de enlace no específico.

La adsorción sobre la superficie sólida es asociada generalmente a una ruptura conformacional importante con un despliegue parcial y una desnaturalización de la proteína concernida. La pérdida concomitante de la actividad de la proteína desvaloriza la utilidad global del proceso. Comúnmente, por ejemplo, la adsorción de anticuerpos sobre una superficie hidrofóbica es asociada a la pérdida de más del 95% de la actividad de enlace específico. Si los fragmentos de anticuerpo más pequeños son implicados, la cantidad de afinidad de enlace específico retenida con respecto a la adsorción sobre una superficie sólida puede ser incluso inferior tal y como se ha descrito en Molina-Bolivar *et al*, J. Biomaterials Science-Polymer Edition, 9, 1103-1113, 1998).

Se han considerado alternativas o mejoras para el método de adsorción de proteínas en la preparación de superficies proteicas inmovilizadas.

Un procedimiento alternativo consiste en usar un enlace reticulado químico de residuos en la proteína para el enlace covalente a una superficie sólida activada mediante el uso de productos químicos de acoplamiento convencionales por ejemplo tal y como está descrito en Bioconjugate Techniques, G.T. Hermanson, ed. Academic Press, Inc., San Diego, CA, USA. Los residuos de aminoácidos que incorporan grupos sulfhidrilo, como la cisteína, pueden ser ligados de manera covalente mediante el uso de un reactivo biespecífico como por ejemplo el succinimidil-maleimidofenilbutirato (SMPB). Alternativamente, los grupos lisina localizados en la superficie de la proteína pueden ser acoplados a grupos carboxilo activados en la superficie sólida por acoplamiento de carbodiimida convencional mediante el uso de 1,etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS). Una desventaja de este procedimiento es que los residuos de reticulación en la proteína puede interferir en la funcionalidad de la proteína.

Suministrando a la proteína con una extensión de cola peptídica comprendiendo residuos reticulables, el acoplamiento de la proteína en la superficie puede ser realizado usando agentes de reticulación químicos convencionales en un sitio alejado del cuerpo principal de la proteína. De esta manera, el propio proceso de acoplamiento covalente tiene menos posibilidad de interferir en la funcionalidad de la proteína.

EP 0434317 (Joseph Crosfield & Sons) expone el uso de medios de purificación de afinidad mejorada que emplean agentes pequeños de enlace específico, especialmente fragmentos de anticuerpos Fv. Opcionalmente éstos tienen una cola hidrofóbica, siendo el residuo "Myc" de la secuencia de aminoácidos el grupo de enlace particularmente preferido. Aunque este tipo de grupo es destinado principalmente a facilitar la inmovilización del agente aglutinante mediante un enlace no covalente sobre una superficie hidrofóbica, se menciona de pasada en la especificación que, debido al hecho de que el grupo myc contiene un residuo de lisina, también podría ser usado para un enlace covalente sobre superficies.

WO 91/08482 expone que pequeñas moléculas de enlace específico, como los anticuerpos de dominio variable único (Dabs) y fragmentos Fv, pueden unirse a superficies sólidas plásticas o a trazadores como las enzimas mediante enlaces que incluyan polipeptidos comprendiendo de 5 a 20 aminoácidos y que son hidrofóbicos y/o contienen al menos un residuo de lisina.

US-4894443 describe polipeptidos de fórmula general (F-(Pro)n)mF, donde F representa una secuencia de aminoácidos flexible donde cada aminoácido es seleccionado individualmente del grupo compuesto por serina, glicina, y treonina, y n es un número entero de 4-8 inclusive y m es un número entero de 1-4 inclusive. Los polipeptidos son aquellos usados en la construcción de conjugados entre anticuerpos y toxinas peptídicas.

Se han usado colas pépticas alternativas que incorporan residuos de histidina para unir proteínas a superficies de ácido nitrilotriacético (NTA, fabricado por QIAGEN GmbH) a través de la coordinación de níquel. No obstante, este tipo de interacciones son no covalentes.

5 Sigue habiendo una continua demanda de mejorar la eficacia de la reacción de acoplamiento, y en particular el hecho de solucionar los problemas que surgen de la necesidad de asegurar que la proteína es llevada a asociarse con la superficie antes de una reacción de acoplamiento covalente. En caso de acoplamiento de una proteína a una superficie cargada negativamente, como una superficie de dextrano activado con carboximetilo, por ejemplo, la reacción de acoplamiento debe ser realizada con un pH bajo para asegurarse de que la proteína sea cargada positivamente para que se produzca este tipo de asociación. Como muchas proteínas son sensibles al ácido, estas condiciones pueden perjudicar la actividad específica de la proteína reticulada. No sólo puede ser ventajoso aumentar la cantidad de proteína acoplada a la superficie sino también aumentar la proporción de la proteína acoplada que retenga su actividad específica mediante una minimización de la posibilidad de interacciones de conexiones no específicas obtenidas a partir del despliegue proteico según las condiciones de acoplamiento.

15

### Resumen de la invención

En un aspecto, la invención provee un material como se define en la reivindicación I anexa.

20

En otro aspecto, la invención provee un método como se define en la reivindicación II anexa.

También se provee el uso de un material de la invención, como se define en la reivindicación 8 anexa.

25

La presente invención puede ser mejor entendida en referencia a la descripción siguiente, leída junto con los dibujos anexos.

### Breve descripción de los dibujos

30

La figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos de tres pares de oligonucleótidos en superposición complementarios usados para el ensamblaje de anticuerpos VHH con colas pépticas. La traslación de la secuencia péptica está indicada más abajo.

35

La figura 2(a) muestra un diagrama que muestra un casete comprendiendo una secuencia de codificación VHH anti-hCG que está insertada en pUC19 para producir un vector intermedio (Vector A). Este vector contiene un sitio *Xho I* cerca de la extremidad 3' de la secuencia de ADN de codificación de VHH, usada para ligar los oligonucleótidos sometidos a hibridación de codificación de las secuencias de cola al VHH, y un sitio *Mun I* para ligar los oligonucleótidos sometidos a hibridación al eje central del vector.

40

La figura 2(b) muestra un diagrama que muestra un casete que comprende la secuencia de codificación de VHH que está insertada en pUC19 para producir la construcción intermedia (Vector B). Este casete de vector intermedio contiene un sitio *Xho I* en la extremidad 5' de la secuencia de ADN de codificación de VHH, que está en el marco de lectura correcto para una clonación en el vector de expresión *Pichia Pastoris* pIC9.

45

La figura 3 muestra de forma esquemática el casete del vector intermedio obtenido por ligadura de las secuencias de cola a la extremidad 3' de la secuencia de codificación de VHH en el Vector A.

50

La figura 4 muestra de forma esquemática la estructura de los casetes comprendiendo las secuencias de codificación de la cola de VHH ensambladas que son insertadas en el vector pPIC9 para producir las construcciones usadas para una expresión en *Pichia Pastoris*.

55

La figura 5 muestra una representación esquemática de la estructura en horquilla de la cola EKP propuesta.

60

La figura 6 muestra la dependencia del pH de la cantidad proteica de la cola de VHH en asociación con una superficie carboximetilada detectada mediante una resonancia plasmónica de superficie.

