



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 030**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/82** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06734195 .8**  
96 Fecha de presentación : **02.02.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1846769**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.10.2007**

54 Título: **Factor intrínseco porcino.**

30 Prioridad: **07.02.2005 US 52128**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.06.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.06.2009**

73 Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**  
**Chad 0377/AP6A-1, 100 Abbott Park Road**  
**Abbott Park, Illinois 60064-3500, US**

72 Inventor/es: **Wonderling, Ramani, S. y**  
**Uher, John, F.**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 321 030 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

Factor intrínseco porcino.

5 **Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

Esta invención se refiere a reactivos para pruebas diagnósticas, y más concretamente, a reactivos para pruebas  
10 diagnósticas realizadas mediante analizadores de inmunoensayos automatizados.

**2. Discusión de la técnica**

La anemia es el principal trastorno relacionado con bajos niveles de vitamina B<sub>12</sub> en suero. Se ha descubierto  
15 que la anemia megaloblástica (AM), caracterizada por el elevado volumen corpuscular medio (VCM), es debida a la deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>. La relación entre los niveles de vitamina B<sub>12</sub> y la AM no está siempre clara porque algunos pacientes con AM tendrán niveles normales de vitamina B<sub>12</sub>; a la inversa, muchos individuos con deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> no están aquejados de AM. A pesar de estas complicaciones, sin embargo, en presencia de AM (por ejemplo, VCM elevado) existe normalmente deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> en suero. La causa principal de la deficiencia  
20 de vitamina B<sub>12</sub> es la anemia perniciosa. Esta enfermedad se caracteriza por una escasa captación de vitamina B<sub>12</sub>, produciendo vitamina B<sub>12</sub> en suero por debajo de lo normal.

Existen algunos estados que se manifiestan ellos mismos bajos niveles de vitamina B<sub>12</sub> en suero, incluyendo la deficiencia de hierro, el embarazo normal cerca del término, el vegetarianismo, gastrectomía parcial/lesión ilíaca, anti-  
25 ticoncepción oral, competición parasitaria, deficiencia pancreática, epilepsia tratada, y edad avanzada. Los trastornos asociados con niveles elevados de vitamina B<sub>12</sub> en suero incluyen el fallo renal, la enfermedad hepática y las enfermedades mieloproliferativas.

El factor intrínseco se une a la vitamina B<sub>12</sub>. Esta característica permite la detección de y medición de la cantidad de  
30 vitamina B<sub>12</sub> en muestras biológicas. En la preparación convencional de factor intrínseco, la proteína factor intrínseco es aislada de tejido porcino mediante un proceso caro, tedioso y que exige mucho tiempo.

En la técnica es bien conocida la clonación de ADNc utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa  
35 por transcriptasa inversa (RT-PCT). El diseño de cebadores basados en la homología conocida para esta proteína concreta en otras especies (tales como el humano, ratón y rata), y seleccionando las adecuadas condiciones de PCR para obtener ADNc, requiere una cantidad significativa de proyectos y conocimientos técnicos en la técnica de clonación basada en PCR.

La Patente U.S. Nº 3.591.678 revela un proceso para purificar factor intrínseco mediante un proceso de cromato-  
40 grafía por lotes que utiliza una resina de intercambio iónico. El factor intrínseco impuro se disuelve en una solución tampón que tiene un pH y un potencial iónico relativamente bajos, y la solución resultante es puesta en contacto con una resina de intercambio celulósica. Se separa la resina de la solución y el factor intrínseco purificado es eluído de la misma con una solución tampón teniendo un pH y un potencial iónico mayores que la solución tampón en la que se  
45 disolvió el factor intrínseco impuro.

La Patente U.S. Nº 4.447.528 revela un procedimiento de radioensayo y un juego de reactivos, por consiguiente,  
para detectar anticuerpo autobloqueador, tal como un anticuerpo autobloqueador que interfiera con la acomplejación  
de factor intrínseco con vitamina B<sub>12</sub>. Sobre un soporte se inmoviliza un receptor, esto es, factor intrínseco, y se  
50 determina la cantidad de ligando, esto es, vitamina B<sub>12</sub>, capaz de unirse con ese en presencia de una muestra de fluido biológico.

Los Nos de Patente U.S. 5.227.311 y 5.459.242 revelan un método para purificar una solución acuosa de factor  
intrínseco que contiene proteína R. El método implica añadir a la solución de factor intrínseco una cantidad de sílice  
55 coloidal para dispersar la emulsión lipídica, una cantidad de cobinamida suficiente para unir sustancialmente toda la proteína R en la solución, y una cantidad de resina de afinidad por el factor intrínseco para unirse al factor intrínseco en la solución, lavar la cobinamida unida y la proteína R de la resina, eluir el factor intrínseco de la resina, y dializar el factor intrínseco eluído. También revelado es un juego para conducir un ensayo para cobalaminas, el cual incluye un conjugado de micropartículas y factor intrínseco purificado.

La Patente U.S. Nº 5.350.674 revela un ensayo competitivo no isotópico para vitamina B<sub>12</sub>, utilizando factor intrín-  
seco marcado con peroxidasa de rábano picante, mediante acoplamiento vía agentes reticulantes heterobifuncionales.  
Además, se revela un método para estabilizar los conjugados resultantes mediante pretratamiento con N-etilmaleimida.

Investigadores anteriores han revelado las secuencias de ADNc que codifican para el factor intrínseco humano  
65 (número de acceso GenBank M63154), para el factor intrínseco de ratón (número de acceso GenBank L24191), y para el factor intrínseco de rata (número de acceso GenBank J03577). La siguiente EST, que se deriva de *Sus scrofa*, ha sido publicada el 3 de diciembre de 2002 (3/12/2002) "MPL384\_6\_E17 MPL *Sus scrofa* cDNA clone pSPORTI 5', mRNA sequence". Nº de acceso a la base de datos CA780388. Sin embargo, no se conoce la secuencia de ADNc

del factor intrínseco porcino. Por lo tanto, antes de esta invención, no se podía producir la proteína factor intrínseco porcino recombinante.

El factor intrínseco porcino es aislado, típicamente, a partir del tejido del duodeno de un cerdo (por ejemplo, *Sus scrofa*). Este aislamiento es un procedimiento tedioso, caro y exige mucho tiempo, y los rendimientos son bajos. El factor intrínseco nativo aislado por procedimientos utilizados actualmente carece de consistencia en su pureza y en su ejecución resultante en un inmunoensayo. Por lo tanto, sería conveniente producir factor intrínseco porcino en grandes cantidades y aislar factor intrínseco porcino en un proceso de aislamiento por afinidad de una sola etapa. De esta manera, la proteína recombinante producida tendría una ejecución coherente en un inmunoensayo diagnóstico.

## Sumario de la invención

La presente invención incluye una secuencia nucleotídica aislada codificando para factor intrínseco porcino, en donde el factor intrínseco porcino comprende una secuencia de aminoácidos teniendo el 100% de identidad de su secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que se compone de la ID SEC N° 3, ID SEC N° 6, e ID SEC N° 9.

Adicionalmente, la presente invención abarca una secuencia de ácido nucleico aislada comprendiendo, o complementaria a, una secuencia nucleotídica teniendo el 100% de identidad de su secuencia de aminoácidos con una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que se compone de la ID SEC N° 1, ID SEC N° 4, e ID SEC N° 7.

Las secuencias nucleotídicas descritas arriba codifican un factor intrínseco porcino funcionalmente activo que se une a la vitamina B<sub>12</sub>. La presente invención también incluye proteínas purificadas y fragmentos de las mismas codificados por las secuencias nucleotídicas arriba mencionadas.

Adicionalmente, la presente invención incluye un método para producir factor intrínseco porcino, comprendiendo las etapas de: aislar una secuencia nucleotídica comprendiendo, o complementaria a, una secuencia nucleotídica codificando un factor intrínseco porcino, una secuencia de aminoácidos teniendo el 100% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la ID SEC N° 3, ID SEC N° 6 e ID SEC N° 9; construir un vector constando de: i) la secuencia nucleotídica aislada operablemente unida a ii) un promotor; e introducir dicho vector en una célula huésped, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes, para la expresión del factor intrínseco porcino. La célula huésped puede ser, por ejemplo, una célula eucariota o una célula procariota. En particular, la célula procariota puede ser, por ejemplo, *E. coli*, cianobacteria o *B. subtilis*. La célula eucariota puede ser, por ejemplo, una célula mamífera, una célula de insecto, una célula vegetal o una célula fúngica (por ejemplo, una célula de levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carisbengensis*, *Candida spp.*, *Lipomyces starkey*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces spp.*, *Hansenula spp.*, *Trichoderma spp.* o *Pichia spp.*). También se pueden utilizar otros huéspedes fúngicos tales como *Rizopus spp.*, *Aspergillus spp.* y *Mucor spp.*

Además, la presente invención también incluye un vector constando de: una secuencia nucleotídica aislada comprendiendo, o complementaria a, una secuencia nucleotídica codificando para factor intrínseco porcino teniendo una secuencia de aminoácidos que tiene el 100% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que se compone de la ID SEC N° 3, ID SEC N° 6, e ID SEC N° 9, operablemente unida a una secuencia reguladora (por ejemplo, un promotor). La invención también incluye una célula huésped comprendiendo este vector. La célula huésped puede ser, por ejemplo, una célula eucariota o una célula procariota. Las células eucariotas y células procariotas apropiadas son como se definieron antes.

Se debería observar que la presente invención abarca secuencias nucleotídicas aisladas (y las correspondientes proteínas codificadas) teniendo secuencias idénticas a la ID SEC N° 1, ID SEC N° 4 e ID SEC N° 7. Tales secuencias pueden ser derivadas de cualquier fuente, aisladas a partir de una fuente natural, o producidas vía una ruta semisintética, o sintetizadas *de novo*. En particular, tales secuencias pueden ser aisladas o derivadas de fuentes que no sean las descritas en los ejemplos (por ejemplo, bacterias, hongos, algas, *C. elegans*, ratón o humano).

El método de esta invención implica el clonar el ADNc, que codifica el factor intrínseco porcino, mediante RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa por Transcriptasa Inversa). El diseño de los cebadores estuvo basado en la homología que existe entre las secuencias de ADNc del factor intrínseco de humano, ratón y rata.

El factor intrínseco aislado por métodos actualmente utilizados en la técnica proporciona un resultado incoherente con respecto a pureza y, por consiguiente, de ejecución en un ensayo. Empleando el método y proteína de esta invención, se puede producir factor intrínseco recombinante teniendo propiedades coherentes. El método de esta invención reduce el coste y simplifica el aislamiento. Además, los resultados de los ensayos que utilizan factor intrínseco porcino muestran una coherencia mejorada.

## Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 ilustra la expresión de factor intrínseco porcino recombinante. Las células de *E. coli* fueron lisadas y las proteínas fueron resueltas utilizando SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). La banda 1 contiene marcadores de peso molecular (marcados en kilodaltons). Las bandas 2 y 4 contienen muestras tomadas a la hora post-inducción 0 (HPI 0). Las bandas 3 y 5 contienen muestras tomadas a HPI 4 y HPI 3. La banda 6

## ES 2 321 030 T3

representa la pasta celular (células después de concentración y centrifugación). La banda 8 contiene el factor intrínseco porcino nativo [purificado a partir de tripa de cerdo (*Sus scrofa*)].

La Fig. 2 ilustra la unión de factor intrínseco porcino recombinante a vitamina B<sub>12</sub>. Las células de *E. coli* fueron usadas y las proteínas fueron resueltas utilizando SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue investigada con vitamina B<sub>12</sub> conjugada a fosfatasa alcalina. Las bandas de proteína que se unieron a la vitamina B<sub>12</sub> fueron identificadas por incubación con sustratos de fosfatasa alcalina que desarrollan color. La banda 1 contiene marcadores de peso molecular (marcados en kilodaltons). Las bandas 2, 3, 4 y 5 representan células de diversos clones expresando factor intrínseco porcino recombinante. La banda 6 contiene el factor intrínseco porcino nativo [purificado a partir de tripa de cerdo (*Sus scrofa*)]. La banda de proteína factor intrínseco recombinante desarrolló color, demostrando de ese modo que el factor intrínseco se unió a la vitamina B<sub>12</sub>.

La Fig. 3 ilustra la unión de factor intrínseco porcino recombinante a anticuerpo anti-factor intrínseco mediante transferencia Western. Las células de *E. coli* fueron lisadas y las proteínas fueron resueltas utilizando SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Después, se investigó la membrana con anticuerpo anti-factor intrínseco. La banda 1 contiene marcadores de peso molecular (marcados en kilodaltons). Las bandas 2, 3, 4 y 5 representan células de diversos clones expresando factor intrínseco porcino recombinante. La banda 6 contiene el factor intrínseco porcino nativo [purificado a partir de tripa de cerdo (*Sus scrofa*)]. La banda de proteína factor intrínseco recombinante desarrolló color, demostrando de ese modo que el factor intrínseco recombinante fue reconocido por el anticuerpo.

La Fig. 4 ilustra el alineamiento de la secuencia nucleotídica del factor intrínseco porcino, el factor intrínseco humano, el factor intrínseco de rata y el factor intrínseco de ratón.

La Fig. 5 ilustra el porcentaje de identidad entre las secuencias nucleotídicas de factor intrínseco porcino y de factor intrínseco humano, entre las secuencias nucleotídicas de factor intrínseco porcino y de factor intrínseco de rata, y entre las secuencias nucleotídicas de factor intrínseco porcino y de factor intrínseco de ratón.

La Fig. 6 ilustra el alineamiento de la supuesta secuencia de aminoácidos del factor intrínseco codificada según *Sus scrofa* con secuencias de factor intrínseco conocidas de humano, rata y ratón.

La Fig. 7 ilustra el porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos del factor intrínseco porcino y del factor intrínseco humano, entre las secuencias de aminoácidos del factor intrínseco porcino y del factor intrínseco de rata, y entre las secuencias de aminoácidos del factor intrínseco porcino y del factor intrínseco de ratón.

### 35 Descripción detallada

El término “identidad” se refiere a la relación de dos secuencias, partiendo de la base de nucleótido a nucleótido, sobre una ventana o segmento de comparación concretos. De este modo, la identidad se define como el grado de igualdad, correspondencia o equivalencia entre las mismas cadenas (sentido o antisentido) de dos segmentos de ADN (o dos secuencias de aminoácidos). El “porcentaje de identidad de secuencias” se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una región concreta, determinando el número de posiciones en las que se encuentra la base o aminoácido idénticos en ambas secuencias, para deparar el número de posiciones que casan, dividiendo el número de tales posiciones por el número total de posiciones en el segmento a comparar, y multiplicando el resultado por 100. El alineamiento óptimo de las secuencias se puede conducir mediante el algoritmo de Smith & Waterman, Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 85: 2.444 (1988) y por programas de ordenador que implementen los algoritmos relevantes [por ejemplo, Clustal Macaw Pileup <http://cmqm.stanford.edu/biochem218/II/Multiple.pdf>; Higgs y col., CABIOS. 5L 151-153 (1989)], FASTDB (Intelligenetics), BLAST [National Center for Biomedical Information; Altschul y col., Nucleic Acids Research 25:3.389-3.402 (1997)], PILEUP (Genetics Computer Group, Madison, WI) o GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI) (ver Patente U.S. N° 5.912.120).