65

### Descripción detallada de la invención

60

La invención se basa en el descubrimiento de que la eficiencia de acoplamiento covalente de una proteína a una superficie sólida puede ser mejorada mediante el suministro a la proteína de un segmento polipéptido que tenga uno o más sitios para un enlace covalente que sea capaz de adoptar una estructura plegada separada de la estructura plegada del resto de la proteína.

65

Por "plegada" se indica una estructura tridimensional bien definida que es mantenida unida por fuerzas no covalentes.

Sin desear estar vinculados por la teoría, se considera que al incorporar en la proteína un segmento polipéptido con uno o más sitios para un enlace covalente en una estructura ordenada localmente y separada de la estructura plegada de la proteína, se facilita la presentación de sitios de acoplamiento covalentes en el segmento para grupos reticulables

adecuados sobre la superficie sólida en una orientación apropiada para que el acoplamiento se realice. Esto conduce a una mayor probabilidad de acoplamiento proteico a una superficie, lo cual ocurre a través del segmento polipéptido ordenado localmente que no está implicado en la unión proteica, y por lo tanto a una mayor eficacia de acoplamiento.

5 Al mejorar la asociación intrínseca (o “preconcentración”) de proteína con la superficie antes de que el acoplamiento se realice, de manera ventajosa la invención ofrece la posibilidad de realizar la reacción de acoplamiento covalente en condiciones menos susceptibles de causar cualquier daño irreversible con respecto a la funcionalidad de la proteína obtenida a partir de la desnaturalización. De esta manera, las interacciones de unión no específicas pueden ser minimizadas ya que el despliegue de proteína se reduce de manera que aumente la proporción de proteína acoplada  
10 reteniendo su actividad, reduciendo la cantidad de material necesario para producir una superficie activa.

Como se muestra en los ejemplos más abajo, mediante la invención es posible aumentar el pH con el que se produce el acoplamiento de una proteína a una superficie cargada negativamente, reduciendo así la probabilidad de que la función proteica sea influida de manera inversa por las condiciones de acoplamiento utilizadas y aumentando así  
15 la eficacia del acoplamiento. Esto representa una ventaja importante para el método de la invención con respecto a los métodos de acoplamiento de proteínas a superficies sólidas mediadas por colas que no pueden adoptar una estructura plegada estable, como la cola myc.

La invención es aplicable a las proteínas en general y no se limita a ningún agrupamiento particular. Algunos  
20 ejemplos de proteínas adecuadas incluyen anticuerpos o fragmentos inmunológicamente activos de éstos, receptores o fragmentos de conexión de éstos, lectinas y enzimas.

Se apreciará el hecho de que una superficie sólida puede tener más de una proteína diferente inmovilizada sobre ésta de acuerdo con la presente invención. Estas puede ser distribuidas también sobre la superficie o inmovilizadas en  
25 una o más regiones diferentes.

Según una forma de realización importante de la invención, los anticuerpos o fragmentos inmunológicamente activos de éstos pueden ser inmovilizados en una superficie sólida para preparar materiales inmuoactivos mejorados usados en procedimientos de reconocimiento inmunológico tales como técnicas de inmunoafinidad.  
30

De forma adecuada, el anticuerpo es una inmunoglobulina que puede provenir de fuentes naturales, o ser producida sintéticamente. Los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” son usados como sinónimos a lo largo de la especificación a menos que se indique lo contrario. Un fragmento de anticuerpo inmunológicamente activo es una parte de anticuerpo entero que conserva la capacidad de exhibir una actividad de enlace de antígenos. El sitio de enlace  
35 de antígenos puede ser formado a través de la asociación de dominios variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo y o puede comprender dominios variables de anticuerpos individuales. Los fragmentos adecuados incluyen un fragmento Fab, conteniendo ambos sitios de enlace de un anticuerpo conectados juntos, un fragmento Fv (que comprende los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo asociados los unos con los otros) o una única cadena de fragmento Fv (donde las dos cadenas pesadas y ligeras están presentes como parte de una proteína de fusión).  
40

Según una forma de realización particular de la invención, la proteína es una inmunoglobulina naturalmente desprovista de cadenas ligeras (indicada a continuación como inmunoglobulina de cadena pesada), incluso más particularmente un dominio variable de cadena pesada de una inmunoglobulina naturalmente desprovista de cadenas ligeras  
45 puede ser obtenida a partir de Camélidos tal y como está descrito en WO 94/04678 (Casterman *et al*), o una proteína funcionalmente equivalente a ésta. Una ventaja del uso de inmunoglobulinas o dominios variables de cadena pesada de Camélidos es que pueden ser producidos a gran escala fácil y convenientemente desde un punto de vista económico, por ejemplo, mediante el uso de un huésped eucariótico inferior transformado como se describe en WO 94/25591.

Con una inmunoglobulina de cadena pesada, la capacidad y especificidad de enlace de antígenos se localiza natural y exclusivamente en las cadenas pesadas de inmunoglobulina, más específicamente en los dominios variables de cadena pesada. Lo que significa que el dominio variable de cadena pesada forma el sitio de enlace de antígeno completo. Por funcionalmente equivalente se entiende cualquier proteína o fragmento o derivado de éstos que tenga propiedades aglutinantes de antígeno iguales o similares localizadas en un único dominio de unión. Se apreciará el hecho de que  
55 las inmunoglobulinas o fragmentos o derivados de éstos modificados para que puedan funcionar en forma de dominios de conexión de la misma manera que las inmunoglobulinas de cadena pesada de Camélidos (ver Davies *et al*, Bio Technology, 13, 475-479, (1995)), pueden de manera adecuada también ser utilizados según la invención.

El segmento polipéptido según la invención puede ser introducido por mutación o inserción en la secuencia de  
60 proteína o preferiblemente puede ser añadida en forma de cola a cada, o a los dos terminales proteicos N- o C-.

El segmento polipéptido y la proteína a la que está ligado pueden ser producidos de manera adecuada juntos mediante una expresión en forma de una única proteína fundida en un organismo modificado genéticamente de manera que la proteína y el segmento sean enlazados a través de una(s) conexión(es) péptida(s). De forma alternativa, la proteína y segmento pueden ser producidos separadamente y unidos mediante una conjugación química, en tal caso, en general la conexión entre el segmento y la proteína no será una conexión péptida y el segmento tampoco estará necesariamente ligado a una extremidad de la proteína.  
65

## ES 2 275 563 T3

El segmento polipéptido según la invención comprende 3 a 30 residuos aminoácidos, preferiblemente 5 a 20 residuos aminoácidos.

5 El segmento polipéptido contiene al menos uno, más preferiblemente una pluralidad de residuos reticulables para un enlace covalente a una superficie sólida. Se apreciará el hecho de que el número de estos residuos reticulables sólo es limitado por el requisito de que la secuencia debe permanecer capaz de formar una estructura plegada. De manera adecuada, el segmento polipéptido comprende 2 a 15 residuos reticulables para un enlace covalente. Los residuos reactivos reticulables adecuados incluyen residuos de cisteína y/o lisina. Mediante el suministro del segmento polipéptido con una pluralidad de tales residuos, la probabilidad de acoplamiento realizado a través de este segmento  
10 aumenta. Esto tiene como efecto el aumento de eficacia del acoplamiento, y la minimización del acoplamiento a través de los residuos en otro lugar sobre la proteína, lo cual puede perjudicar la actividad de la proteína reticulada.