Por lo que concierne a la presente invención, el término “complementariedad” se define como el grado de relación entre dos segmentos de ADN. Se determina midiendo la capacidad de la cadena sentido de un segmento de ADN para hibridarse con la cadena antisentido del otro segmento de ADN, bajo condiciones adecuadas, para formar una doble hélice. El término “complemento” se define como una secuencia que casa para dar una secuencia basada en las reglas canónicas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, una secuencia A-G-T en una cadena nucleotídica es “complementaria” a T-C-A en la otra cadena.

En la doble hélice, la adenina aparece en una cadena, la timina aparece en la otra cadena. De manera similar, dondequiera que se encuentre la guanina en una cadena, se encuentra la citosina en la otra. Cuanto mayor sea la relación entre las secuencias nucleotídicas de dos segmentos de ADN, mayor será la capacidad para formar dúplex híbridos entre las cadenas de los dos segmentos de ADN.

El término “similitud”, con respecto a dos secuencias de aminoácidos, se define como la presencia de una serie de residuos de aminoácidos idénticos, así como conservados, en ambas secuencias. Cuanto mayor sea el grado de similitud entre dos secuencias de aminoácidos, mayor será la correspondencia, igualdad o equivalencia de las dos secuencias (el término “identidad”, con respecto a dos secuencias de aminoácidos, se define como la presencia

de una serie de residuos de aminoácidos exactamente parecidos o invariantes en ambas secuencias). Las definiciones de “complementariedad”, “identidad” y “similitud” son bien conocidas por aquellos de habilidad normal en la técnica.

5 La frase “codificado por” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia polipeptídica, en donde la secuencia polipeptídica o una porción de la misma contiene una secuencia de aminoácidos de al menos 3 aminoácidos, más preferentemente, al menos 8 aminoácidos, e incluso más preferentemente, al menos 15 aminoácidos de un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico.

10 La presente revelación también abarca una secuencia nucleotídica aislada que codifica factor intrínseco porcino y que es hibridable, bajo condiciones moderadamente rigurosas, con un ácido nucleico teniendo una secuencia nucleotídica comprendiendo, o complementaria a, las secuencias nucleotídicas descritas antes (ver ID SEC N° 1, ID SEC N° 4, e ID SEC N° 7). Una molécula de ácido nucleico es “hibridable” con otra molécula de ácido nucleico cuando una forma de cadena simple de la molécula de ácido nucleico pueda anillarse a la otra molécula de ácido nucleico  
15 bajo condiciones apropiadas de temperatura y potencial iónico [ver Sambrook y col., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York)]. Las condiciones de temperatura y potencial jónico determinan la “dificultad” de la hibridación.

El término “hibridación”, como se utiliza aquí, se emplea generalmente para significar la hibridación de ácidos  
20 nucleicos en condiciones de dificultad adecuadas, como sería fácilmente evidente para aquellos especializados en la técnica, dependiendo de la naturaleza de la secuencia sonda y las secuencias diana. Las condiciones de hibridación y lavado son bien conocidas en la técnica, y el ajuste de las condiciones se realiza fácilmente, dependiendo de la dificultad deseada, variando el tiempo de incubación, la temperatura y/o el potencial jónico de la solución. Ver, por ejemplo, Sambrook, J. y col., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory  
25 Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989, como se indicó antes, e incorporada aquí como referencia [ver también Short Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel y col. y Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993), ambas incorporadas aquí como referencia]. Específicamente, la elección de las condiciones es dictada por la longitud de las secuencias a hibridar, en concreto, la longitud de la secuencia sonda, el contenido relativo de G-C  
30 de los ácidos nucleicos y la cantidad de malos emparejamientos a permitir. Se prefieren condiciones de baja dificultad cuando se desee la hibridación parcial entre cadenas que tengan menores grados de complementariedad. Cuando se desee una complementariedad perfecta o casi perfecta, se prefieren condiciones de alta dificultad. Para condiciones típicas de alta dificultad, la solución de hibridación contiene 6 X S.S.C., EDTA 0'01M, 1 X solución de Denhardt y 0'5% de SDS. La hibridación se lleva a cabo a unos 68 grados Celsius durante unas 3 a 4 horas para fragmentos de  
35 ADN clonado, y durante unas 12 a unas 16 horas para ADN eucariota total. Para dificultades moderadas, se puede utilizar prehibridación de los filtros e hibridando con una solución de 3 X cloruro sódico, citrato sódico (SSC), 50% de formamida (0'1 M de este tampón a pH 7'5) y 5 X solución de Denhardt. Después, se puede prehibridar a 37 grados Celsius durante 4 horas, seguido por hibridación a 37 grados Celsius con una cantidad de sonda marcada igual a 3.000.000 cpm totales durante 16 horas, seguido por un lavado en solución de 2 X SSC y 0'1% SDS, un lavado de 4 veces durante 1 minuto cada uno a temperatura ambiente y 4 veces a 60 grados Celsius durante 30 minutos cada uno.  
40 Posterior al secado, se expone a película. Para dificultades inferiores, se reduce la temperatura de hibridación a unos 12 grados Celsius por debajo de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del dúplex. Se sabe que la  $T_m$  es función del contenido de G-C y de la longitud del dúplex, así como del potencial fónico de la solución.

45 La “hibridación” requiere que dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias. Sin embargo, dependiendo de la dificultad de la hibridación, pueden suceder malos emparejamientos entre las bases. Como se indicó antes, la dificultad apropiada para hibridar ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementación. Tales variables son conocidas en la técnica. Más específicamente, cuanto mayor sea el grado de similitud u homología entre dos secuencias nucleotídicas, mayor será el valor de  $T_m$  para híbridos de ácidos nucleicos  
50 que tengan aquellas secuencias. Para híbridos mayores de 100 nucleótidos de longitud, se han obtenido ecuaciones para calcular  $T_m$  (ver Sambrook y col., anteriormente). Para hibridación con ácidos nucleicos más cortos, llega a ser más importante la posición de los malos emparejamientos, y la longitud de los oligonucleótidos determina su especificidad (ver Sambrook y coi, anteriormente).

55 Como se utiliza aquí, la frase “fragmento o secuencia aislados de ácido nucleico” significa un polímero de ARN o ADN que es de cadena simple o de cadena doble, conteniendo opcionalmente bases nucleotídicas sintéticas, no naturales o alteradas. Un fragmento de ácido nucleico aislado en forma de un polímero de ADN puede estar compuesto por uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético (el término “fragmento”, con respecto a un polinucleótido específico, se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende una secuencia contigua de  
60 aproximadamente unos 6 nucleótidos como mínimo, preferentemente unos 8 nucleótidos como mínimo, más preferentemente unos 10 nucleótidos como mínimo, e incluso más preferentemente al menos unos 15 nucleótidos, y muy preferentemente al menos unos 25 nucleótidos idénticos o complementarios a una región de la secuencia nucleotídica especificada). Los nucleótidos (normalmente encontrados en su forma 5'-monofosfato) son nombrados por designación de su única letra como sigue: “A” para adenilato o desoxiadenilato (para ARN o ADN, respectivamente), “C”  
65 para citidilato o desoxicitidilato, “G” para guanilato o desoxiguanilato, “U” para uridilato, “T” para desoxitimidilato, “R” para purinas (A o G), “Y” para pirimidinas (C o T), “K” para G o T, “H” para A o C o T, “I” para inosina, y “N” para cualquier nucleótido.

## ES 2 321 030 T3

Las frases “fragmento o subfragmento que es equivalente funcionalmente” y “fragmento o subfragmento equivalente funcionalmente” se utilizan aquí intercambiamente. Estas frases se refieren a una porción o subsecuencia de un fragmento de ácido nucleico aislado en el que se mantiene la capacidad para alterar la expresión genética o producir un cierto fenotipo si el fragmento o subfragmento codifica o no una enzima activa. Por ejemplo, el fragmento o subfragmento puede ser utilizado en el diseño de construcciones quiméricas para producir el fenotipo deseado en una planta transformada. Las construcciones quiméricas pueden ser diseñadas para su uso en cosupresión o antisentido uniendo un fragmento de ácido nucleico o subfragmento del mismo, si codifica o no una enzima activa, en la orientación apropiada con respecto a una secuencia promotora vegetal.

Los términos/frases “homología”, “homólogo”, “substancialmente similar” y “sustancialmente correspondiente” se utilizan intercambiamente aquí. Se refieren a fragmentos de ácido nucleico en donde los cambios en una o más bases nucleotídicas no afectan a la capacidad del fragmento de ácido nucleico para mediar la expresión genética o producir un cierto fenotipo. Estos términos también se refieren a modificaciones de los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención, tales como una supresión o inserción de uno o más nucleótidos que no alteren sustancialmente las propiedades funcionales del fragmento de ácido nucleico resultante con respecto al fragmento inicial sin modificar.

El término “gen” se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, incluyendo secuencias reguladoras precediendo (secuencias 5’ no codificadoras) y siguiendo (secuencias 3’ no codificadoras) a la secuencia codificadora.

La frase “gen nativo” se refiere a un gen como se encuentra en la naturaleza, con sus propias secuencias reguladoras. Por contraste, la frase “construcción quimérica” se refiere a una combinación de fragmentos de ácido nucleico que no se encuentran normalmente juntos en la naturaleza. Por consiguiente, una construcción quimérica puede constar de secuencias reguladoras y de secuencias codificadoras que se deriven de diferentes fuentes, o de secuencias reguladoras y de secuencias codificadoras que se deriven de la misma fuente, pero ordenadas de una manera diferente a la normalmente encontrada en la naturaleza. (El término “aislada” significa que la secuencia está sacada de su entorno natural).

La frase “gen extraño” se refiere a un gen no encontrado normalmente en el organismo huésped, pero que es introducido en el organismo huésped por transferencia genética. Los genes extraños pueden constar de genes nativos insertados en un organismo no nativo, o de construcciones quiméricas. El término “transgen” significa un gen que ha sido introducido dentro del genoma mediante un procedimiento de transformación.

La frase “secuencia codificadora” se refiere a una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de aminoácidos específica. El término “secuencias reguladoras” se refiere a secuencias nucleotídicas localizadas por arriba (secuencias 5’ no codificadoras), dentro, o por debajo (secuencias 3’ no codificadoras) de una secuencia codificadora, y que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad del ARN, o la traducción de la secuencia codificadora asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, promotores, secuencias líder de traducción, intrones, y secuencias de reconocimiento de poliadenilación.

El término “promotor” se refiere a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia codificadora o ARN funcional. La secuencia promotora consta de elementos comente arriba proximales y más distales, los últimos elementos mencionados a menudo como activadores. Por consiguiente, el término “activador” significa una secuencia de ADN que puede estimular la actividad del promotor y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para intensificar el nivel o especificidad tisular de un promotor. Las secuencias promotoras también pueden estar localizadas dentro de las porciones de genes transcritas, y/o corriente abajo de las secuencias transcritas. Los promotores pueden ser obtenidos en su totalidad a partir de un gen nativo, o pueden estar compuestos de elementos diferentes derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintético. Se comprende por aquellos especializados en la técnica que promotores diferentes puedan dirigir la expresión de un gen en tejidos o tipos celulares diferentes, o en diferentes etapas de desarrollo, o como respuesta a diferentes condiciones ambientales. Los promotores que originen que un gen sea expresado en la mayoría de los tipos celulares, en la mayoría de las veces, son mencionados normalmente como “promotores constitutivos”. Se reconoce además que, puesto que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no han sido definidos completamente, los fragmentos de ADN de alguna variación pueden tener idéntica actividad promotora.

El término “intrón” significa una secuencia intercalada en un gen que no codifique una porción de la secuencia proteica. De este modo, tales secuencias se transcriben en ARN pero después se escinden y no son traducidas. El término también se emplea para las secuencias de ARN escindidas. El término “exón” significa una porción de la secuencia genética que se transcribe y se encuentra en el ARN mensajero maduro derivado del gen, pero no es necesariamente una parte de la secuencia que codifica el producto genético final.

La frase “secuencia líder de la traducción” se refiere a una secuencia de ADN localizada entre la secuencia promotora de un gen y la secuencia codificadora. La secuencia líder de la traducción está presente en el ARNm completamente procesado arriba de la secuencia de inicio de la traducción. La secuencia líder de la traducción puede influir en el procesamiento del transcripto primario para ARNm, la estabilidad del ARNm o la eficacia de traducción. Se han descrito ejemplos de secuencias líder de la traducción [Turner, R. y Foster, G. D. (1995) *Molecular Biotechnology* 3:225].

## ES 2 321 030 T3

La frase “secuencias no codificadoras 3’” se refiere a secuencias de ADN localizadas corriente abajo de una secuencia codificadora, e incluyen secuencias de reconocimiento de poliadenilación y otras secuencias codificando señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento de ARNm o expresión genética. La señal de poliadenilación se caracteriza normalmente por afectar a la adición de extensiones de ácido poliadenílico para el extremo 3’ del ARNm precursor. El empleo de diferentes secuencias no codificadoras 3’ está ejemplificado por Ingelbrecht y col., *Plant Cell* 1:671-680 (1989).

La frase “transcripto de ARN” se refiere al producto resultante de la transcripción de una secuencia de ADN catalizada por ARN polimerasa. Cuando el transcripto de ARN es una copia complementaria perfecta de la secuencia de ADN se menciona como transcripto primario, o puede ser una secuencia de ARN derivada del procesamiento postranscripcional del transcripto primario y se menciona como ARN maduro. La frase “ARN mensajero (ARNm)” se refiere al ARN que está sin intrones y que puede ser traducido en proteína por la célula. El término “ADNc” se refiere a un ADN que es complementario y sintetizado a partir de un molde de ARNm utilizando la enzima transcriptasa inversa. El ADNc puede ser de cadena simple o transformado en la forma de cadena doble utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I. La frase “ARN sentido” se refiere a un transcripto de ARN que incluye el ARNm y puede ser traducido en proteína dentro de una célula o *in vitro*.

La frase “ARN antisentido” se refiere a una transcripto de ARN que es complementario a todo o a parte de un transcripto primario diana de ARNm, y que bloquea la expresión de un gen diana (Patente U.S. N° 5.107.065). La complementariedad de un ARN antisentido puede ser con cualquier parte del transcripto del gen específico, esto es, en la secuencia no codificadora 5’, secuencia no codificadora 3’, intrones, o la secuencia codificadora. La frase “ARN funcional” se refiere a ARN antisentido, ARN ribozima, u otro ARN que no pueda ser traducido pero que tenga todavía un efecto sobre los procesos celulares. El término “complemento” y la frase “complemento inverso” son aquí utilizados intercambiamente con respecto a transcriptos de ARNm, y quieren decir el definir el ARN antisentido del mensaje.

La frase “ARN endógeno” se refiere a cualquier ARN que esté codificado por cualquier secuencia de ácido nucleico presente en el genoma del huésped antes de la transformación con la construcción recombinante de la presente invención, si es de existencia natural o no natural, esto es, introducida por métodos recombinantes, mutagénesis, etc.

La frase “de existencia no natural” significa artificial, no coherente con lo que se encuentra normalmente en la naturaleza.