Los expertos en la técnica deducirán fácilmente las características de la secuencia que pueden de manera adecuada ser incorporadas en el segmento polipéptido para proporcionar la propensión necesaria para formar una estructura plegada según los objetivos de la invención.  
15

Se apreciará el hecho de que no es necesario para la operación de la invención que la totalidad del segmento polipéptido forme una estructura plegada, a condición de que al menos una parte de ésta, más particularmente una parte comprendiendo residuos reticulables puedan formar una estructura plegada local. De manera adecuada, el segmento polipéptido contiene una cola o terminal de separación además de la parte que forma la estructura plegada de manera que la estructura plegada localmente sea mantenida separada de la estructura plegada de la proteína en la que es introducida.  
20

Las características de secuencia promueven la formación de conformación helicoidal o en forma de bucle. La presencia de una estructura plegada puede ser detectada convenientemente usando técnicas convencionales como una espectroscopia nuclear magnética razonable.  
25

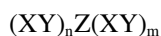
En una forma de realización, el segmento polipéptido para usar según la invención comprende preferiblemente uno o más residuos de prolina.  
30

Sin desear estar vinculados por la teoría, en general se piensa que la incorporación de un residuo de prolina en la secuencia aminoácida del segmento polipéptido ayuda a la formación de una configuración estructural en forma de bucle beta, con el eje central peptídico cambiando de dirección alrededor del residuo de prolina.

35 El segmento polipéptido comprende al menos uno, preferiblemente una pluralidad de pares de residuos aminoácidos de carga opuesta capaces de alinearse el uno contra el otro en una estructura plegada.

Mediante la incorporación de aminoácidos de carga opuesta en la secuencia del segmento polipéptido en una distribución tal, que la formación de una estructura plegada posicione estos últimos en una configuración electroestática favorable, se puede mejorar la estabilidad de la estructura plegada. El segmento comprende dos o más regiones de residuos aminoácidos de carga opuesta alternos entre sí. Preferiblemente, las regiones de residuos aminoácidos alternos de carga opuesta son separadas por una secuencia que favorece la formación de un bucle inverso compatible con un par de cargas opuestas, especialmente por una secuencia comprendiendo uno o más residuos de prolina.  
40

45 Los segmentos polipéptidos para usar según la invención comprenden una secuencia aminoácida de fórmula:



50 donde X e Y son aminoácidos de carga opuesta, n y m son iguales o diferentes y representan un número entero de 2 a 15, y Z es una región de secuencia péptida capaz de formar un bucle comprendiendo una conformación helicoidal  $\alpha$  o de bucle  $\beta$ .

Los segmentos polipéptidos particularmente preferidos comprenden una secuencia aminoácida seleccionada de:

55 EHHHHHRSEKEKKPKEKEK (SEC. ID. No. 1)

EHHHHHRSGKGKPKGK (SEC. ID. No. 2)

60 indicada a continuación como los segmentos EKP y GKP respectivamente.

Se apreciará el hecho de que la parte de las secuencias comprendiendo los aminoácidos EHHHHHRSS corresponde a un terminal poli-His; su presencia no es esencial para la invención y esta parte de secuencia puede ser sustituida por otro terminal convencional o ser eliminada.  
65

Como se muestra en la figura 5, el segmento que posee una secuencia aminoácida tal como se expone en la SEC. ID. No. 1 anterior (indicada a continuación como el segmento EKP) está previsto para adoptar una configuración estructural en forma de horquilla, donde el bucle en el eje central peptídico facilitado por la presencia del residuo

de prolina en la secuencia es estabilizado por la interacción electroestática de los pares de residuos aminoácidos de carga opuesta. Este segmento, especialmente cuando es añadido en forma de cola en una o ambas extremidades de la proteína, representa una forma de realización particularmente preferida de la invención.

5 Como se muestra en los ejemplos más abajo, el suministro de una proteína con una cola polipeptídica capaz de adoptar una estructura plegada no sólo permite acoplar más proteínas a una superficie sólida sino que este acoplamiento puede ser efectuado en condiciones que tengan menos posibilidades de producir una desnaturalización de la proteína y por lo tanto menos probabilidades de afectar adversamente la funcionalidad de la proteína, llevando a una mayor eficacia de acoplamiento.

10 Los experimentos para estudiar el acoplamiento o las proteínas provistas o bien con las colas EKP o GKP según el modo descrito anteriormente o con una cola de control sin características de secuencia de introducción de características estructurales (con la secuencia aminoácida EHHHHHHRSGKGKKGKKGK, indicada a continuación como una cola GKG) a una superficie de dextrano activado con carboximetilo han revelado que, de forma demostrable, se pueden acoplar más proteínas a la superficie sólida cuando se emplea una cola estructurada, el orden de aumento en cantidad refleja una organización estructural en aumento de la cola (GKG < GKP < EKP). Además, usando la cola EKP para acoplar un fragmento VHH anti-hCG a una superficie de dextrano de carboximetilo, se ha demostrado que es posible obtener un rendimiento aceptable de proteína inmovilizada, mientras se aumenta la proporción que mantiene su funcionalidad, mediante la reacción de acoplamiento en condiciones menos  
20 ácidas.

La superficie sólida en la que la proteína es inmovilizada según la invención puede ser proporcionada por una variedad de materiales. De manera adecuada, la superficie sólida es cualquier material portador de fase sólida usado de forma convencional en proteínas de inmovilización. Los ejemplos incluyen poliestireno u otro plástico tal como el polipropileno o cloruro de polivinilo, celulosas, dextranos, polímeros y copolímeros sintéticos, látex, sílices, tejidos, metales como oro, plata y platino, carbono, vidrio. De manera adecuada, estos materiales pueden ser partículas, como perlas poliméricas o gránulos para columnas, o presentarse en forma de lámina, por ejemplo membranas o filtros, portabjtos de vidrio o plástico, placas de ensayo de microtitulación, varillas, dispositivos de relleno capilar o similares. De manera alternativa, la superficie sólida puede comprender parte de un biosensor dependiente de masa tal como un sensor de tipo onda evanescente, por ejemplo un detector de resonancia plasmónica superficial como el que se puede obtener en Biacore AB, Stevenage, Reino Unido.

Se apreciará el hecho de que se debe poder acoplar de manera covalente una superficie sólida al segmento polipeptídico según el uso de la invención. La superficie sólida puede comprender residuos reticulables naturalmente adecuados para un enlace covalente al segmento o pueden ser revestidos o derivatizados para introducir grupos reticulables adecuados según los métodos bien conocidos en la técnica.

Los materiales preparados según la invención pueden ser usados en cualquier proceso en los que sea útil enlazar una molécula a una proteína inmovilizada. Las aplicaciones adecuadas resultarán evidentes al experto en la materia; éstas pueden incluir probar la presencia de un asociado por enlace, por ejemplo, usando una pluralidad de proteínas ligadas a una superficie sólida según la presente invención en una estructura proteínica, o en un ensayo o purificación de una muestra de prueba. Si la proteína es un anticuerpo o un fragmento de éste inmunológicamente activo, los materiales inmovilizados pueden ser utilizados en procesos de inmunoabsorción como los inmunoensayos, por ejemplo un procedimiento de inmunoensayo específico enlazado por enzima (ELISA), o procesos de purificación de inmunoafinidad mediante la puesta en contacto de un material según la invención con una muestra de prueba según los métodos estándares convencionales en la técnica.

Se apreciará el hecho de que la invención puede ser aplicada a otras proteínas que no sean las derivadas de anticuerpos y similares. Por ejemplo, algunas enzimas pueden ser acopladas a superficies usadas en la clarificación de zumos. Otras aplicaciones de proteínas inmovilizadas que pueden ser aplicadas son descritas en Protein Immobilisation, pp. 2-9, R.F. Taylor ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1991.

De manera conveniente, la invención puede ser empleada en kits de prueba diagnóstica.

55 Los ejemplos siguientes son provistos únicamente como ilustración. Las técnicas usadas para la manipulación y análisis de materiales de ácido nucleico fueron realizadas tal y como se describe en Sambrook *et al*, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York, 2nd Ed., (1989), a menos que se indique lo contrario.

VHH define un dominio variable de cadena pesada de una inmunoglobulina de cadena pesada.

## 60 Ejemplos

### *Construcción de fragmentos de anticuerpo de cola*

65 Se sometieron a hibridación oligonucleótidos de superposición complementarios (figura 1) y se usaron para añadir ADN codificante de cola peptídica a un VHH anti hCG (clon número HI15) aislado de una llama inmunizada como se describe en WO 94/25591 según las fases siguientes:

## ES 2 275 563 T3

(I) El ADN codificante de VHH fue aislado del vector de visualización de fago (pHEN) por digestión de restricción, usando las enzimas *Pst I/Bst EII*, y fue clonado en dos vectores intermedios pUC 19 (A y B), modificados para permitir otra manipulación por medio de técnicas biológicas moleculares estándares (figura 2a y b).

(II) 2  $\mu\text{g}$  de cada par de oligonucleótidos superpuestos (figura 1) fueron mezclados en un volumen de 50  $\mu\text{l}$ , calentados durante 5 minutos a 98°C y posteriormente enfriados en hielo para ser sometidos por hibridación. Los pares de cebado de los oligonucleótidos fueron: SW26 y SW27 (usados para el ensamblaje de la secuencia de cola GKG, una secuencia de control sin organización estructural), SW28 y SW29 (secuencia de cola GKP) y SW30 y SW31 (secuencia de cola EKP). Un vector intermedio (A) fue aislado y digerido con enzimas *Xho I* y *Mun I*. Un vector y pares de cebado sometidos a hibridación fueron ligados, introduciendo el ADN codificante de cola peptídica (figura 3).

(III) Las fusiones de ADN de cola de VHH fueron introducidas en el vector de expresión *Pichia Pastoris* pPIC 9 en forma de ligaduras de tres puntos (una para cada formato de cola). Los clones del vector A, comprendiendo ADN de VHH insertado correctamente, fueron digeridos con *Bst EII* y *Eco RI* (se recogieron insertos de ADN de cola). El vector B, (figura 2b) fue digerido con *Xho Bst EII* (El inserto VHH fue recogido). El ADN del vector pPIC 9 fue digerido con *Xho I/Eco RI* (eje principal del vector recogido). El inserto, el vector y las colas fueron ligados y transformados en la cepa *E. coli* XL1-b usando técnicas biológicas moleculares estándares, creando los constructos finales.

(IV) el ADN comprendiendo los constructos finales fue aislado de los cultivos inoculados durante toda la noche con colonias individuales tomadas de transformaciones dispuestas en placas, usando un kit plásmido Qia-gen midiprep según las instrucciones de los fabricantes. Se verificó que los constructos estuvieran correctamente ensamblados mediante un análisis de secuencia de ADN automatizado. 5  $\mu\text{g}$  de cada constructo fueron digeridos con la enzima de restricción *Bgl II*, seguido de una extracción con fenol, extracción con cloroformo y precipitación con etanol. El ADN granulado fue lavado dos veces con 70% de etanol (para eliminar las sales), secado al aire y resuspendido en 5  $\mu\text{l}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$ . El vector pPIC 9 digerido con *Bgl II*, conteniendo el ADN de VHH modificado, fue transformado en una cepa *Pichia Pastoris* GS115 según el método de la etapa (V).

(V) Las células fueron cultivadas durante toda la noche a 30°C, en un medio de 500 ml de YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 1% de glucosa) para un  $\text{OD}_{600}$  de 1.4. Las células fueron centrifugadas (3 min. 2.5 Kg) y el granulado fue lavado con agua destilada estéril antes de una resuspensión en 100 ml de tampón KDTT (50 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.5 más 25 mM de ditioneitol). Después de 15 min. de incubación a 37°C, las células fueron granuladas como se describió anteriormente y resuspendidas en 100 ml de tampón STM helado (10 mM Tris. Cl pH 7.5 más 1 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 92.4 g de glucosa por litro). Después de 5 lavados con este tampón, el granulado celular fue resuspendido en un volumen final de 3 ml de tampón STM. El ADN digerido (en un volumen de 5  $\mu\text{l}$ ) fue mezclado con 70  $\mu\text{l}$  de células competentes sobre hielo. Las células fueron sometidas a una electroporación en una cubeta de 0.2 cm a 1.5 kV, 400  $\Omega$ , 25  $\mu\text{F}$  en un BioRad Gen-Pulser. Inmediatamente después de la electroporación, un medio de 1 ml de YPD fue añadido a las células. Después de la recuperación durante 1 hora a 37°C, las células fueron dispuestas en placas sobre placas de 3 X MD. Las colonias formadas mediante células transformadas (His+) fueron visibles en un periodo de 48 horas de incubación a 30°C.

### Expresión y purificación de fragmentos de anticuerpos

Los VHHs Anti hCG comprendiendo colas peptídicas fueron expresados en *Pichia Pastoris* según el método siguiente.

Las colonias de *P. Pastoris* transformadas recientemente fueron depositadas en placas por réplicas sobre placas MD y MM tal como se describe en el manual de usuarios del kit de expresión *Pichia* Invitrogen (versión B). Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 30°C, en cuyo punto fueron seleccionados los clones mut-s (visualizados por la presencia de una colonia mucho más pequeña de crecimiento en placas MM). 6-12 colonias de cada tipo de VHH fueron “picados” de las placas MD (correspondiendo a las colonias mut-s identificadas de las placas MM) y usadas para inocular 10 ml de medio BMGY. Los cultivos de 10 ml fueron incubados a 30°C durante 20 horas y posteriormente granulados por centrifugado. Se utilizó 2 ml de BMMY para reemplazar los medios para cada cultivo, y éstos fueron posteriormente incubados durante otras 20 horas. 10  $\mu\text{l}$  de metanol (100%) fueron añadidos y los cultivos fueron incubados durante unas últimas 24 horas antes de ser granulados de nuevo.