La frase “operablemente unido” se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico con un fragmento de ácido nucleico simple para que la función de uno sea regulada por el otro. Por ejemplo, un promotor está operablemente unido a una secuencia codificadora cuando es capaz de regular la expresión de esa secuencia codificadora (esto es, que la secuencia codificadora esté bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificadoras pueden ser operablemente unidas a secuencias reguladoras en una orientación sentido o antisentido. En otro ejemplo, las regiones de ARN complementario de la invención pueden ser operablemente unidas, directa o indirectamente, al 5’ del ARNm diana o al 3’ del ARNm diana, o dentro del ARNm diana, o una primera región complementaria es 5’ y su complemento es 3’ para el ARNm diana. Las secuencias “operablemente unidas” incluyen secuencias para el control de la expresión que sean contiguas con el gen de interés y secuencias para el control de la expresión que actúen en *trans* o a distancia para controlar el gen de interés. La frase “secuencia para el control de la expresión”, como se utiliza aquí, se refiere a secuencias polinucleotídicas que son necesarias para llevar a cabo la expresión y procesamiento de secuencias codificadoras a las que están ligadas. Las secuencias para el control de la expresión incluyen secuencias de iniciación, de terminación, promotoras y activadoras de la transcripción; señales de procesamiento del ARN eficaces tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que establezcan ARNm citoplasmático; secuencias que intensifiquen la eficacia de la traducción (esto es, secuencia Kozak de consenso); secuencias que intensifiquen la estabilidad de las proteínas; y cuando se desee, secuencias que intensifiquen la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariotas, tales secuencias de control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión ribosomal, y una secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y una secuencia de terminación de la transcripción. La frase “secuencias de control” pretende incluir componentes cuya presencia sea esencial para la expresión y procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea provechosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias compañeras de fusión.

El término “expresión”, como se utiliza aquí, se refiere a la producción de un producto final funcional. La expresión de un gen implica la transcripción del gen y traducción del ARNm en un precursor o proteína madura. “Inhibición antisentido” se refiere a la producción de transcriptos de ARN antisentido capaces de suprimir la expresión de la proteína diana. El término “cosupresión” se refiere a la producción de transcriptos de ARN sentido capaces de suprimir la expresión de genes extraños o endógenos idénticos o sustancialmente similares (Patente U.S. N° 5.231.020).

La frase “proteína madura” se refiere a un polipéptido procesado postraduccionalmente, esto es, uno a partir del que se ha sacado cualquier pre o propéptido presente en el producto primario de traducción. El término proteína “precursora” se refiere al producto primario de traducción de ARNm, esto es, con pre y propéptidos todavía presentes. Los pre y propéptidos pueden ser, pero no se limitan a, señales de localización intracelular.

El término “transformación”, como se define aquí, se refiere a cualquier proceso por el que ADN exógeno entra en una célula huésped. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales, utilizando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede contar con cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico extraño dentro de una célula huésped procariota o eucariota. El método se selecciona basado en la célula huésped a transformar y puede incluir, pero no se limita a, infección viral, electroporación, lipofección, y bombardeo de partículas. Tales células “transformadas” incluyen células transformadas establemente en las que el ADN insertado es capaz de replicación como un plásmido autónomamente replicante o como parte del cromosoma huésped. Pueden incluir también células que expresen transitoriamente el ADN o ARN insertado durante periodos de tiempo limitados.

La frase “transformación estable” se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico dentro del genoma de un organismo huésped, produciendo una herencia genéticamente estable. Por contraste, la frase “transformación transitoria” se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico dentro del núcleo, u orgánulo conteniendo ADN, de un organismo huésped, produciendo expresión genética sin integración o herencia estable. Los organismos huéspedes conteniendo los fragmentos de ácido nucleico transformados son mencionados como organismos “transgénicos”. El método preferido de transformación celular del arroz, maíz y otras monocotiledóneas es el empleo de tecnología de transformación por acelerador de partículas o “arma genética” [Klein y col., (1987) Nature (Londres) 327: 70-73; Patente U.S. N° 4.945.050], o un método mediado por *Agrobacterium* utilizando un plásmido Ti conteniendo el transgen (Ishida Y. y col., 1996, Nature Biotech. 14; 745-750). El término “transformación”, como se utiliza aquí, se refiere a una transformación estable y a una transformación transitoria.

Las técnicas estándar del ADN recombinante y de clonación molecular utilizadas aquí son bien conocidas en la técnica y están descritas más completamente en Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor 1989 (de ahora en adelante “Sambrook”).

El término “recombinante” se refiere a una combinación artificial de dos segmentos de secuencia de alguna manera separados, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante la manipulación de segmentos aislados de ácidos nucleicos por técnicas de ingeniería genética.

El término “PCR” y la frase “Reacción en Cadena de la Polimerasa” se refieren a una técnica para la síntesis de grandes cantidades de segmentos específicos de ADN, comprende una serie de ciclos repetitivos (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT). Típicamente, el ADN de cadena doble es desnaturalizado por calor, los dos cebadores complementarios para los límites 3' del segmento diana son anillados a baja temperatura y después expandidos a una temperatura intermedia. El conjunto de estas tres etapas consecutivas es mencionado como ciclo.

La reacción en cadena de la polimerasa (“PCR”) es una técnica poderosa utilizada para amplificar ADN millones de veces, mediante la replicación repetida de un molde, en un periodo de tiempo corto. [Mullis y col., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263-273 (1986); Erlich y col., Solicitud de Patente Europea N° 50.424; Solicitud de Patente Europea N° 84.796; Solicitud de Patente Europea N° 258.017; Solicitud de Patente Europea N° 237.362; Mullis, Solicitud de Patente Europea N° 201.184; Mullis y col., Patente U.S. N° 4.683.202; Erlich, Patente U.S. N° 4.582.788; y Saiki y col., Patente U.S. N° 4.683.194]. El proceso utiliza conjuntos de oligonucleótidos específicos sintetizados *in vitro* para cebar la síntesis de ADN. El diseño de los cebadores depende de las secuencias de ADN que se desee analizar. La técnica se lleva a cabo mediante muchos ciclos (normalmente 20- 50) de fundir el molde a alta temperatura, permitir que los cebadores se anillen a secuencias complementarias dentro del molde, y replicando después el molde con ADN polimerasa.

Los productos de reacciones PCR son analizados mediante separación en geles de agarosa, seguido por tinción con bromuro de etidio y visualización con transiluminación. Alternativamente, se pueden añadir dNTPs radioactivos a la PCR para incorporar marcador dentro de los productos. En este caso, los productos de PCR son visualizados mediante exposición del gel a película para rayos-X. La ventaja añadida de radiomarcado de productos PCR es que se pueden cuantificar los niveles de los productos de amplificación individuales.

El término “RT-PCR” significa una combinación de Transcripción Inversa y PCR. La transcripción inversa es un proceso donde se utiliza ARN como materia de partida para fabricar ADN empleando una enzima llamada Transcriptasa Inversa. La primera cadena de ADN que se fabrica durante la transcripción inversa es utilizada como materia de partida para las reacciones de PCR que siguen.

Las frases “construcción recombinante”, “construcción de expresión” y “construcción de expresión recombinante” son utilizadas aquí intercambiamente. Estas frases se refieren a una unidad funcional de material genético que puede ser insertada dentro del genoma de una célula utilizando metodología estándar bien conocida por un especializado en la técnica. Tal construcción puede ser ella misma o puede ser utilizada conjuntamente con un vector. Si se utiliza un vector, entonces la elección del vector depende del método que se utilizará para transformar plantas huésped, como es bien conocido por aquellos especializados en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un vector plasmídico. El artesano especializado está bien enterado de los elementos genéticos que tienen que estar presentes en el vector para transformar, seleccionar y propagar con éxito células huésped que consten de cualquiera de los fragmentos de ácido nucleico aislado de la invención. El artesano especializado identificará también qué diferentes acontecimientos de transformación independientes producirán niveles y modelos diferentes de expresión [Jones y col., (1985) EMBO J. 4:2.411-2.418; De Almeida y col., (1989) Mol. Gen. Genetics 218: 78-86] y, de este modo, se tienen que escrutar

## ES 2 321 030 T3

múltiples acontecimientos para obtener líneas que muestren el nivel de expresión y modelo deseados. Tal escrutinio se puede realizar mediante análisis Southern de ADN, análisis Northern de la expresión de ARNm, análisis Western de la expresión de proteínas, o análisis fenotípico.

5 El término “polipéptido”, como se utiliza aquí, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos “péptido” y “proteína” son utilizados intercambiamente con el término polipéptido, y también se refieren a una cadena polimérica de aminoácidos. El término “polipéptido” abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos de polipéptidos de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

10 Las frases “proteína aislada” y “polipéptido aislado” se refieren a una proteína o polipéptido que, en virtud de su origen o fuente de derivación, no está asociado con componentes naturalmente asociados que lo acompañan en su estado nativo; está sustancialmente libre de otras proteínas de la misma especie; se expresa mediante una célula de una especie diferente; o no existe en la naturaleza. De este modo, un polipéptido que sea sintetizado químicamente, o sintetizado en un sistema celular diferente del de la célula de la que se origina naturalmente, estará “aislado” de sus componentes naturalmente asociados. Mediante aislamiento también se puede hacer una proteína sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados, utilizando técnicas de purificación de proteínas conocidas en la materia.

Las frases “unión específica” y “uniendo específicamente”, como se utilizan aquí en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, quieren decir que la interacción depende de la presencia o una estructura concreta (por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica antes que a proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítipo “A”, la presencia de una molécula conteniendo epítipo A (o libre, A no marcado), en una reacción conteniendo “A” marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

25 El término “anticuerpo”, como se utiliza aquí, se refiere extensamente a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante, o derivación del mismo, que conserve las características esenciales de unión al epítipo de una molécula Ig. En la técnica se conocen tales formatos de mutante, variante, o derivado de anticuerpo, formas de realización no limitantes de los cuales se discuten abajo.

En un anticuerpo de longitud completa, cada cadena pesada está compuesta de una región variable de la cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de la cadena ligera (abreviada aquí como LCVR o VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden estar adicionalmente subdivididas en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), entremezclas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el amino-terminal hasta el carboxi-terminal en el orden siguiente:

40 FRI, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

La frase “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “porción de anticuerpo”), como se utiliza aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que mantienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, hIL-18). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Tales formas de realización de anticuerpo pueden ser también formatos biespecíficos, específicos duales, o multispecíficos; específicamente la unión a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la frase “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente constando de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente comprendiendo dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd constando de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv constando de los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAB [Ward y col., (1989) Nature 341:544-546], que comprende un único dominio variable; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes independientes, pueden ser unidos, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que les permite ser construidos como una sola cadena proteica en la que la pareja de regiones VL y VH formen moléculas monovalentes [conocida como Fv de cadena sencilla (scFv); ver, por ejemplo, Bird y col., (1988) Science 242: 423-426; y Huston y col (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5.879-5.883]. También se pretende que tales anticuerpos de cadena sencilla estén abarcados dentro de la frase “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo. También están abarcadas otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como dianticuerpos. Los dianticuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios VH y VL estén expresados en una sola cadena polipeptídica, pero utilizando un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios en la misma cadena, forzando de ese modo a que los dominios se emparejen con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno [ver, por ejemplo, Hollinger, P. y col., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6.444-6.448; Poljak R. J. y col. (1994) Structure 2: 1.121-1.123]. En la técnica se conocen tales porciones de unión del anticuerpo [Kontermann y Dubel eds., 65 Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, Nueva York. pág. 790 (ISBN 3-540-41354-5)].

Aun más, un anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo puede ser parte de unas moléculas de inmunoadherencia mayores, formadas mediante asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con

una o más de otras proteínas o péptidos. Los ejemplos de tales moléculas de inmunoadherencia incluyen el empleo de la región del núcleo de la estreptavidina para fabricar una molécula scFv tetramérica [Kipriyanov, S. M. y col. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6: 93-101] y el empleo de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una cola de polihistidina C-terminal para fabricar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas [Kipriyanov, S. M. y col. (1994) Mol. Immunol. 31: 1.047-1.058]. Las porciones de anticuerpo, tales como los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>, se pueden preparar a partir de anticuerpos enteros utilizando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos enteros. Más aun, los anticuerpos, las porciones de anticuerpo y las moléculas de inmunoadherencia pueden ser obtenidos utilizando técnicas estándar de ADN recombinante, como se describió aquí.

La frase “anticuerpo aislado”, como se utiliza aquí, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tengan especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-18 está libre sustancialmente de anticuerpos que se unan específicamente a antígenos que no sean el hIL-18). Un anticuerpo aislado que se una específicamente al hIL-18 puede tener, sin embargo, reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de IL-18 de otras especies. Más aún, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

“Anticuerpo monoclonal”, como se utiliza aquí, pretende referirse a una preparación de moléculas de anticuerpo que comparten una secuencia de aminoácidos de cadena pesada común y de cadena ligera común, por contraste con preparaciones de anticuerpo “policlonal” que contienen una mezcla de diferentes anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales se pueden generar por varias tecnologías nuevas como el despliegue en fagos, en bacterias, en levaduras o en ribosomas, así como métodos clásicos ejemplificados por anticuerpos derivados de hibridomas (por ejemplo, un anticuerpo secretado por un hibridoma preparado mediante tecnología de hibridomas, tal como la metodología estándar de hibridomas de Kohler y Milstein [(1975) Nature 256: 495-497]. De este modo, un anticuerpo no derivado de hibridomas de la invención es mencionado todavía como anticuerpo monoclonal, aunque pueda haber sido derivado mediante metodologías no clásicas.

La frase “anticuerpo recombinante” se refiere a anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por métodos recombinantes, tales como los anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados a partir de una librería combinatoria de anticuerpos recombinantes, anticuerpos aislados a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que sea transgénico para genes de inmunoglobulinas humanas [ver, por ejemplo, Taylor y col. (1992) Nucleic Acids Research 20: 6.287-6.295] o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro método que implique el corte y empalme de secuencias genéticas de inmunoglobulinas concretas (tales como secuencias genéticas de inmunoglobulinas humanas) a otras secuencias de ADN. Los ejemplos de anticuerpos recombinantes incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR y humanizados.

La frase “anticuerpo humano”, como se utiliza aquí, pretende incluir anticuerpos teniendo regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o sitio-específica *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDRs y en particular la CDR3. Sin embargo, la frase “anticuerpo humano”, como se utiliza aquí, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie mamífera, tal como un ratón, hayan sido injertadas sobre secuencias marco humanas.

La frase “anticuerpo humano recombinante”, como se utiliza aquí, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que sean preparados, expresados, creados o aislados por métodos recombinantes, tales como los anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado dentro de una célula huésped, anticuerpos aislados de una librería combinatoria de anticuerpos humanos [Hoogenboom H. R., (1997) TIB Tech. 15: 62-70; Azzazy H. y Highsmith W. E., (2002) Clin. Biochem. 35: 425-445; Gaviñondo J. V. y Larrick J. W. (2002) BioTechniques 29: 128-145; Hoogenboom H. y Chames P. (2000) Immunology Today 21: 371-378], anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que sea transgénico para genes de inmunoglobulinas humanas [ver, por ejemplo, Taylor L. D. y col. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6.287-6.295; Kellermann S-A. y Green L. L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 593-597; Little M. y col. (2000) Immunology Today 21: 364-370] o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro método que implique el corte y empalme de secuencias genéticas de inmunoglobulinas humanas a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal humana. En ciertas formas de realización, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes son sometidos a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utilice un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, de este modo, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con las secuencias de VH y VL de línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de anticuerpos de la línea germinal humana *in vivo*.

La frase “anticuerpo quimérico” se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de una especie, tales como anticuerpos teniendo regiones variables de las cadenas pesada y ligera murinas unidas a regiones constantes humanas.

La frase “anticuerpo injertado con CDR” se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de una especie, pero en las que las secuencias de una o más de las regiones

## ES 2 321 030 T3

CDR de VH y/o VL están reemplazadas con secuencias CDR de otra especie, tales como anticuerpos teniendo regiones variables de las cadenas pesada y ligera murinas en las que una o más de las CDRs murinas (por ejemplo, CDR3) han sido reemplazadas con secuencias CDR humanas.