Los sobrenadantes de expresión fueron sometidos a una prueba para la producción de VHH usando un Chip sensor NTA (para enlazar los terminales His6 que forman parte de cada tipo de cola de VHH) en un instrumento Biacore 2000. Cada sobrenadante fue diluido 1/50 en tampón HBS con un contenido de 50 pM de EDTA. 15  $\mu\text{l}$  de muestra diluida fue pasada sobre la superficie (después de cebar primero la superficie con 15  $\mu\text{l}$  de 0.5 mM  $\text{Ni}_2\text{SO}_4$ ). Tras la adición de la muestra, las superficies del sensor se regeneraron mediante el uso de 15  $\mu\text{l}$  de 0.35 M EDTA. El nivel de flujo era de 15  $\mu\text{l}/\text{min}$  en todas partes. Las colonias aisladas de generación de sobrenadantes de expresión con los niveles de producción máximos fueron recultivadas durante toda la noche en BMGY, y almacenadas en 15% de glicerol a -70°C hasta ser necesarias.

## ES 2 275 563 T3

La expresión del frasco de agitación a gran escala se efectuó tal y como se describe en el Manual de Usuarios de Invitrogen *Pichia*, usando frascos de agitación de 2 L disipados, con un volumen líquido de 0.5 L. Cuarenta y ocho horas después de la inducción, los cultivos fueron recogidos por centrifugado a 18,112 g (durante 1 hora a 4°C) y los sobrenadantes fueron posteriormente filtrados mediante unidades de filtro Nalgene de 0.45 µm.

Se realizó la purificación de los VHHs usando una resina Superflow Ni-NTA comercialmente disponible (Qiagen corp.), con una capacidad de 5 - 10 mg de 6x proteína de terminación His por ml de resina. Antes del inicio, se determinó el pH de la carga (sobrenadante de expresión) a 6 o más para asegurar una interacción de alta afinidad entre los VHH de terminación His6 y la resina.

10-20 ml de resina fueron dispuestos en columnas de cromatografía, las cuales fueron lavadas con 5 volúmenes de estrato de tampón de lavado (por ejemplo PBSA o 10 mM de tampón de fosfato potásico pH 6). Ésta y todas las etapas posteriores fueron realizadas con un caudal de 2 mL/min.

Los sobrenadantes fueron cargados sobre la columna y posteriormente lavados con aproximadamente 10 volúmenes de columna de tampón de lavado, 5 volúmenes de columna de 1 M de NaCl, y después de nuevo con un tampón de lavado hasta que la densidad óptica a 280 nm alcanzó la línea de base. La elución de VHH se efectuó a través de un gradiente lineal de 0-0.5 M de imidazol sobre 10 volúmenes de columna seguido de un desalado mediante una columna de desalación G25 con 200 ml de sefadex. La pureza de los VHH aislados usando esta metodología fue estimada en 99% o más.

### *Interacción de fragmentos de anticuerpo de cola con dextrano de carboximetilo*

Un chip sensor CM5 (Biacore AB, Suecia) fue introducido en un biosensor Biacore 2000 (Biacore AB, Suecia) y se realizó un experimento como se indica a continuación:

Se estableció el caudal a 10 µl/min y 20 µl de VHH115EKP (formados en 10 mM de citrato sódico pH 4.0) fueron inyectados a través de la superficie del sensor. Esto se repitió usando VHH115EKP formado en un tampón de citrato sódico de pH 4.0, 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.1, 5.4, 5.8 y 6.0. Se determinó la cantidad de proteína en interacción con la superficie del sensor durante la inyección.

Se realizó otro experimento después donde las inyecciones de VHH115GKP (20 µl formados en 10 mM de Tris pH 5.8, 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4 y 7.6) e inyecciones de VHH115GKG (20 µl formados en 10 mM de Tris pH 5.8, 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4 y 7.6) se formaron a través de una superficie del biosensor CM5.

La cantidad de fragmento de anticuerpo asociada a la superficie del chip fue representada en gráficos a diferentes pH y puede ser visualizada en la figura 6. Los datos mostrados con las líneas continuas representan las muestras formadas en el tampón de citrato sódico, mientras que los datos mostrados con las líneas discontinuas representan las muestras formadas en el tampón Tris.

El fragmento de anticuerpo VHH115EKP asociado con la superficie de sensor CM5 tuvo una extensión superior a pH más elevado que cualquiera de los otros dos fragmentos. Esto se debe al pI reducido de esta proteína producida por la introducción de residuos de ácido glutámico en la cola peptídica.

### *Fragmentos de anticuerpo de cola de acoplamiento a dextrano de carboximetilo*

Los fragmentos de anticuerpo VHH115EKP, VHH115GKP y VHH115GKG fueron acoplados de manera covalente a una superficie del sensor CM5 como se indica a continuación:

Un nuevo chip sensor CM5 fue introducido en el Biacore y se obtuvo un sensograma como se indica a continuación. El paso de flujo fue establecido en 1-2-3-4 y el caudal de HBS establecido en 10 µl/min. El paso de flujo se modificó en flujo sólo a través de una célula de flujo 1 y el VHH115EKP fue acoplado usando un kit de acoplamiento de amina según lo descrito por los fabricantes. En resumen, 40 µl de una mezcla de éster N-hidroxisuccinimida (NHS) y carboimida de etilendiamina (EDC) fue inyectada rápidamente a través de una célula de flujo 1 para activar la superficie del sensor. Esto fue seguido de una inyección rápida de 20 µl de VHH115EKP diluido a 1 en 50 en 10 mM de tampón de citrato sódico de pH 5.4. La superficie del sensor fue bloqueada por una inyección rápida de 40 µl de etanolamina (1 M) a través de célula de flujo 1. El paso de flujo se modificó posteriormente para fluir sólo a través de una célula de flujo 2 y el VHH115GKP fue acoplado en amina. En resumen, 40 µl de una mezcla de NHS/EDC fueron inyectados rápidamente a través de una célula de flujo 2 para activar la superficie del sensor. Esto fue seguido de una inyección rápida de 20 µl de VHH115GKP diluido en 1 en 50 en 10 mM de tampón de citrato sódico de pH 4.0. La superficie del sensor fue bloqueada por una inyección rápida de 40 µl de etanolamina (1 M) a través de una célula de flujo 2. El paso de flujo fue posteriormente modificado para fluir sólo a través de una célula de flujo 3 y el VHH115GKG fue acoplado en amina. En resumen, 40 µl de una mezcla de EDC fueron inyectados a través de una célula de flujo 3 para activar la superficie del sensor. Esto fue seguido de una inyección rápida de 20 µl de VHH115GKG diluido a 1 en 50 en 10 mM de tampón de citrato sódico de pH 4.7. La superficie del sensor fue bloqueada por una inyección rápida de 40 µl de etanolamina (1 M) a través de una célula de flujo 3.