5 La frase “anticuerpo humanizado” se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de una especie no humana (por ejemplo, un ratón), pero en las que al menos una porción de la secuencia VH y/o VL ha sido alterada para que sea más “parecida a la humana”, esto es, más similar a las secuencias variables de la germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado con CDR, en el que las secuencias CDR humanas son introducidas dentro de secuencias VH y VL no humanas para reemplazar las correspondientes secuencias CDR no humanas.

15 El término “epítipo” incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. En ciertas formas de realización, los determinantes epítipos incluyen agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilo o sulfonilo, y, en ciertas formas de realización, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que está unido mediante un anticuerpo. En ciertas formas de realización, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando identifica preferencialmente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

20 La frase “proteína de unión cristalizada”, como se utiliza aquí, se refiere a un polipéptido que existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma de estado sólido de la materia, el cual es distinto de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado líquido cristalino. Los cristales están compuestos de ordenaciones tridimensionales de átomos, iones, moléculas (por ejemplo, proteínas tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (por ejemplo, complejos antígeno/anticuerpo). Estas ordenaciones tridimensionales están dispuestas conforme a relaciones matemáticas específicas que son bien comprendidas en el campo. La unidad fundamental, o elemento estructural, que se repite en un cristal se llama unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que se ajusta a una simetría cristalográfica dada bien definida proporciona la “celda unitaria” del cristal. La repetición de la celda unitaria mediante translaciones regulares en las tres dimensiones proporciona el cristal. Ver Giege R. y Ducruix A. Barret, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2ª ed, págs. 201-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, (1999).

35 El término “polinucleótido”, como se menciona aquí, significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, cualquier termonuclear o desoxirribonucleótido, o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN de cadena sencilla o doble, pero preferentemente es ADN de cadena doble.

40 La frase “polinucleótido aislado”, como se utiliza aquí, significa un polinucleótido (por ejemplo, de origen genómico, de ADNc, o sintético, o alguna combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, el “polinucleótido aislado” no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido con el que el “polinucleótido aislado” se encuentra en la naturaleza; está operablemente unido a un polinucleótido que no esté unido en la naturaleza; o no existe en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

45 El término “vector”, como se utiliza aquí, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que ha sido unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, el cual término se refiere a un bucle de ADN circular de doble cadena dentro del cual se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos de ADN dentro del genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped dentro de la que son introducidos (por ejemplo, vectores bacterianos teniendo un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos. Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) pueden ser integrados dentro del genoma de una célula huésped, en la introducción dentro de una célula huésped, y de ese modo se replican a lo largo del genoma huésped. Más aun, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos. Tales vectores son mencionados aquí como “vectores de expresión recombinante” (o simplemente, “vectores de expresión”). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente especificación, los términos “plásmido” y “vector” se pueden utilizar intercambiamente, ya que el plásmido es la forma de vector más frecuentemente utilizada. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados defectivos para la replicación), los cuales cubren funciones equivalentes.

55 La frase “célula huésped recombinante” (o simplemente “célula huésped”), como se utiliza aquí, pretende referirse a una célula dentro de la que se ha introducido ADN exógeno. Se debería comprender que tales frases pretenden referirse no solamente a la célula asunto concreta, sino a la progenie de tal célula. Por motivo de que pueden ocurrir ciertas modificaciones en las generaciones subsiguientes debido a influencias de las mutaciones o medioambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula madre, pero están todavía incluidas dentro del ámbito de aplicación de la frase - “célula huésped” como se utiliza aquí. Preferentemente, las células huésped incluyen células procariontas y eucariontas seleccionadas de cualquier Reino de la Vida. Las células eucariontas preferidas incluyen células de protistas, fúngicas, vegetales y animales. Muy preferentemente, las células huésped incluyen, pero no se limitan a, la línea celular procarionta *E. coli*; las líneas celulares de mamífero CHO y COS; la línea celular de insectos Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

## ES 2 321 030 T3

Se pueden utilizar técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar según las especificaciones del fabricante, o como se realiza normalmente en la técnica o como se describe aquí. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden ser realizados generalmente según métodos convencionales conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que están citadas y discutidas por toda la presente especificación. Ver, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)], la cual está incorporada mediante referencia para cualquier fin.

El término “cebador” significa un oligonucleótido o una molécula corta de ácido nucleico de banda simple que se une a la secuencia de ADN de interés, y actúa como punto de partida para la síntesis de ácidos nucleicos a partir de la secuencia de ADN de interés.

El término “muestra”, como se utiliza aquí, se utiliza en su más amplio sentido. Una “muestra biológica”, como se utiliza aquí, incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o ser anteriormente vivo. Tales seres vivos incluyen, pero no se limitan a, humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, orina, líquido sinovial, células, órganos, tejidos, médula ósea, nódulos linfáticos y bazo.

Esta invención tiene que ver con la proteína factor intrínseco porcino, con las moléculas de ácido nucleico que codifican para el factor intrínseco porcino, con anticuerpos producidos contra el factor intrínseco porcino, y con compuestos inhibidores que regulen el factor intrínseco porcino. La revelación también proporciona métodos para identificar y obtener la proteína factor intrínseco porcino, la molécula de ácido nucleico del factor intrínseco porcino, y anticuerpos para el factor intrínseco porcino y porciones de esos anticuerpos. Esta invención también demuestra el empleo de esta proteína en ensayos diagnósticos.

El método para producir el factor intrínseco porcino de esta revelación implica las etapas siguientes:

- (a) aislar ARN total de tejido de estómago porcino;
- (b) clonar ADNc, que codifica factor intrínseco porcino, mediante RT-PCR;
- (c) insertar ADNc para factor intrínseco porcino dentro de un vector de expresión;
- (d) expresar la proteína factor intrínseco recombinante en un sistema de células huésped, durante un periodo de tiempo y bajo condiciones apropiadas para la expresión de la proteína; y
- (e) purificar la proteína factor intrínseco.

La invención también supone el examinar la actividad de unión del factor intrínseco a la vitamina B<sub>12</sub>. La invención supone además el comprobar la viabilidad de utilizar factor intrínseco recombinante en un analizador de inmunoensayos automatizado.

El factor intrínseco porcino recombinante de esta invención se puede utilizar en ensayos diagnósticos para detectar los niveles de vitamina B<sub>12</sub> en muestras biológicas.

El Ensayo Diagnóstico para Vitamina B<sub>12</sub> es parte del menú en plataformas para analizadores diagnósticos teniendo marcas tales como “IMx”, “AxSYM” y “ARCHITECT”, todas las cuales están disponibles comercialmente por Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois. El uso pretendido del ensayo es para la determinación cuantitativa de la vitamina B<sub>12</sub> en suero y plasma humanos. El ensayo de vitamina B<sub>12</sub> para los analizadores “IMx” y “AxSYM” se basa en la tecnología del Inmunoensayo Enzimático de Micropartículas (MEIA). El ensayo de vitamina B<sub>12</sub> para el analizador “ARCHITECT” es un Inmunoensayo de Micropartículas Quimioluminiscentes (CMIA).

El factor intrínseco se produce en el estómago. Se une a la vitamina B<sub>12</sub> en el intestino delgado proximal, formando de ese modo un complejo con la vitamina B<sub>12</sub>. Este complejo íntegro se mueve hacia el intestino hasta que alcanza el íleon distal, donde se une a receptores de alta afinidad, específicos para el factor intrínseco, situados en la superficie luminal de las células absorbivas ileales (enterocitos). El complejo factor intrínseco-vitamina B<sub>12</sub> se une rápidamente a estos receptores superficiales, entra en estas células, y finalmente alcanza la circulación portal. De este modo, el factor intrínseco ayuda en el transporte y absorción de la vitamina B<sub>12</sub> en el intestino. La capacidad del factor intrínseco para unirse específicamente a la vitamina B<sub>12</sub> es utilizada como premisa en los ensayos diagnósticos desarrollados en Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois. El nivel de vitamina B<sub>12</sub> en una muestra biológica es determinativo de cuanta vitamina B<sub>12</sub> se une a partículas recubiertas con factor intrínseco.

El porcentaje de identidad entre la secuencia nucleotídica del factor intrínseco porcino y del factor intrínseco humano es el 83% (ver Figs. 4 y 5). El porcentaje de identidad entre la secuencia nucleotídica del factor intrínseco porcino y del factor intrínseco de ratón es el 79% (ver Figs. 4 y 5). El porcentaje de identidad entre la secuencia nucleotídica del factor intrínseco porcino y del factor intrínseco de rata es el 79% (ver Figs. 4 y 5). El porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos del factor intrínseco porcino y del factor intrínseco humano es el 81%

(ver Figs. 6 y 7). El porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos del factor intrínseco porcino y del factor intrínseco de ratón es el 73% (ver Figs. 6 y 7). El porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos del factor intrínseco porcino y del factor intrínseco de rata es el 72% (ver Figs. 6 y 7).

##### 5 Producción del factor intrínseco porcino recombinante

Una vez que se ha aislado el gen que codifica el factor intrínseco porcino, puede ser introducido después en una célula huésped procariota o eucariota mediante el empleo de un vector o construcción. El vector, por ejemplo, un bacteriófago, cósmido o plásmido, puede comprender la secuencia nucleotídica que codifica el factor intrínseco porcino, así como cualquier secuencia reguladora (por ejemplo, promotor) que sea funcional en la célula huésped y sea capaz de lograr la expresión del factor intrínseco porcino codificado por la secuencia nucleotídica. La secuencia reguladora (por ejemplo, promotor) está en asociación operable con, o operablemente unida a, la secuencia nucleotídica (se dice que un promotor está “operablemente unido” con una secuencia codificadora si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificadora). Los promotores apropiados incluyen, por ejemplo, aquellos de genes que codifiquen alcohol deshidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglucoisomerasa, fosfoglicerato quinasa, fosfatasa ácida, T7, TPI, lactasa, metalotioneína, citomegalovirus inmediatamente temprano, proteína ácida de suero, glucoamilasa, y promotores activados en presencia de galactosa, por ejemplo, GAL1 y GAL10. Adicionalmente, las secuencias nucleotídicas que codifiquen otras proteínas, oligosacáridos, lípidos, etc., también pueden ser incluidas dentro del vector, así como otras secuencias reguladoras tales como una señal de poliadenilación (por ejemplo, la señal poli-A del antígeno T del SV40, ovoalbúmina u hormona de crecimiento bovino). La elección de secuencias presentes en la construcción depende de los productos de expresión deseados así como de la naturaleza de la célula huésped.

Como se indicó antes, una vez que se ha construido el vector, puede ser introducido luego en la célula huésped de elección mediante métodos conocidos por aquellos de destreza normal en la técnica, incluyendo, por ejemplo, transfección, transformación y electroporación [ver *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Vol. 1-3, Sambrook y col. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]. Después, se cultiva la célula huésped bajo condiciones apropiadas que permitan la expresión de los genes, conduciendo a la producción del factor intrínseco porcino deseado, el cual es luego recuperado y purificado.

Los ejemplos de células huésped procariotas apropiadas incluyen, por ejemplo, bacterias tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, así como *Cyanobacterias* tales como *Spirulina spp.* (esto es, algas verdeazules). Los ejemplos de células huésped eucariotas apropiadas incluyen, por ejemplo, células de mamíferos, células vegetales, células de levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carisbergensis*, *Lipomyces starkey*, *Candida spp.* tal como *Yarrowia (Candida) lipolytica*, *Kluyveromyces spp.*, *Pichia spp.*, *Trichoderma spp.* o *Hansenula spp.*, o células fúngicas tales como células fúngicas filamentosas, por ejemplo, *Aspergillus*, *Neurospora* y *Penicillium*. Preferentemente, se utilizan células de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadero).

La expresión en una célula huésped se puede realizar de una manera transitoria o estable. La expresión transitoria puede ocurrir a partir de construcciones introducidas que contengan señales de expresión funcionales en la célula huésped, pero las cuales construcciones no repliquen y raramente se integren en la célula huésped, o cuando la célula huésped no esté proliferando. La expresión transitoria también se puede llevar a cabo induciendo la actividad de un promotor regulable operablemente unido al gen de interés, aunque tales sistemas inducibles exhiben frecuentemente un bajo nivel basal de expresión. La expresión estable se puede lograr mediante la introducción de una construcción que pueda integrarse dentro del genoma huésped, o que se replique autónomamente en la célula huésped. La expresión estable del gen de interés puede ser seleccionada mediante el empleo de un marcador seleccionable localizado en o transfectado con la construcción de expresión, seguido por la selección de células que expresen el marcador. Cuando la expresión estable resulte de la integración, el sitio de la integración de la construcción puede acontecer aleatoriamente dentro del genoma huésped, o puede ser elegido como diana mediante el empleo de construcciones conteniendo regiones de homología suficiente con el genoma huésped para la recombinación de la diana con el locus del huésped. Cuando las construcciones sean elegidas como diana para un locus endógeno, todas o algunas de las regiones reguladoras transcripcionales y traduccionales pueden ser proporcionadas por el locus endógeno.

Para preparar un anticuerpo de la invención, se moviliza anticuerpo contra un antígeno (esto es, el factor intrínseco porcino o fragmento del mismo) capaz de provocar la producción del anticuerpo. La presente invención incluye el anticuerpo o anticuerpos aislados movilizados contra el antígeno, así como porciones de anticuerpos o fragmentos de los mismos. Además, los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos monoclonales y recombinantes, y porciones o fragmentos de los mismos. En diversas formas de realización, el anticuerpo o porción del mismo puede constar de secuencias de aminoácidos derivadas totalmente de una única especie, tal como un anticuerpo completamente humano o completamente de ratón, o porción del mismo. En otras formas de realización, el anticuerpo o porción del mismo puede ser un anticuerpo quimérico o un anticuerpo injertado con CDR (CDR, región determinante de complementariedad) u otra forma de anticuerpo humanizado.

Fue inesperado el aislamiento de la molécula de ácido nucleico de la presente invención debido a que no tuvieron éxito los intentos iniciales para obtener moléculas de ácido nucleico utilizando RT-PCR. Después de numerosos intentos (esto es, un total de 10 intentos), se descubrieron cebadores específicos que eran útiles para aislar tales moléculas de ácido nucleico. Ahora, se conoce la secuencia de ADNc del factor intrínseco porcino que se puede utilizar para producir la proteína factor intrínseco recombinante. Esta proteína recombinante puede ser utilizada en ensayos diagnósticos para detectar niveles de vitamina B<sub>12</sub> en muestras biológicas (sangre, plasma) de pacientes.

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran adicionalmente esta invención.

#### Ejemplo I

##### 5 Clonación de Factor Intrínseco Porcino

Se produjo factor intrínseco porcino por las células parietales del estómago porcino. Debido a que las células parietales están sumamente concentradas en la región fúndica del estómago, se utilizó la región fúndica para el aislamiento de ARN total. El tejido estomacal almacenado en solución RNAlater (comprada a Ambion Inc., Austin, Tejas) fue homogeneizado en reactivo TRIzol (comprado a Invitrogen, Carlsbad, California), y se aisló ARN total utilizando el protocolo recomendado por el vendedor. El ARN total aislado a partir de estómago porcino fue utilizado como materia de partida en las reacciones de Reacción en Cadena de la Polimerasa por Transcriptasa Inversa (RT-PCR). Los diseños de los cebadores para RT-PCR se basaron en la conocida homología entre el factor intrínseco humano, de ratón y de rata. Las primeras seis aplicaciones RT-PCR, cada una de las cuales implicó diferentes condiciones de reacción, fallaron para producir el ADNc para factor intrínseco porcino. Se fabricaron cebadores adicionales (esto es, un total de 8 cebadores) y fueron utilizados en todas las combinaciones posibles en la séptima aplicación RT-PCR. En esta séptima aplicación RT-PCR, se obtuvo un fragmento de ADNc para factor intrínseco porcino, mencionado aquí como ADNc 200-1254 FI Porcino (1.054 pb de longitud, ID SEC N° 1, su complementaria inversa ID SEC N° 2, y su secuencia de aminoácidos ID SEC N° 3), utilizando el Cebador Directo huIF200For (ID SEC N° 10) y el Cebador Inverso huIF Inverso 1 (ID SEC N° 11). El perfil de RT-PCR fue como sigue: la etapa RT fue realizada a una temperatura de 42°C durante 25 minutos. Esta etapa fue seguida por la etapa PCR, la cual incluía una etapa de desnaturalización inicial a una temperatura de 94°C durante 30 segundos; después 40 ciclos de las condiciones siguientes: una temperatura de 94°C durante 30 segundos, después una temperatura de 57°C durante 30 segundos, después una temperatura de 72°C durante 1 minuto; seguido por una extensión final a una temperatura de 72°C durante 5 minutos. Para obtener ADNc para factor intrínseco porcino de longitud completa, se fabricaron cebadores adicionales (esto es, un total de 9 cebadores), y se ejecutaron aplicaciones RT-PCR. Las primeras cuatro aplicaciones RT-PCR, cada una de las cuales implicaba diferentes condiciones de reacción, fracasaron para producir el ADNc para factor intrínseco porcino. En la quinta aplicación RT-PCR, se obtuvo un fragmento de ADNc para factor intrínseco porcino (1.234 pb de longitud), mencionado aquí como ADNc<sub>14-1248</sub> FI Porcino, utilizando el Cebador Directo huIF-For14 (ID SEC N° 12) y el Cebador Inverso huIF 1248Rev (ID SEC N° 13). El perfil de RT-PCR fue como sigue: la etapa RT fue realizada a una temperatura de 42°C durante 40 minutos. Esta etapa fue seguida por la etapa PCR, la cual incluía una etapa de desnaturalización inicial a una temperatura de 99°C durante 4 minutos; después 43 ciclos de las condiciones siguientes: una temperatura de 95°C durante 30 segundos, después una temperatura de 61°C durante 30 segundos, después una temperatura de 72°C durante 1 minuto; seguido por una extensión final a una temperatura de 72°C durante 0'5 minutos. Este fragmento de ADNc (1.234 pb de longitud), mencionado aquí como ADNc<sub>14-1248</sub> FI Porcino (representado por la ID SEC N° 4, y su complementaria inversa ID SEC N° 5, y su secuencia de aminoácidos ID SEC N° 6) fue clonado dentro del vector de clonación TA (pCR 2.1, comprado a Invitrogen, Carlsbad, California) y transformado dentro de células Top10 de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, California) para producir el ADNc<sub>14-1248</sub> FI Porcino (ID SEC N° 5).

El ADNc<sub>14-1248</sub> FI Porcino (ID SEC N° 5) fue utilizado como molde para producir la secuencia de ADNc que codifica el péptido maduro del factor intrínseco porcino, mencionado aquí como ADNc<sub>54-1254</sub> FI Porcino-Péptido Maduro. La secuencia nucleotídica de la cadena codificadora de ADNc<sub>54-1254</sub> FI Porcino-Péptido Maduro (1.200 pb de longitud) está indicada por la ID SEC N° 7, su complementaria inversa está indicada por la ID SEC N° 8. La traducción del marco de lectura abierto en la ID SEC N° 7 sugiere que el péptido maduro del factor intrínseco porcino contiene 399 aminoácidos, con una secuencia de aminoácidos indicada por la ID SEC N° 9. El péptido maduro codificado tiene un peso molecular pronosticado de ~44kDa.

Utilizando el ADNc<sub>14-1248</sub> FI Porcino (ID SEC N° 5) como molde, el Cebador Directo pIFMP-ForI (ID SEC N° 14) y el Cebador Inverso pIFMP-RevXhoI (ID SEC N° 15), mediante PCR se amplificó el ADNc que codifica el ADNc<sub>54-1254</sub> FI Porcino-Péptido Maduro. El perfil de PCR fue como sigue: una etapa de desnaturalización inicial a una temperatura de 95°C durante 5 minutos; después 33 ciclos de las condiciones siguientes: una temperatura de 95°C durante 30 segundos, después una temperatura de 57°C durante 30 segundos, después una temperatura de 72°C durante 1 minuto; seguido por una extensión final a una temperatura de 72°C durante 5 minutos. Este fragmento PCR fue subclonado dentro del vector de expresión pGEMEX-1 (comprado a Promega Corporation, Madison, Wisconsin). La proteína expresada era insoluble y formaba cuerpos de inclusión.

Para producir una versión soluble de esta proteína, mediante PCR se amplificó el ADNc que codifica el ADNc<sub>54-1254</sub> FI Porcino-Péptido Maduro, utilizando ADNc<sub>14-1248</sub> FI Porcino (ID SEC N° 5) como molde, el Cebador Directo pIF-PIC-MP-For EcorRI (ID SEC N° 16) y el Cebador Inverso pIF-MP-pMAL-SalI Rev (ID SEC N° 17), y las condiciones PCR siguientes: una etapa de desnaturalización inicial a una temperatura de 95°C durante 5 minutos; después 35 ciclos de las condiciones siguientes: una temperatura de 95°C durante 30 segundos, después una temperatura de 56°C durante 30 segundos, después una temperatura de 72°C durante 1 minuto; seguido por una extensión final a una temperatura de 72°C durante 5 minutos. La PCR resultante fue introducida dentro del vector de expresión pMAL (comprado a Invitrogen, Carlsbad, California) para crear el plásmido pMAL-IF. Este plásmido (pMAL-IF) produce factor intrínseco porcino como proteína de fusión con Proteína de Unión a Maltosa (MBP, ~43 kDa de peso molecular). El peso molecular pronosticado de la proteína de fusión pMAL-IF es ~87 kDa. El componente MBP hizo parcialmente soluble a la proteína factor intrínseco porcino.

## ES 2 321 030 T3

Para incrementar más la solubilidad de la proteína e intensificar el plegamiento adecuado de la proteína, el inserto de ADNc codificando el ADNc<sub>54-1254</sub> FI Porcino-Péptido Maduro fue cortado de pMAL-IF utilizando las enzimas de restricción EcoRI y Sall, e insertado dentro del vector pET32a (comprado a Novagen, Madison, Wisconsin) digerido con EcoRI y Sall. Este vector produce factor intrínseco porcino como proteína de fusión con proteína tiorredoxina (TrX; ~18 kDa de peso molecular). El peso molecular pronosticado de la proteína de fusión pET32a-IF es ~62 kDa. El componente TrX hizo parcialmente soluble a la proteína factor intrínseco porcino.

### Ejemplo II

#### *Expresión de Factor Intrínseco Porcino Recombinante en E. coli*

Se produjo factor intrínseco porcino recombinante en *E. coli* expresando la proteína a partir del vector pMAL-IF, así como del vector pET32a-IF, por inducción del promotor T7 utilizando IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido). Las células fueron recolectadas durante tres horas después de la inducción en un caso, y durante cuatro horas después de la inducción en otro caso. Las células recolectadas de *E. coli* fueron lisadas, y el lisado celular se clarificó por centrifugación. El lisado clarificado se cargó en una columna de afinidad con anticuerpos anti-factor intrínseco. El factor intrínseco recombinante se unió a la columna de afinidad. La columna fue lavada con tampón salino tamponado con fosfato (PBS) para eliminar cualquier proteína no unida. El factor intrínseco que se unió a la columna fue eluido con tampón de glicina. Refiriéndonos ahora a la Fig. 1, la banda 1 contiene marcadores de peso molecular (marcados en kilodaltons). Las bandas 2 y 4 contienen muestras tomadas a la hora post-inducción 0 (HPI 0). Las bandas 3 y 5 contienen muestras tomadas a HPI 4 y HPI 3. La banda 6 representa la pasta celular (células después de concentración y centrifugación). La banda 8 contiene el factor intrínseco porcino nativo [purificado a partir de tripa de cerdo (*Sus scrofa*)].

### Ejemplo III

#### *Demostración de la Actividad de Unión de Factor Intrínseco Porcino*

##### *A. Unión a la vitamina B<sub>12</sub> en blots de conjugado*

El factor intrínseco recombinante se unió a la vitamina B<sub>12</sub>, como se demostró utilizando un blot de conjugado de vitamina B<sub>12</sub>-fosfatasa alcalina. El lisado de *E. coli* conteniendo el factor intrínseco porcino recombinante expresado fue aplicado en un SDS-PAGE (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida), y se transfirió el gel a una membrana de nitrocelulosa. Este blot fue investigado con conjugado de vitamina B<sub>12</sub>-fosfatasa alcalina y desarrollado utilizando un sustrato adecuado. La banda de la proteína factor intrínseco recombinante desarrolló color, demostrando de ese modo que el factor intrínseco se unió a la vitamina B<sub>12</sub>. Refiriéndonos ahora a la Fig. 2, la banda 1 contiene marcadores de peso molecular (marcados en kilodaltons). Las bandas 2, 3, 4 y 5 representan células de diversos clones expresando factor intrínseco porcino recombinante. La banda 6 contiene el factor intrínseco porcino nativo [purificado a partir de tripa de cerdo (*Sus scrofa*)]. La banda de proteína factor intrínseco recombinante desarrolló color, demostrando de ese modo que el factor intrínseco se unió a la vitamina B<sub>12</sub>.

##### *B. Unión a Anticuerpo anti-factor intrínseco en Western blots*

Se demostró la unión del factor intrínseco porcino recombinante a anticuerpo anti-factor intrínseco utilizando Western blotting. El lisado de *E. coli* conteniendo el factor intrínseco porcino recombinante expresado fue aplicado en un SDS-PAGE (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida), y se transfirió el gel a una membrana de nitrocelulosa. Este blot fue investigado con anticuerpo anti-factor intrínseco y desarrollado utilizando un sustrato adecuado. La banda de proteína factor intrínseco recombinante desarrolló color, demostrando de ese modo que el factor intrínseco recombinante fue reconocido por el anticuerpo. Refiriéndonos ahora a la Fig. 3, la banda 1 contiene marcadores de peso molecular (marcados en kilodaltons). Las bandas 2, 3, 4 y 5 representan células de diversos clones expresando factor intrínseco porcino recombinante. La banda 6 contiene el factor intrínseco porcino nativo [purificado a partir de tripa de cerdo (*Sus scrofa*)]. La banda de proteína factor intrínseco recombinante desarrolló color, demostrando de ese modo que el factor intrínseco recombinante fue reconocido por el anticuerpo.

##### *C. Viabilidad de Utilizar Factor Intrínseco Porcino Recombinante en Ensayos Diagnósticos "AxSYM" y "ARCHITECT" para Vitamina B<sub>12</sub>*

Se midió la capacidad de unión a la vitamina B<sub>12</sub> del factor intrínseco porcino recombinante utilizando un Ensayo de Capacidad de Unión del Factor Intrínseco "ARCHITECT". El ensayo es un ensayo competitivo de una etapa donde el factor intrínseco de la muestra de ensayo compite con factor intrínseco recubierto sobre micropartículas por el trazador de vitamina B<sub>12</sub>-acridinio. De este modo, la señal en el ensayo es inversamente proporcional a la concentración de factor intrínseco en la muestra de ensayo. Los resultados se leen a partir de una curva de calibración de vitamina B<sub>12</sub>, y los resultados de concentración de vitamina B<sub>12</sub> son transformados en capacidad de unión utilizando una ecuación. Se determinó que el Valor de Capacidad de Unión para el factor intrínseco porcino recombinante era 904 ng/ml.

## ES 2 321 030 T3

### Ejemplo IV

El ensayo de B12 "ARCHITECT" es un ensayo de dos etapas, con un pretratamiento automatizado de la muestra, para determinar la presencia de vitamina B<sub>12</sub> en suero y plasma humanos utilizando la tecnología del Inmunoensayo de Micropartículas Quimioluminiscentes (CMIA) con protocolos de ensayo flexibles. El analizador "ARCHITECT" y el método para utilizar el analizador "ARCHITECT" están descritos en la Patente U.S. N° 5.795.784, la totalidad de la cual está incorporada aquí como referencia. El ensayo para vitamina B<sub>12</sub> está descrito en el ARCHITECT™ System B12, N° de Lista 6C09, 69-0689/R1, diciembre de 1998, Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, la totalidad de la cual está incorporada aquí como referencia. Se combinan la muestra y el Reactivo de Pretratamiento 1, el Reactivo de Pretratamiento 2 y el Reactivo de Pretratamiento 3. Se aspira una alícuota de la muestra pretratada y se transfiere dentro de un nuevo recipiente de reacción. Se combinan la muestra pretratada, diluyente del ensayo y micropartículas paramagnéticas recubiertas con factor intrínseco. La vitamina B<sub>12</sub> presente en la muestra se une a las micropartículas recubiertas con factor intrínseco. Después de lavar, en la segunda etapa se añade conjugado de vitamina B<sub>12</sub> marcado con acridinio. El conjugado de vitamina B<sub>12</sub> marcado con acridinio es capaz de experimentar una reacción quimioluminiscente. Después se añaden soluciones Preactivadora y Activadora a la mezcla de reacción; la reacción quimioluminiscente resultante se mide como unidades relativas de luz. Existe una relación inversa entre la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> en la muestra y las unidades relativas de luz detectadas por el sistema óptico "ARCHITECT".

En el Manual de Operaciones del Sistema "ARCHITECT" se pueden encontrar detalles adicionales sobre el sistema y la tecnología del ensayo, la totalidad del cual está incorporado aquí como referencia. Los reactivos para el ensayo están descritos abajo (las cantidades por botella son para 100 ensayos):

Micropartículas recubiertas con factor intrínseco porcino en tampón borato con estabilizantes proteicos (bovinos). Conservante: agentes antimicrobianos. (1 botella, 6'6 ml/botella)

Conjugado de B12 marcado con acridinio en tampón MES. Concentración mínima: 0'7 ng/ml. Conservante: agente antimicrobiano. (1 botella, 5'9 ml/botella)

Diluyente del Ensayo B12 conteniendo tampón borato con EDTA. Conservante: agentes antimicrobianos. (1 botella, 10 ml/botella)

Reactivo de Pretratamiento 1 B12 conteniendo hidróxido sódico 1'0N con 0'005% de cianuro potásico. (1 botella, 27 ml/botella)

Reactivo de Pretratamiento 2 B12 conteniendo alfa-monotiglicerol y EDTA. (1 botella, 5'5 ml/botella)

Reactivo de Pretratamiento 3 B12 conteniendo dicianuro de cobinamida en tampón borato con estabilizantes proteicos (aviarios). Conservante: azida sódica. (1 botella, 5'5 ml/botella)

Diluyente Manual para Multi-Ensayo "ARCHITECT" conteniendo solución salina tamponada con fosfato. Conservante: agente antimicrobiano. (1 botella, 100 ml/botella)

Solución Preactivadora "ARCHITECT" conteniendo 1'32% (p/v) de peróxido de hidrógeno.

Solución Activadora "ARCHITECT" conteniendo hidróxido sódico 0'35N.

Tampón de Lavado "ARCHITECT" conteniendo solución salina tamponada con fosfato. Conservante: agente antimicrobiano.