## ES 2 275 563 T3

El pH de acoplamiento particular para cada fragmento fue escogido de modo que a estos pH, todos los fragmentos sean asociados con la superficie CM5 en la misma medida (ver figura 6). La cantidad de fragmento acoplado a las numerosas células de flujo es mostrada en la Tabla 1 más abajo. Como se puede ver en los resultados presentados en la Tabla 1, se acopla una cantidad mayor de proteína cuando se usa una cola estructurada.

TABLA 1

Fragmento	Cantidad acoplada (unidades de respuesta)
VHH115EKP	513.2
VHH115GKP	258.3
VHH115GKG	223.5

En este experimento, los pH de acoplamiento individuales seleccionados fueron tales que la extensión de asociación no covalente anterior a la reacción de acoplamiento fuera la misma para las tres proteínas. El descubrimiento de que la cantidad de proteína acoplada no es la misma en los tres casos indica por lo tanto que la eficacia de reticulación no depende únicamente de la cantidad de proteína asociada de forma no covalente a la superficie. Los resultados obtenidos demuestran la influencia de la estructura de cola y del pH sobre la eficacia de acoplamiento, la cantidad de proteína acoplada en aumento en un orden reflejando el aumento en una organización estructural de la cola (GKG < GKP < EKP).

### *Acoplamiento de fragmento de cola VHH115EKP a un dextrano de carboximetilo a varios pH*

Un nuevo chip sensor CM5 (chip 2) fue introducido en el Biacore y se produjo un sensograma. El paso de flujo fue establecido a 1-2-3-4 y el caudal de HBS establecido a 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ . El paso de flujo se modificó en flujo sólo a través de una célula de flujo 1 y el VHH115EKP fue acoplado usando un kit de acoplamiento de amina tal y como está descrito por los fabricantes. En resumen, 40  $\mu\text{l}$  de una mezcla de NHS/EDC fueron inyectados rápidamente a través de una célula de flujo 1 para activar la superficie del sensor. Esto fue seguido de una inyección rápida de 20  $\mu\text{l}$  de VHH115EKP diluido en 1 en 50 en 10 mM de tampón de citrato sódico de pH 4.0. La superficie del sensor fue bloqueada por una inyección rápida de 40  $\mu\text{l}$  de etanolamina (1 M) a través de la célula de flujo 1. El paso de flujo se modificó después en flujo sólo a través de la célula de flujo 2 y el VHH115EKP fue acoplado en amina por una inyección rápida de 40  $\mu\text{l}$  de una mezcla de NHS/EDC a través de una célula de flujo 2 para activar la superficie del sensor. Esto fue seguido de una inyección rápida de 20  $\mu\text{l}$  de VHH115EKP diluido en 1 en 50 en 10 mM de tampón de citrato sódico de pH 4.6. La superficie del sensor fue bloqueada por una inyección rápida de 40  $\mu\text{l}$  de etanolamina (1 M) a través de la célula de flujo 2. La trayectoria del flujo fue posteriormente modificada en flujo sólo a través de la célula de flujo 3 y el VHH11 SEKP fue acoplado en amina. En resumen, 40  $\mu\text{l}$  de una mezcla de EDC fueron inyectados a través de la célula de flujo 3 para activar la superficie del sensor. Esto fue seguido por una inyección rápida de 20  $\mu\text{l}$  de VHH115EKP diluido en 1 en 50 en 10 mM de tampón de citrato sódico de pH 5.1. La superficie del sensor fue bloqueada por una inyección rápida de 40  $\mu\text{l}$  de etanolamina (1 M) a través de la célula de flujo 3.

Las cantidades de VHH115EKP acoplado según los diferentes pH aparecen en la Tabla 2.

TABLA 2

pH de acoplamiento de VHH115EKP	Cantidad acoplada (unidades de respuesta)
4.0	554.0
4.6	425.3
5.1	100.6

### *Captura de Coriogonadotropina Humana (hCG) a VHH115EKP acoplado*

El chip sensor (chip 2) fue introducido en el Biacore 2000 y se produjo un sensograma. El paso de flujo fue establecido en un flujo comprendido entre 1-2-3-4 y el caudal se estableció a 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Una muestra de 40  $\mu\text{l}$  de hCG (50 IU/ml) fue inyectada a través de unas células de flujo 1-4. Los rastros de sensograma obtenidos a partir de la inyección fueron superpuestos en el paquete software BIAevaluation (Biacore AB) y los niveles de fondo de la célula de flujo 4 fueron sustraídos de todos los canales de flujo.

## ES 2 275 563 T3

Los rastros superpuestos del enlace hCG a superficies acopladas VHH115EKP aparecen en la figura 9 (línea fina, célula de flujo 3; línea mediana, célula de flujo 2; línea gruesa, célula de flujo 1). La cantidad de hCG enlazado cuando la curva de enlace alcanzaba una meseta aparece en la Tabla 3. La cantidad máxima de hCG prevista para enlazarse con el fragmento acoplado VHH115EKP puede ser determinada por la ecuación siguiente:

$$\text{Enlace máximo} = A * M1/M2$$

Donde A es la cantidad de VHH115EKP acoplado, M1 es el peso molecular de hCG (38000 Da) y M2 es el peso molecular de VHH115EKP (15000 Da).

La cantidad de enlace hCG puede ser expresada en forma de porcentaje de enlace máximo, estos datos aparecen en la Tabla 3.

TABLA 3

pH de acoplamiento de VHH115EKP	hCG enlazado	Enlace máximo	PMB
4.0	567	1403	40
4.6	518	1076	48
5.1	237	253	94

PMB, porcentaje de enlace máximo, donde el peso molecular de hCG y VHH115EKP es 38000 y 15000 Da, respectivamente..

Se puede observar que el pH disminuye, aunque la cantidad de hCG capturado aumente, éste no aumenta con respecto a la cantidad total de proteína reticulada, indicando que una proporción mayor de la proteína reticulada pierde su función cuando el acoplamiento de pH es inferior. Esto demuestra la importancia potencial de ser capaz de conseguir una buena eficacia de acoplamiento con un pH de acoplamiento más alto (más moderado) usando el método de la presente invención.

REIVINDICACIONES

5 1. Material comprendiendo una proteína acoplada de manera covalente a una superficie sólida a través de al menos un segmento polipéptido que tiene uno o más sitios para un enlace covalente, donde el segmento polipéptido consiste en una secuencia de fórmula  $(XY)_nZ(XY)_m$ , donde:

a) Z es una secuencia peptídica capaz de formar un bucle de inversión;

10 b) n y m son el mismo o diferente y representan un número entero de 2 a 15;

c) X e Y son residuos aminoácidos con una carga opuesta;

15 y uno o más pares de residuos aminoácidos de carga opuesta X e Y, separados por Z, son capaces de alinearse los unos con respecto a los otros en una estructura plegada de tal modo que el segmento polipéptido  $(XY)_nZ(XY)_m$  adopte una conformación estructural en forma de horquilla beta.

2. Material según la reivindicación 1 donde Z comprende uno o más residuos de prolina.

20 3. Material según la reivindicación 2 donde el segmento proteico  $(XY)_nZ(XY)_m$  está constituido por la secuencia de aminoácidos EKEKKPKKEKEK.

4. Material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la proteína acoplada de manera covalente a la superficie sólida es un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo de éste.

25 5. Material según la reivindicación 4, donde la proteína es una inmunoglobulina naturalmente desprovista de cadenas ligeras o un fragmento de dominio variable de cadena pesada (VHH) de éste.

30 6. Material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la superficie sólida es seleccionada de poliestireno, polipropileno, cloruro de polivinilo, celulosas, dextranos, polímeros y copolímeros sintéticos, látex, sílice, tejido, metal, carbono y vidrio.

35

40

45

50

55

60

65

Fig.1.

SW26 5' TC GAG CAC CAT CAC CAT CAC CAT CGT TCT GGT AAG GGT AAG  
 SW27 3' C GTG GTA GTG GTA GTG GTA GCA AGA CCA TTC CCA TTC  
 Proteina E H H H H H H R S G K G K

SW26 AAG GGA AAG GGT AAG GGT AAG TAA TAA C 3'  
 SW27 TTC CCT TTC CCA TTC CCA TTC ATT ATT GTT AA 5'  
 Proteina K G K G K G K . . L

SW28 5' TC GAG CAC CAT CAC CAT CAC CAT CGT TCT GGT AAG GGT AAG  
 SW29 3' C GTG GTA GTG GTA GTG GTA GCA AGA CCA TTC CCA TTC  
 Proteina E H H H H H H R S G K G K

SW28 AAG CCA AAG GGT AAG GGT AAG TAA TAA C 3'  
 SW29 TTC GGT TTC CCA TTC CCA TTC ATT ATT GTT AA 5'  
 Proteina K P K G K G K . . L

SW30 5' TC GAG CAC CAT CAC CAT CAC CAT CGT TCT GAG AAG GAG AAG  
 SW31 3' C GTG GTA GTG GTA GTG GTA GCA AGA CTC TTC CTC TTC  
 Proteina E H H H H H H R S E K E K

SW30 AAG CCA AAG GAG AAG GAG AAG TAA TAA C 3'  
 SW31 TTC GGT TTC CTC TTC CTC TTC ATT ATT GTT AA 5'  
 Proteina K P K E K E K . . L

Fig.2(a).

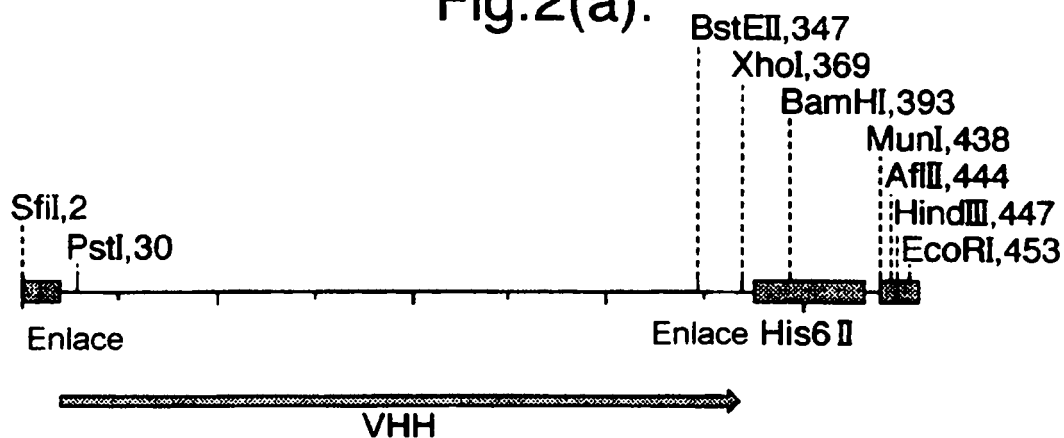


Fig.2(b).

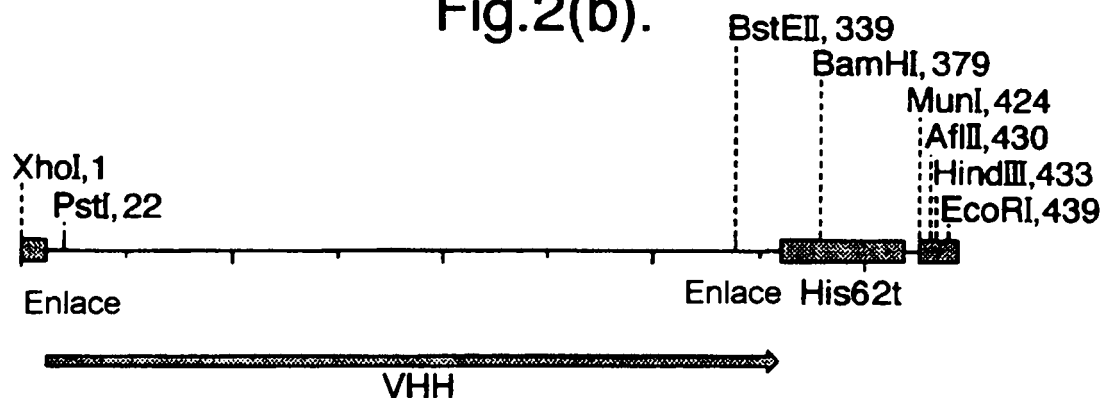


Fig.3.

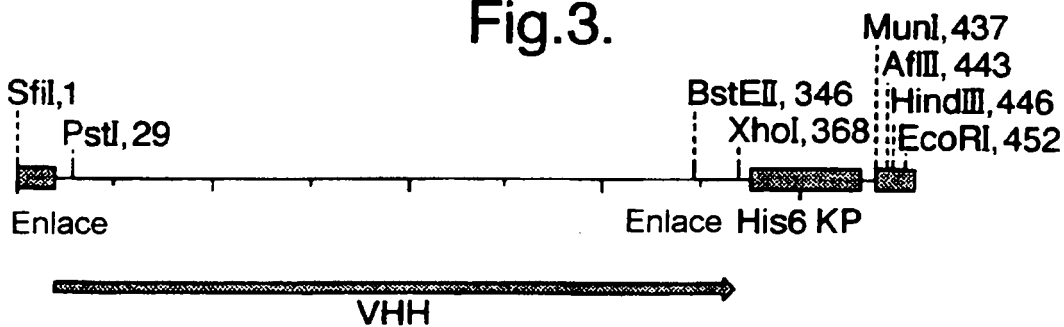


Fig.4.

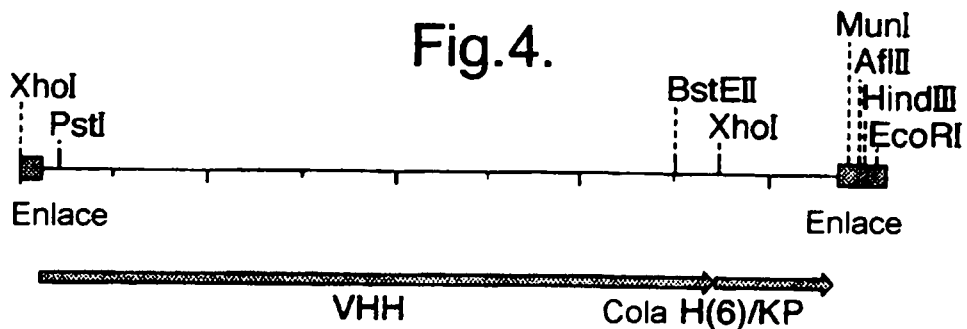


Fig.5.