### Ejemplo V

El ensayo "AxSYM" B12 está basado en la tecnología del Inmunoensayo Enzimático de Micropartículas (MEIA). El analizador "AxSYM" y el método para utilizar el analizador "AxSYM" están descritos en la Patente U.S. N° 5.358.691, la totalidad de la cual está incorporada aquí como referencia. El ensayo para vitamina B<sub>12</sub> está tratado en el Sistema B12 AxSYM® de Abbott, N° de Lista 3C79, 69-0912/R2, febrero de 1999, Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, la totalidad del cual está incorporado aquí como referencia.

Los reactivos "AxSYM" B12 y la muestra son pipeteados en la secuencia siguiente:

La muestra y todos los reactivos "AxSYM" B12 necesarios para un ensayo son pipeteados mediante la Sonda de Muestreo en diversos pocillos de un Recipiente de Reacción. El Extrayente 1 y el Extrayente 2 son combinados en un pocillo del Recipiente de Reacción. En otro pocillo del Recipiente de Reacción se combinan la Muestra, el Desnaturalizante y una porción de la mezcla Extrayente. El Recipiente de Reacción es transferido inmediatamente al Centro de Procesamiento. En el Centro de Procesamiento se realiza un pipeteado adicional con la Sonda de Procesamiento. A la mezcla de reacción se añaden micropartículas recubiertas con factor intrínseco. La vitamina B<sub>12</sub> presente en la muestra se une a las micropartículas recubiertas con factor intrínseco, formando un complejo conteniendo vitamina B<sub>12</sub> y micropartículas recubiertas con factor intrínseco. A la celda de la matriz se transfiere una alícuota de la mezcla de

## ES 2 321 030 T3

reacción. Las micropartículas se unen irreversiblemente a la matriz de fibra de vidrio. Se lava la celda de la matriz para eliminar las materias no unidas a las micropartículas. En la celda de la matriz se dispensa el conjugado de vitamina B<sub>12</sub>-fosfatasa alcalina, formándose de ese modo un complejo conteniendo vitamina B<sub>12</sub>, micropartículas recubiertas con factor intrínseco, y conjugado. El conjugado de vitamina B<sub>12</sub>-fosfatasa alcalina es capaz de formar un producto fluorescente. Se lava la celda de la matriz para eliminar el conjugado no unido. Se adiciona el sustrato 4-metilumbeliferilfosfato a la celda de la matriz, y el producto fluorescente se mide mediante el montaje óptico MEIA. El sustrato 4-metilumbeliferilfosfato es un material fluorogénico. En el Manual de Operaciones del Sistema "AxSYM" se pueden encontrar detalles adicionales sobre el sistema y la tecnología del ensayo, la totalidad del cual está incorporado aquí como referencia. Abajo se describen los reactivos para el ensayo (las cantidades por botella, para los artículos en el Paquete de reactivos, son para 100 ensayos):

### *Paquete de reactivos*

#### 15 *Desnaturalizante de B12*

Desnaturalizante de B12: Hidróxido sódico 0'8N con 0'005% de cianuro potásico suministrado en una botella aparte del Paquete Dual (1 botella, 13'0 ml/botella)

#### 20 *Paquete Reactivo A*

Extrayente 1: Dicianuro de cobinamida en tampón borato con estabilizante proteico (aviar). Conservante: azida sódica (1 botella, 8'7 ml/botella)

25 Extrayente 2: Alfa-monotioglicerol en EDTA. (1 botella, 3'8 ml/botella)

Micropartículas recubiertas con Factor Intrínseco Porcino en tampón borato con estabilizante proteico (bovino). Conservante: azida sódica (1 botella, 14'1 ml/botella)

#### 30 *Paquete Reactivo B*

35 Conjugado de B12-fosfatasa alcalina (bovina) en tampón TRIS con estabilizante proteico (bovino). Concentración mínima: 0'1 µg/ml. Conservante: azida sódica (1 botella, 12'5 ml/botella).

Desnaturalizante de B12: Hidróxido sódico 0'8N con 0'005% de cianuro potásico (1 botella, 13'0 ml/botella).

40 Micropartículas recubiertas con Factor Intrínseco Porcino en tampón borato con estabilizante proteico (bovino). Conservante: azida sódica (1 botella, 14'1 ml/botella).

### *Otros reactivos (no en el paquete de reactivos)*

45 Solución 1 (MUP): contiene 4-metilumbeliferilfosfato, 1'2 mM, en tampón AMP. Conservante: azida sódica. (4 botellas, 230 ml/botella)

Solución 3 (Lavado de la Celda de la Matriz): contiene cloruro sódico 0'3M en tampón TRIS.

50 Conservantes: azida sódica y agentes antimicrobianos. (4 botellas, 100 ml/botella)

Solución 4 (diluyente de la línea): contiene tampón fosfato 0'1M. Conservante: azida sódica y agente antimicrobiano (1 botella, 10 (/botella).

55 Solución de Limpieza de la Sonda AxSYM: contiene 2% de hidróxido de tetraetilamonio (TEAH) (2 botellas, 220 ml/botella).

60 Las micropartículas recubiertas con factor intrínseco porcino están fabricadas típicamente de un material tal como poliestireno, y pueden variar desde aproximadamente 0'5 micrómetros hasta aproximadamente 15 micrómetros de diámetro. Las micropartículas tienen grupos funcionales en la superficie de las mismas, tales como, por ejemplo, grupos carboxilo o grupos amino, que son útiles para acoplamiento a proteínas u otras moléculas. Este acoplamiento puede ser pasivo o activo. En el acoplamiento activo, se utiliza un reactivo activador tal como, por ejemplo, EDAC.

65 Para micropartículas recubiertas con factor intrínseco porcino para su uso en el ensayo de B12 "ARCHITECT", el factor intrínseco porcino es covalente acoplado a micropartículas carboxiladas utilizando el método de activación de la EDAC. La EDAC [clorhidrato de 1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida] se utiliza para activar grupos carboxilo en la micropartícula, los cuales grupos pueden experimentar acoplamiento con grupos amino en la proteína (esto es, el factor intrínseco porcino).

## ES 2 321 030 T3

Para micropartículas. recubiertas con factor intrínseco porcino para su uso en el ensayo de B12 "AxSYM", el anticuerpo anti-factor intrínseco es acoplado primero a las micropartículas utilizando EDAC. Después, se añade el factor intrínseco porcino a estas micropartículas. El factor intrínseco porcino se une al anticuerpo anti-factor intrínseco revestido sobre las micropartículas, por lo que las micropartículas están ahora recubiertas con factor intrínseco porcino.

La carga de factor intrínseco porcino sobre las micropartículas es determinada por el diseñador del ensayo, y la carga adecuada puede ser fácilmente determinada por uno de habilidad normal en la técnica.

Abajo se listan las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos mencionadas en la especificación:

*Lista de las secuencias nucleotídica y de aminoácidos para los clones de ADNc para el factor intrínseco porcino*

ID SEC. N° 1: representa la secuencia nucleotídica del ADNc 200-1254 FI Porcino (1.054 pb)

5'-

TACAACTTGAAGGCCAGAAAGCTCCTGACTTACAAGCTCATGGCTACCAA  
CACCTCCGACCTGACCACAGGTCAGCTCGCCCTCACCATCATGGCACTCA  
CCTCCTCCTGCCGAGACCCTGGGAACAGAATAGCCATTCTACAGGGGCAA  
ATGGAGAAGTGGGCACCTCCAAGCCTTGATACCCATGCTTCAACCTTCTA  
CGAGCCAAGTCTGGGGATCCTGACGCTGTGCCAGAATAACCCGGAGAAG  
ACCTTACCGCTAGCAGCCCGTTTTGCCAAGACCCTGCTGGCCAATTCCTC  
TCCCTTCAACATGGACACAGGAGCAATGGCAACCTTGGCCCTGACCTGTA  
TGTAACAAGATCCCCGTAGGCTCAGAGGAAGGGTACAGAGCCCTGTTC  
AGTCAGGTAAGGAAATACTGTGGAGAATATCAGCATGAGGATCCAAGA  
CAACGGAATCATTGGAAACATCTATAGCACTGGCCTCGCCATGCAGGCTC  
TCTCTGTGACACCTGAGCAACCTAACAAGGAGTGGGACTGCCAGAAGACC  
ATGGATACTGTACTTACTGAGATTAAGGAGGGGAAATTCCACAACCCCAT  
GGCCATTGCCCAAATCCTCCCTTCCCTGAAAGGCAAGACCTATCTAGATG  
TGCCCATGTGTCTTGCAGCCCTGGTCATGAGGTGCCACCAACTCTACCC  
AACCACCCAGCCCTGTTCCCACCCAGCACCCAACATCACCGTCATATA  
CACCATAAATAACCAGCTGAGGGGCGTGGAGCTGCTCTTCAATGAAACCA  
TCAGTGTTAGTGTGAAAAGAGGATCCGTGCTACTTATTGTCCTGGAGGAG  
GCACAGCGCAAAAACCCCAAGTTCAAATTTGAAACGACAATGACGTCCTG  
GGGACCGGTGGTCTCTTCTATTAACAATATCGCTGAAAATGTCAACCACAG  
GACGTAAGTGGCAGTTTCTGAGTGGCCAAACGCCCTTAAACGAAGGAGTTG  
CGGACTATATACCCTTCAACCACGAGCACATCACAGCCAATTTACACAGT  
ACTAA-3'

## ES 2 321 030 T3

ID SEC. Nº 2: representa la complementaria inversa de la secuencia nucleotídica del ADNc 200-1254 FI Porcino (1.054 pb)

5 5'-  
TTAGTACTGTGTGAAATTGGCTGTGATGTGCTCGTGGTTGAAGGGTATATA  
GTCCGCAACTCCTTCGTTTAAGGGCGTTTGGCCACTCAGAACTGCCAGT  
10 ACGTCCTGTGGTTGACATTTTCAGCGATATTGTTAATAGAAGAGACCACCG  
GTCCCAGGACGTCATTGTCGTTTCAAATTTGAACTTGGGGTTTTTGGCGCT  
15 GTGCCTCCTCCAGGACAATAAGTAGCACGGATCCTCTTTTCACACTAACAC  
TGATGGTTTCATTGAAGAGCAGCTCCACGCCCTCAGCTGGTTATTTATG  
GTGTATATGACGGTGATGTTGGGTGCTGGGGTGGGAACAGGGCTGGGGT  
20 GGTGGGTAGAGTTGGTGGCACCTCATGAÇCAGGGCTGCAAGACACATG  
GGGCACATCTAGATAGGTCTTGCCTTTCAGGGAAGGGAGGATTTGGGCAA  
25 TGGCCATGGGGTTGTGGAATTTCCCCTCCTTAATCTCAGTAAGTACAGTAT  
CCATGGTCTTCTGGCAGTCCCCTCCTTGTAGGTTGCTCAGGTGTCACA  
GAGAGAGCCTGCATGGCGAGGCCAGTGCTATAGATGTTTCCAATGATTCC  
30 GTTGTCTTGGATCCTCATGCTGATATTCTCCACAGTATTCCTCAGTACCTG  
ACTGAACAGGGCTCTGTACCCTTCTCTGAGCCTACGGGGATCTTGTTGT  
35 ACATACAGGTCAGGGCCAAGGTTGCCATTGCTCCTGTTGTCCATGTTGAA  
GGGAGAGGAATTGGCCAGCAGGGTCTTGGCAAACGGGCTGCTAGCGGT  
40 AAGGTCTTCTCCGGGTTATTCTGGCACAGCGTCAGGATCCCCAGACTTGG  
CTCGTAGAAGGTTGAAGCATGGGTATCAAGGCTTGGAGGTGCCCAGTTCT  
CCATTTGCCCTGTAGAATGGCTATTCTGTTCCAGGGTCTCGGCAGGAG  
45 GAGGTGAGTGCCATGATGGTGAGGGCGAGCTGACCTGTGGTCAGGTCGG  
AGGTGTTGGTAGCCATGAGCTTGTAAGTCAGGAGCTTCTGGGCCTTCAAG  
50 TTGTA-3'

ID SEC. Nº 3: representa la secuencia de aminoácidos del ADNc 200-1254 FI Porcino (351 aa)

55 YNLKAQKLLTYKLMATNTSDLTTGQLALTIMALTSSCRDPGNRIAILQGQ MEN  
WAPPSLDTHASTFYEPSLGILTLQNNPEKTLPLAARFAKLLANSSPFNMDT  
60 GAMATLALTCMYNKIPVGSEEGYRALFSQVLRNTVENISMRIQDNGIIGNIYST  
GLAMQALSVTPEQPKNKEWDCQKTMDTVL TEIKEGKFHNPMAIAQILPSLKGKT  
YLDVPHVSCSPGHEVPPTLPNHPSVPPTPAPNITVIYTINNQLRGVELLFNETIS  
65 VSVKRGSVLLIVLEEAQRKNPKFKFETTMTSWGPVVSSINNI AENVNHRTYWQ  
FLSGQTPLNEG VADYIPFNHEHITANFTQY

ES 2 321 030 T3

ID SEC. Nº 4: representa la secuencia nucleotídica del ADNc<sub>14-1248</sub> FI Porcino (1.234 pb)

5'-

5 CCTCTACCTCCTGAGCCTTCTCTGGGCTGTGGCCGGAACCAGCACCCAG  
ACCCGAAGCTCATGCTCTGTTCCCTCTGCAGAGCAGCCCTTGGTTAATGG  
10 CATCCAGGTGCTCATGGAGCAGTCCGTGACCAGCTCGGCCTTCCCAAAC  
CCCAGCATCCTGATTGCCATGAACCTGGCCGGAGCCTACAACACAGAGG  
CCCAGGAGCTCCTGACTTACAAGCTCATGGCTACCAACACCTCCGACCTG  
15 ACCACAGGTCAGCTCGCCCTCACCATCATGGCACTCACCTCCTCCTGCCG  
AGACCCTGGGAACAGAATAGCCATTCTACAGGGGCAAATGGAGAACTGG  
GCACCTCCAAGCCTTGATACCCATGCTTCAACCTTCTACGAGCCAAGTCT  
20 GGGGATCCTGACGCTGTGCCAGAATAACCCGGAGAAGACCTTACCGCTA  
GCAGCCCGTTTTGCCAAGACCCTGCTGGCCAATTCCTCTCCCTTCAACAT  
25 GGACACAGGAGCAATGGCAACCTTGGCCCTGACCTGTATGTACAACAAGA  
TCCCCGTAGGCTCAGAGGAAGGGTACAGAGCCCTGTTGAGTCAGGTA  
GAGGAATACTGTGGAGAATATCAGCATGAGGATCCAAGACAACGGAATCA  
30 TTGGAAACATCTATAGCACTGGCCTCGCCATGCAGGCTCTCTCTGTGACA  
CCTGAGCAACCTAACAAGGAGTGGGACTGCCAGAAGACCATGGATACTGT  
35 ACTTACTGAGATTAAGGAGGGGAAATTCCACAACCCCATGGCCATTGCC  
AAATCCTCCCTTCCCTGAAAGGCAAGACCTATCTAGATGTGCCCATGTGT  
40 CTTGCAGCCCTGGTCATGAGGTGCCACCAACTCTACCCAACCACCCAGC  
CCTGTTCCACCCAGCACCCAACATCACCGTCATATACACCATAAATAAC  
CAGCTGAGGGGCGTGGAGCTGCTCTTCAATGAAACCATCAGTGTTAGTGT  
45 GAAAAGAGGATCCGTGCTACTTATTGTCTGGAGGAGGCACAGCGCAAAA  
ACCCCAAGTTCAAATTTGAAACGACAATGACGTCCTGGGGACCGGTGGTC  
50 TCTTCTATTAACAATATCGCTGAAAATGTCAACCACAGGACGTA  
TTTCTGAGTGGCCAAACGCCCTTAAACGAAGGAGTTGCGGACTATATACC  
CTTCAACCACGAGCACATCACAGCCAATTTACACAG-3'

55

60

65

ES 2 321 030 T3

ID SEC. Nº 5: representa la complementaria inversa de la secuencia nucleotídica del ADNc<sub>14-1248</sub> FI Porcino (1.234 pb)

5           **5'-**  
          CTGTGTGAAATTGGCTGTGATGTGCTCGTGGTTGAAGGGTATATAGTCCG  
          CAACTCCTTCGTTTAAGGGCGTTTGGCCACTCAGAACTGCCAGTACGTC  
10           CTGTGGTTGACATTTTCAGCGATATTGTTAATAGAAGAGACCACCGGTCCC  
          CAGGACGTCATTGTCGTTTCAAATTTGAACTTGGGGTTTTTGCCTGTGCC  
15           TCCTCCAGGACAATAAGTAGCACGGATCCTCTTTTCACACTAACACTGATG  
          GTTTCATTGAAGAGCAGCTCCACGCCCTCAGCTGGTTATTTATGGTGTAT  
          ATGACGGTGTGTTGGGTGCTGGGGTGGGAACAGGGCTGGGGTGGTTG  
20           GGTAGAGTTGGTGGCACCTCATGACCAGGGCTGCAAGACACATGGGGCA  
          CATCTAGATAGGTCTTGCCTTTCAGGGAAGGGAGGATTTGGGCAATGGCC  
25           ATGGGGTTGTGGAATTTCCCCTCCTTAATCTCAGTAAGTACAGTATCCATG  
          GTCTTCTGGCAGTCCCCTCCTTGTAGGTTGCTCAGGTGTCACAGAGAG  
          AGCCTGCATGGCGAGGCCAGTGCTATAGATGTTTCCAATGATTCCGTTGT  
30           CTTGGATCCTCATGCTGATATTCTCCACAGTATTCTCAGTACCTGACTGA  
          ACAGGGCTCTGTACCCTTCTCTGAGCCTACGGGGATCTTGTTGTACATA  
35           CAGGTCAGGGCCAAGGTTGCCATTGCTCCTGTGTCCATGTTGAAGGGAGA  
          GGAATTGGCCAGCAGGGTCTTGGCAAACGGGCTGCTAGCGGTAAGGTC  
          TTCTCCGGGTTATTCTGGCACAGCGTCAGGATCCCCAGACTTGGCTCGTA  
40           GAAGGTTGAAGCATGGGTATCAAGGCTTGGAGGTGCCAGTTCTCCATTT  
          GCCCCTGTAGAATTGGCTATTCTGTTCCAGGGTCTCGCAGGAGGAGGTG  
45           AGTGCCATGATGGTGAGGGCGAGCTGACCTGTGGTCAGGTCGGAGGTGT  
          TGGTAGCCATGAGCTTGTAAGTCAGGAGCTCCTGGGCCTCTGTGTTGTAG  
50           GCTCCGGCCAGGTTTCATGGCAATCAGGATGCTGGGGTTTGGGAAGGCCG  
          AGCTGGTCACGACTGCTCCATGAGCACCTGGATGCCATTAACCAAGGG  
          CTGCTCTGCAGAGGGAACAGAGCATGAGCTTCGGGTCTGGGTGCTGGTT  
55           CCGGCCACAGCCCAGAGAAGGCTCAGGAGGTAGAGG-3'

60

65

## ES 2 321 030 T3

ID SEC. N° 6: representa la secuencia de aminoácidos del ADNc<sub>14-1248</sub> FI Porcino (411 aa)

5  
10  
15  
20  
LYLLSLLWAVAGTSTQTRSSCSVPSAEQPLVNGIQVLMEQSVTSSAFPNSIL  
AMNLAGAYNTEAQELLYKLMATNTSDLTTGQLALTIMALTSSCRDPGNRIAIL  
QGQMENWAPPSLDTHASTFYEPSLGILTLCQNNPEKTLPLAARFAKTLLANSS  
PFNMDTGAMATLALTCMYNKIPVGSEEGYRALFSQVLRNTVENISMRIQDNGI  
IGNIYSTGLAMQALSVTPEQPKNKEWDCQKTMDTVLTEIKEGKFHNPMAIAQIL  
PSLKGTKYLDVPHVSCSPGHEVPPTLPNHPSPVPTPAPNITVIYTINNQLRGVE  
LLFNETISVSVKRGSVLLIVLEEAQRKNPKFKFETTMTSWGPVSSINNIAENV  
NHRTYWQFLSGQTPLNEGVADYIPFNHEHITANFTQ

20 ID SEC. N° 7: representa la secuencia nucleotídica del ADNc<sub>54-1254</sub> FI Porcino-Péptido Maduro (1.200 pb)

5'-

25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65  
AGCACCCAGACCCGAAGCTCATGCTCTGTTCCCTCTGCAGAGCAGCCCTT  
GGTTAATGCATCCAGGTGCTCATGGAGCAGTCCGTGACCAAGCTCGGCCT  
TCCCAAACCCAGCATCCTGATTGCCATGAACCTGGCCGGAGCCTACAAC  
ACAGAGGCCAGGAGCTCCTGACTTACAAGCTCATGGCTACCAACACCTC  
CGACCTGACCACAGGTCAGCTCGCCCTCACCATCATGGCACTCACCTCCT  
CCTGCCGAGACCCTGGGAACAGAATAGCCATTCTACAGGGGCAAATGGA  
GAACTGGGCACCTCCAAGCCTTGATACCCATGCTTCAACCTTCTACGAGC  
CAAGTCTGGGGATCCTGACGCTGTGCCAGAATAACCCGGAGAAGACCTTA  
CCGCTAGCAGCCCGTTTTGCCAAGACCCTGCTGGCCAATTCCTCTCCCTT  
CAACATGGACACAGGAGCAATGGCAACCTTGGCCCTGACCTGTATGTACA  
ACAAGATCCCCGTAGGCTCAGAGGAAGGGTACAGAGCCCTGTTTCAAGTCA  
GGTACTGAGGAATACTGTGGAGAATATCAGCATGAGGATCCAAGACAACG  
GAATCATTGGAAACATCTATAGCACTGGCCTCGCCATGCAGGCTCTCTCT  
GTGACACCTGAGCAACCTAACAAGGAGTGGGACTGCCAGAAGACCATGG  
ATACTGTACTTACTGAGATTAAGGAGGGGAAATTCCACAACCCCATGGCC  
ATTGCCCAAATCCTCCCTTCCCTGAAAGGCAAGACCTATCTAGATGTGCC  
CCATGTGTCTTGCAGCCCTGGTCATGAGGTGCCACCAACTCTACCCAACC  
ACCCAGCCCTGTTCCACCCAGCACCCAACATCACCGTCATATACACC  
ATAAATAACCAGCTGAGGGGCGTGGAGCTGCTCTTCAATGAAACCATCAG  
TGTTAGTGTGAAAAGAGGATCCGTGCTACTTATTGTCCTGGAGGAGGCAC  
AGCGCAAAAACCCCAAGTTCAAATTTGAAACGACAATGACGTCCTGGGGA  
CCGGTGGTCTCTTCTATTAACAATATCGCTGAAAATGTCAACCACAGGACG

ES 2 321 030 T3

TACTGGCAGTTTCTGAGTGGCCAAACGCCCTTAAACGAAGGAGTTGCGGA  
CTATATACCCTTCAACCACGAGCACATCACAGCCAATTTACACAGTACTA  
A-3'

ID SEC. N° 8: representa la complementaria inversa de la secuencia nucleotídica del ADNc<sub>54-1254</sub> FI Porcino-  
Péptido Maduro (1.200 pb)

5'-

TTAGTACTGTGTGAAATTGGCTGTGATGTGCTCGTGGTTGAAGGGTATATA  
GTCCGCAACTCCTTCGTTTAAGGGCGTTTGGCCACTCAGAACTGCCAGT  
ACGTCCTGTGGTTGACATTTTCAGCGATATTGTTAATAGAAGAGACCACCG  
GTCCCAGGACGTCATTGTCGTTTCAAATTTGAACTTGGGGTTTTTGCCT  
GTGCCTCCTCCAGGACAATAAGTAGCACGGATCCTCTTTTCACACTAACAC  
TGATGGTTTCATTGAAGAGCAGCTCCACGCCCTCAGCTGGTTATTTATG  
GTGTATATGACGGTGTGTTGGGTGCTGGGGTGGGAACAGGGCTGGGGT  
GGTTGGGTAGAGTTGGTGGCACCTCATGACCAGGGCTGCAAGACACATG  
GGGCACATCTAGATAGGTCTTGCCTTTCAGGGAAGGGAGGATTTGGGCAA  
TGGCCATGGGGTTGTGGAATTTCCCCTCCTTAATCTCAGTAAGTACAGTAT  
CCATGGTCTTCTGGCAGTCCCCTCCTTGTTAGGTTGCTCAGGTGTCACA  
GAGAGAGCCTGCATGGCGAGGCCAGTGCTATAGATGTTTCCAATGATTCC  
GTTGTCTTGGATCCTCATGCTGATATTCTCCACAGTATTCTCAGTACCTG  
ACTGAACAGGGCTCTGTACCCTTCTCTGAGCCTACGGGGATCTTGTTGT  
ACATACAGGTCAGGGCCAAGGTTGCCATTGCTCCTGTGTCCATGTTGAAG  
GGAGAGGAATTGGCCAGCAGGGTCTTGGCAAACGGGGCTGCTAGCGGTA  
AGGTCTTCTCCGGGTTATTCTGGCACAGCGTCAGGATCCCCAGACTTGGC  
TCGTAGAAGGTTGAAGCATGGGTATCAAGGCTTGGAGGTGCCAGTTCTC  
CATTTGCCCTGTAGAATGGGTATTCTGTTCCCAGGGTCTCGGCAGGAGG  
AGGTGAGTGCCATGATGGTGAGGGCGAGCTGACCTGTGGTCAGGTCGGA  
GGTGTGGTAGCCATGAGCTTGTAAAGTCAGGAGCTCCTGGGCCTCTGTGT  
TGTAGGCTCCGGCCAGGTTTCATGGCAATCAGGATGCTGGGGTTTGGGAA  
GGCCGAGCTGGTCACGGACTGCTCCATGAGCACCTGGATGCCATTAACC  
AAGGGCTGCTCTGCAGAGGGAACAGAGCATGAGCTTCGGGTCTGGGTGC  
T-3'

## ES 2 321 030 T3

ID SEC. N° 9: representa la secuencia de aminoácidos del ADNc<sub>54-1254</sub> FI Porcino-Péptido Maduro (399 aa)

5           **STQTRSSCSVPSAEQPLVNGIQVLMEQSVTSSAFPNP SILIAMNLAGAYNTEA**  
            **QELLYKLMATNTSDLTTGQLALTIMALTSSCRDPGNRIAILQGQ MENWAPPS**  
            **LDTHASTFYEPSLGIL TLCQNNPEKTLPLAARFAKLLANSSPFNMDTGAMAT**  
10           **LALTCMYNKIPVGSEEGYRALFSQVLRNTVENISMRIQDNGIIGNIYSTGLAMQ**  
            **ALSVTPEQPNKEWDCQKTMDTVLTEIKEGKFHNPMAIAQILPSLKGKTYLDVP**  
            **HVSCSPGHEVPPTLPNHPSPVPTPAPNITVIYTINNQLRGVELLFNETISVSVK**  
15           **RGSVLLIVLEEAQRKNPKFKFETTMTSWGPPVSSINNIAENVNHRTYWQFLSG**  
            **QYPLNEGVADYIPFNHEHITANFTQY**

20           ID SEC. N° 10: representa la secuencia nucleotídica del Cebador Directo huIF200For (30 nt)

25           **5'-TACAACTTGAAGGCCCAGAAGCTCCTGACT-3'**

            ID SEC. N° 11: representa la secuencia nucleotídica del Cebador Inverso huIF Inverso 1 (33 nt)

30           **5'-TTAGTACTGTGTGAAATTGGCTGTGATGTGCTC-3'**

35           ID SEC. N° 12: representa la secuencia nucleotídica del Cebador Directo huIF-For14 (29 nt)

40           **5'-CCCTCTACCTCCTGAGCCTTCTCTGGGCT-3'**

            ID SEC. N° 13: representa la secuencia nucleotídica del Cebador Inverso huIF 1248Rev (25 nt)

45           **5'-CTGTGTGAAATTGGCTGTGATGTGC-3'**

50           ID SEC. N° 14: representa la secuencia nucleotídica del Cebador Directo pIFMP-ForI (39 nt)

**5'-ATACAGAATTCATGAGCACCCAGACCCGAAGCTCATGCT-3'**

55           ID SEC. N° 15: representa la secuencia nucleotídica del Cebador Inverso pIFMP-RevXhoI (44 nt)

60           **5'-GATACCTCGAGTTAGTACTGTGTGAAATTGGCTGTGATGTGCTC-3'**

            ID SEC. N° 16: representa la secuencia nucleotídica del Cebador Directo pIF-PIC-MP-For EcoRI (36 nt)

65           **5'-ATACAGAATTCAGCACCCAGACCCGAAGCTCATGCT-3'**

## ES 2 321 030 T3

ID SEC. N° 17: representa la secuencia nucleotídica del Cebador Inverso pIF-MP-pMAL-SalI Rev (44 nt)

**5'-GATATGTCGACTTAGTACTGTGTGAAATTGGCTGTGATGTGCTC-3'**

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

5 1. Un factor intrínseco porcino purificado codificado por una secuencia de ácido nucleico aislado constando de, o complementaria a, una secuencia nucleotídica codificando el factor intrínseco porcino, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho factor intrínseco porcino es idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que se compone de la ID SEC N° 3, ID SEC N° 6, y ID SEC N° 9.

10 2. El factor intrínseco porcino purificado de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia de ácido nucleico es aislada a partir del género *Sus*.

3. El factor intrínseco porcino purificado de la reivindicación 2, en donde dicha especie de dicho género *Sus* es *Sus scrofa*.

15 4. Un método para determinar la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> en una muestra biológica, dicho método comprendiendo las etapas de:

20 (a) combinar dicha muestra biológica con micropartículas paramagnéticas recubiertas con el factor intrínseco porcino purificado de la reivindicación 1;

(b) permitir que la vitamina B<sub>12</sub> presente en dicha muestra se una a dichas micropartículas paramagnéticas recubiertas con dicho factor intrínseco porcino;

25 (c) añadir a dicha mezcla de la etapa (b) conjugado capaz de experimentar una reacción quimioluminiscente;

(d) provocar que suceda dicha reacción quimioluminiscente; y

30 (e) medir la reacción quimioluminiscente resultante como unidades relativas de luz, para determinar la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> en dicha muestra biológica.