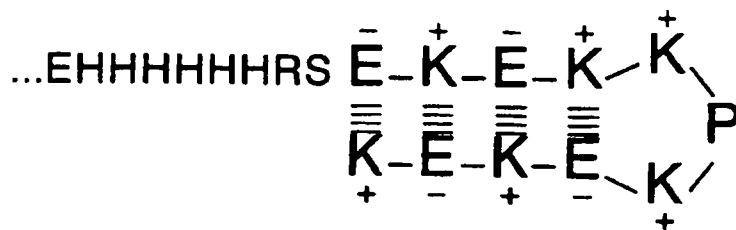
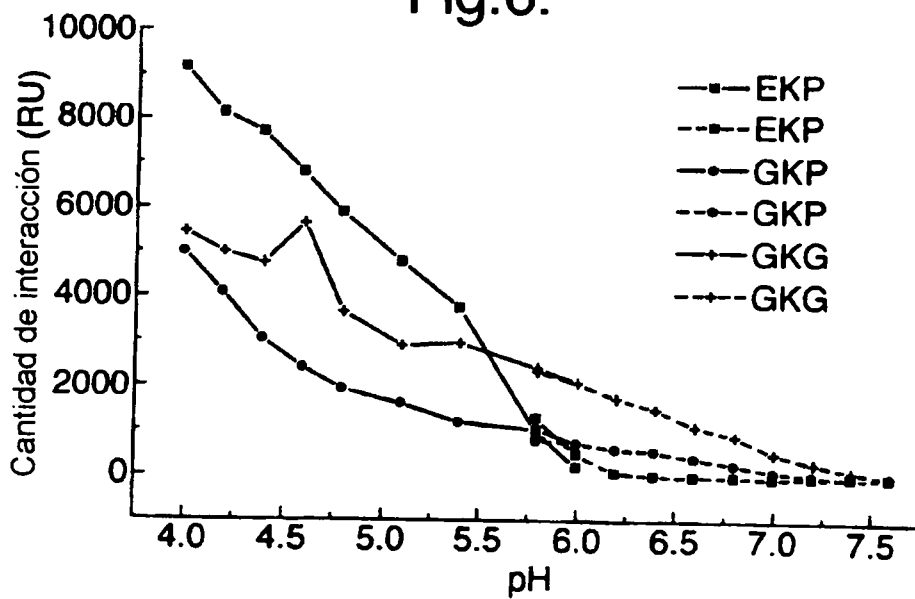


Fig.6.



# ES 2 275 563 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> UNILEVER PLC
- 5 <120> INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS
- <130> T3081
- 10 <140> 99309515.7  
<141> 1999-11-29
- <160> 11
- 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- 20 <211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: SECUENCIA DE ENLACE
- <400> 1
- 30           Glu His His His His His His Arg Ser Glu Lys Glu Lys Lys Pro Lys  
            1           5           10           15  
            Glu Lys Glu Lys  
                          20
- 35 <210> 2  
<211> 20  
<212> PRT
- 40 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: SECUENCIA DE ENLACE
- 45 <400> 2
- 50           Glu His His His His His His Arg Ser Gly Lys Gly Lys Lys Pro Lys  
            1           5           10           15  
            Gly Lys Gly Lys  
                          20
- 55 <210> 3  
<211> 69  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: SECUENCIA DE ENLACE
- 65 <220>  
<221> CDS

ES 2 275 563 T3

<222> (3)..(62)

<400> 3

```

5      tc gag cac cat cac cat cac cat cgt tct ggt aag ggt aag aag gga      47
      Glu His His His His His His Arg Ser Gly Lys Gly Lys Lys Gly
      1          5          10          15

10     aag ggt aag ggt aag taataac      69
      Lys Gly Lys Gly Lys
      20
  
```

15 <210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <223> Descripción de secuencia artificial: INSERTO PLÁSMIDO SINTETICO CODIFICANTE DE COLA PEPTÍ-  
DICA

<400> 4

```

25     Glu His His His His His His Arg Ser Gly Lys Gly Lys Lys Gly Lys
      1          5          10          15
      Gly Lys Gly Lys
      20
  
```

30

<210> 5

<211> 69

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Descripción de secuencia artificial: INSERTO PLÁSMIDO SINTETICO CODIFICANTE DE COLA PEPTÍ-  
DICA

<400> 5

```

45     aattgttatt acttaccctt accctttccc ttcttaccct taccagaacg atggtgagtc 60
      gtatggtgc      69
  
```

50 <210> 6

<211> 69

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: INSERTO PLÁSMIDO SINTETICO CODIFICANTE DE COLA PEPTÍ-  
DICA

60

<220>

<221> CDS

65 <222> (3)..(62)

ES 2 275 563 T3

<400> 6

```
5      tc gag cac cat cac cat cac cat cgt tct ggt aag ggt aag aag cca 47
      Glu His His His His His His His Arg Ser Gly Lys Gly Lys Lys Pro
      1          5          10          15
10     aag ggt aag ggt aag taataac 69
      Lys Gly Lys Gly Lys
      20
```

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> Descripción de secuencia artificial: INSERTO PLÁSMIDO SINTÉTICO CODIFICANTE DE COLA PEPTÍ-  
DICA

<400> 7

```
25     Glu His His His His His His Arg Ser Gly Lys Gly Lys Lys Pro Lys
      1          5          10          15
      Gly Lys Gly Lys
      20
```

<210> 8

<211> 69

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: INSERTO PLÁSMIDO SINTÉTICO CODIFICANTE DE COLA PEPTÍ-  
DICA

<400> 8

```
45     aattgctatt acttaccctt accctttggc ttcttaccct taccagaaag atggtgatgg 60
      tgatgggc 69
```

<210> 9

<211> 69

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: INSERTO SINTÉTICO PLÁSMIDO CODIFICANTE DE COLA PEPTI-  
DICA

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(62)

ES 2 275 563 T3

<400> 9

```
5      tc gag cac cat cac cat cac cat cgt tct gag aag gag aag aag cca   47
      Glu His His His His His His Arg Ser Glu Lys Glu Lys Lys Pro
        1          5          10          15

      aag gag aag gag aag taataac   69
      Lys Glu Lys Glu Lys
                20
```

<210> 10

<211> 20

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <223> Descripción de secuencia artificial: INSERTO PLÁSMIDO SINTETICO CODIFICANTE DE COLA PEPTÍ-  
DICA

<400> 10

```
25      Glu His His His His His His Arg Ser Glu Lys Glu Lys Lys Pro Lys
        1          5          10          15
      Glu Lys Glu Lys
                20
```

30 <210> 11

<211> 69

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Descripción de secuencia artificial: INSERTO PLÁSMIDO SINTETICO CODIFICANTE DE COLA PEPTÍ-  
DICA

<400> 11

```
45      aattgttatt acttctctctt ctctctttggc ttctctctct tctcagaacg atggtgatgg 60
      tgatggctgc   69
```

50

55

60

65