5. Un método para determinar la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> en una muestra biológica, dicho método comprendiendo las etapas de:

35 (a) combinar dicha muestra biológica con al menos un reactivo de pretratamiento;

(b) combinar dicha muestra pretratada de la etapa (a) con micropartículas paramagnéticas recubiertas con el factor intrínseco porcino purificado de la reivindicación 1;

40 (c) permitir que la vitamina B<sub>12</sub> presente en dicha muestra se una a dichas micropartículas paramagnéticas recubiertas con dicho factor intrínseco porcino;

(d) lavar dicha muestra de la etapa (c);

45 (e) añadir a dicha mezcla lavada de la etapa (d) conjugado capaz de experimentar una reacción quimioluminiscente;

(f) añadir soluciones preactivadora y activadora a dicha mezcla de reacción de la etapa (e) para provocar que suceda dicha reacción quimioluminiscente; y

50 (g) medir la reacción quimioluminiscente resultante como unidades relativas de luz, para determinar la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> en dicha muestra biológica.

6. Un método para determinar la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> en una muestra biológica, dicho método comprendiendo las etapas de:

55 (a) proporcionar una mezcla constando de dicha muestra biológica y de micropartículas recubiertas con el factor intrínseco porcino purificado de la reivindicación 1;

(b) permitir que la vitamina B<sub>12</sub> presente en dicha muestra se una a dichas micropartículas recubiertas con dicho factor intrínseco, para formar un primer complejo de vitamina B<sub>12</sub> y factor intrínseco porcino;

60 (c) añadir a dicho primer complejo un conjugado capaz de formar un producto fluorescente para formar un segundo complejo comprendiendo el primer complejo y el conjugado capaz de formar un producto fluorescente;

(d) añadir al segundo complejo un material fluorogénico para producir un producto fluorescente; y

65 (e) medir el producto fluorescente para determinar la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> en dicha muestra biológica.

## ES 2 321 030 T3

7. Un método para determinar la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> en una muestra biológica, dicho método comprendiendo las etapas de:

5 (a) proporcionar una mezcla de reacción comprendiendo dicha muestra biológica;

(b) añadir a la mezcla de reacción de la etapa (a) micropartículas recubiertas con el factor intrínseco porcino purificado de la reivindicación 1;

10 (c) permitir que la vitamina B<sub>12</sub> presente en dicha muestra se una a dichas micropartículas recubiertas con dicho factor intrínseco para formar un primer complejo de vitamina B<sub>12</sub> y factor intrínseco porcino;

(d) transferir a una matriz una porción de la mezcla de reacción de la etapa (c);

15 (e) permitir que dichas micropartículas se unan irreversiblemente a dicha matriz;

(f) lavar dicha matriz para eliminar los materiales no unidos a dichas micropartículas;

20 (g) dispensar un conjugado capaz de formar un producto fluorescente sobre la matriz, para formar un segundo complejo comprendiendo el primer complejo y el conjugado capaz de formar un producto fluorescente;

(h) lavar la matriz para eliminar el conjugado no unido;

(i) añadir a la matriz un material fluorogénico para producir un producto fluorescente; y

25 (j) medir el producto fluorescente para determinar la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> en dicha muestra biológica.

8. Un factor intrínseco porcino purificado codificado por una secuencia de ácido nucleico aislado constando de, o complementaria a, una secuencia nucleotídica idéntica a una secuencia nucleotídica seleccionada de los grupos que se componen de la ID SEC N° 1, ID SEC N° 4, e ID SEC N° 7.

30 9. El factor intrínseco porcino purificado de la reivindicación 8, en donde dicha secuencia de ácido nucleico es aislada del género *Sus*.

35 10. El factor intrínseco porcino purificado de la reivindicación 9, en donde dicha especie de dicho género *Sus* es *Sus scrofa*.

11. Un método para determinar la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> en una muestra biológica, dicho método comprendiendo las etapas de:

40 (a) combinar dicha muestra biológica con micropartículas paramagnéticas recubiertas con el factor intrínseco porcino purificado de la reivindicación 8;

(b) permitir que la vitamina B<sub>12</sub> presente en dicha muestra se una a dichas micropartículas paramagnéticas recubiertas con dicho factor intrínseco porcino;

45 (c) añadir a dicha mezcla de la etapa (b) conjugado capaz de experimentar una reacción quimioluminiscente;

(d) provocar que suceda dicha reacción quimioluminiscente; y

50 (e) medir la reacción quimioluminiscente resultante como unidades relativas de luz, para determinar la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> en dicha muestra biológica.

12. Un método para determinar la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> en una muestra biológica, dicho método comprendiendo las etapas de:

55 (a) combinar dicha muestra biológica con al menos un reactivo de pretratamiento;

(b) combinar dicha muestra pretratada de la etapa (a) con micropartículas paramagnéticas recubiertas con el factor intrínseco porcino purificado de la reivindicación 8;

60 (c) permitir que la vitamina B<sub>12</sub> presente en dicha muestra se una a dichas micropartículas paramagnéticas recubiertas con dicho factor intrínseco porcino;

(d) lavar dicha muestra de la etapa (c);

65 (e) añadir a dicha mezcla lavada de la etapa (d) conjugado capaz de experimentar una reacción quimioluminiscente;

## ES 2 321 030 T3

(f) añadir soluciones preactivadora y activadora a dicha mezcla de reacción de la etapa (e) para provocar que suceda dicha reacción quimioluminiscente; y

5 (g) medir la reacción quimioluminiscente resultante como unidades relativas de luz, para determinar la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> en dicha muestra biológica.

13. Un método para determinar la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> en una muestra biológica, dicho método comprendiendo las etapas de:

10 (a) proporcionar una mezcla constando de dicha muestra biológica y de micropartículas recubiertas con el factor intrínseco porcino purificado de la reivindicación 8;

15 (b) permitir que la vitamina B<sub>12</sub> presente en dicha muestra se una a dichas micropartículas recubiertas con dicho factor intrínseco, para formar un primer complejo de vitamina B<sub>12</sub> y factor intrínseco porcino;

(c) añadir a dicho primer complejo un conjugado capaz de formar un producto fluorescente, para formar un segundo complejo comprendiendo el primer complejo y el conjugado capaz de formar un producto fluorescente;

20 (d) añadir al segundo complejo un material fluorogénico para producir un producto fluorescente; y

(e) medir el producto fluorescente para determinar la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> en dicha muestra biológica.

14. Un método para determinar la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> en una muestra biológica, dicho método comprendiendo las etapas de:

25 (a) proporcionar una mezcla de reacción comprendiendo dicha muestra biológica;

(b) añadir a la mezcla de reacción de la etapa (a) micropartículas recubiertas con el factor intrínseco porcino purificado de la reivindicación 8;

30 (c) permitir que la vitamina B<sub>12</sub> presente en dicha muestra se una a dichas micropartículas recubiertas con dicho factor intrínseco, para formar un primer complejo de vitamina B<sub>12</sub> y factor intrínseco porcino;

(d) transferir a una matriz una porción de la mezcla de reacción de la etapa (c);

35 (e) permitir que dichas micropartículas se unan irreversiblemente a dicha matriz;

(f) lavar dicha matriz para eliminar los materiales no unidos a dichas micropartículas;

40 (g) dispensar un conjugado capaz de formar un producto fluorescente sobre la matriz, para formar un segundo complejo comprendiendo el primer complejo y el conjugado capaz de formar un producto fluorescente;

(h) lavar la matriz para eliminar el conjugado no unido;

45 (i) añadir a la matriz un material fluorogénico para producir un producto fluorescente; y

(j) medir el producto fluorescente para determinar la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> en dicha muestra biológica.

50

55

60

65

Expresión de Factor Intrínseco Porcino Recombinante en *E. coli*

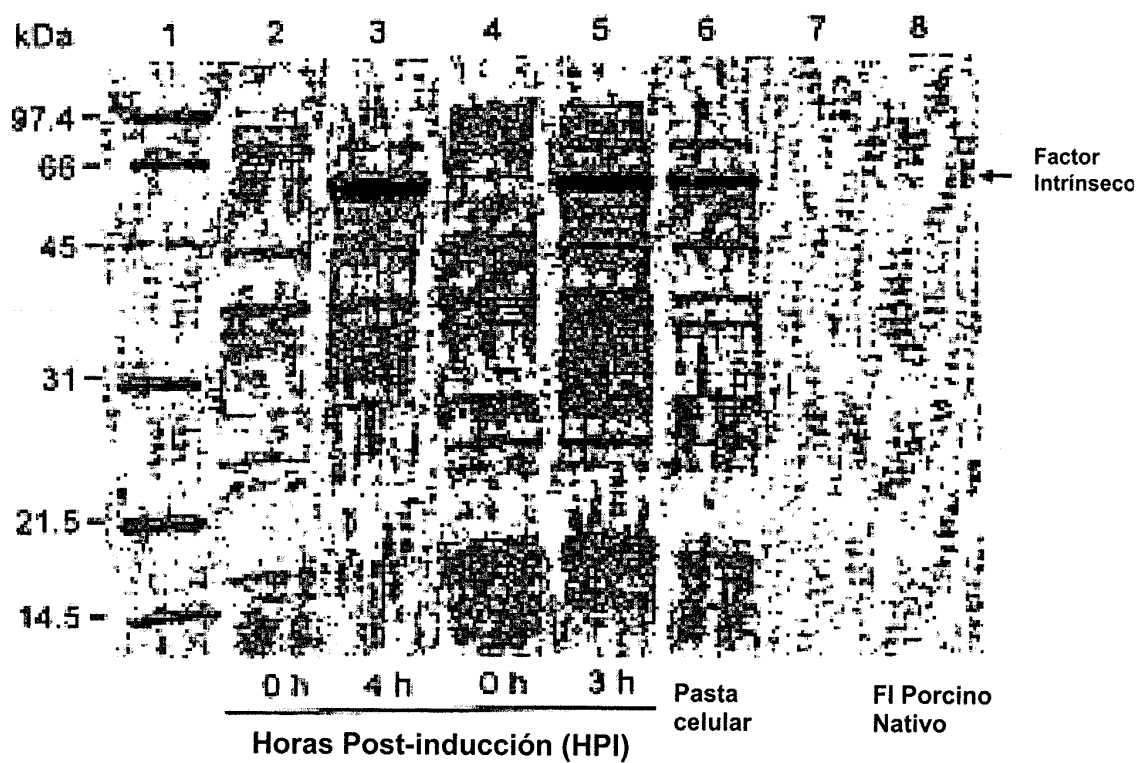
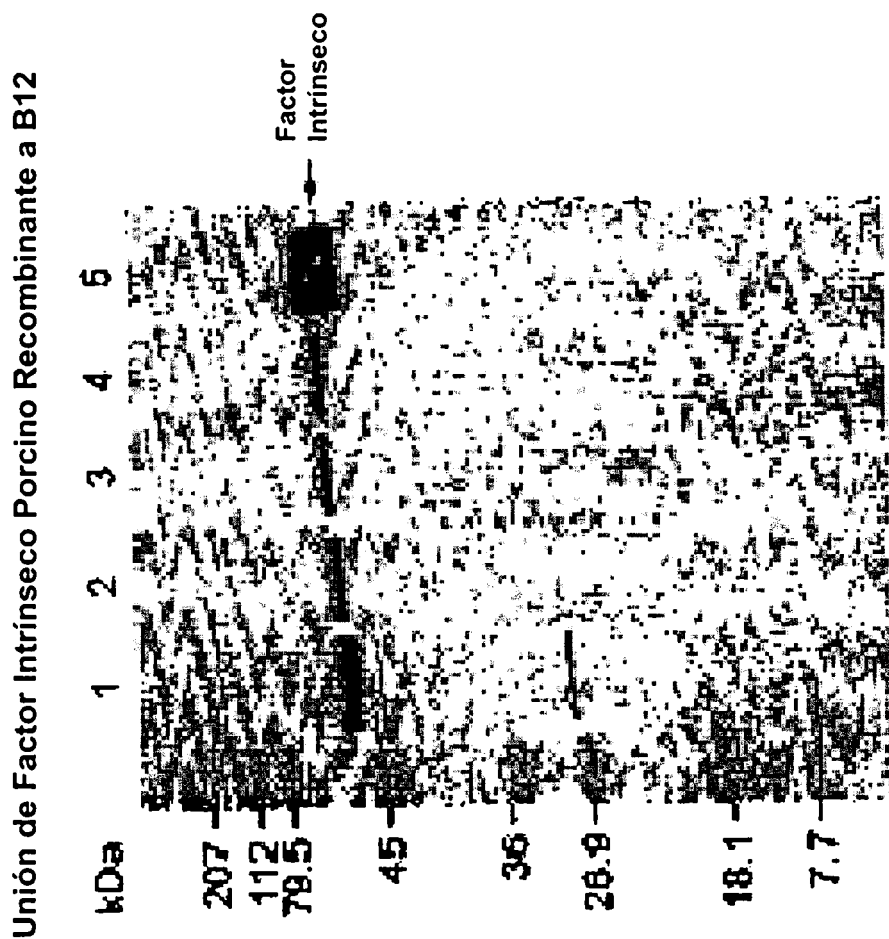


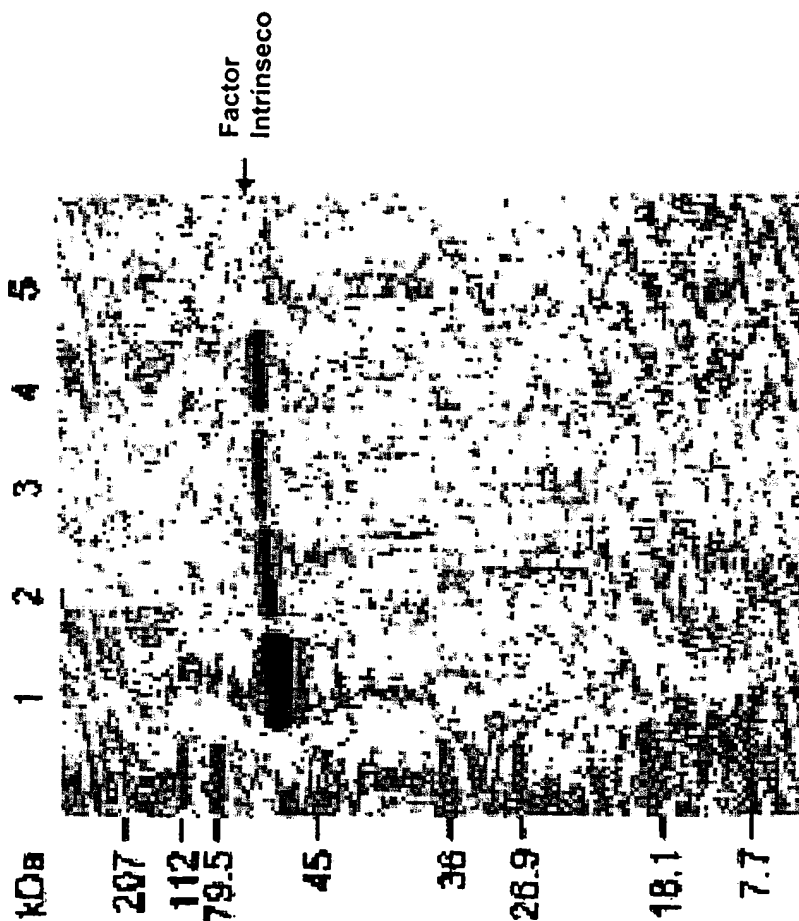
FIG. 1



Expresión de Factor Intrínseco Porcino en *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) con pET32a y BL21 (DE3) con pET32a

**FIG.2**

Unión de Factor Intrínseco Porcino Recombinante a anticuerpo anti-Factor Intrínseco



- 1 Clon 4-5 de RG
- 2 Clon 8-4 de RG
- 3 Clon 4-5 de BL21
- 4 Clon 8-5 de BL21
- 5 FI porcino nativo

Expresión de Factor Intrínseco Porcino en *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) con pET32a y BL21 (DE3) con pET32a

**FIG.3**



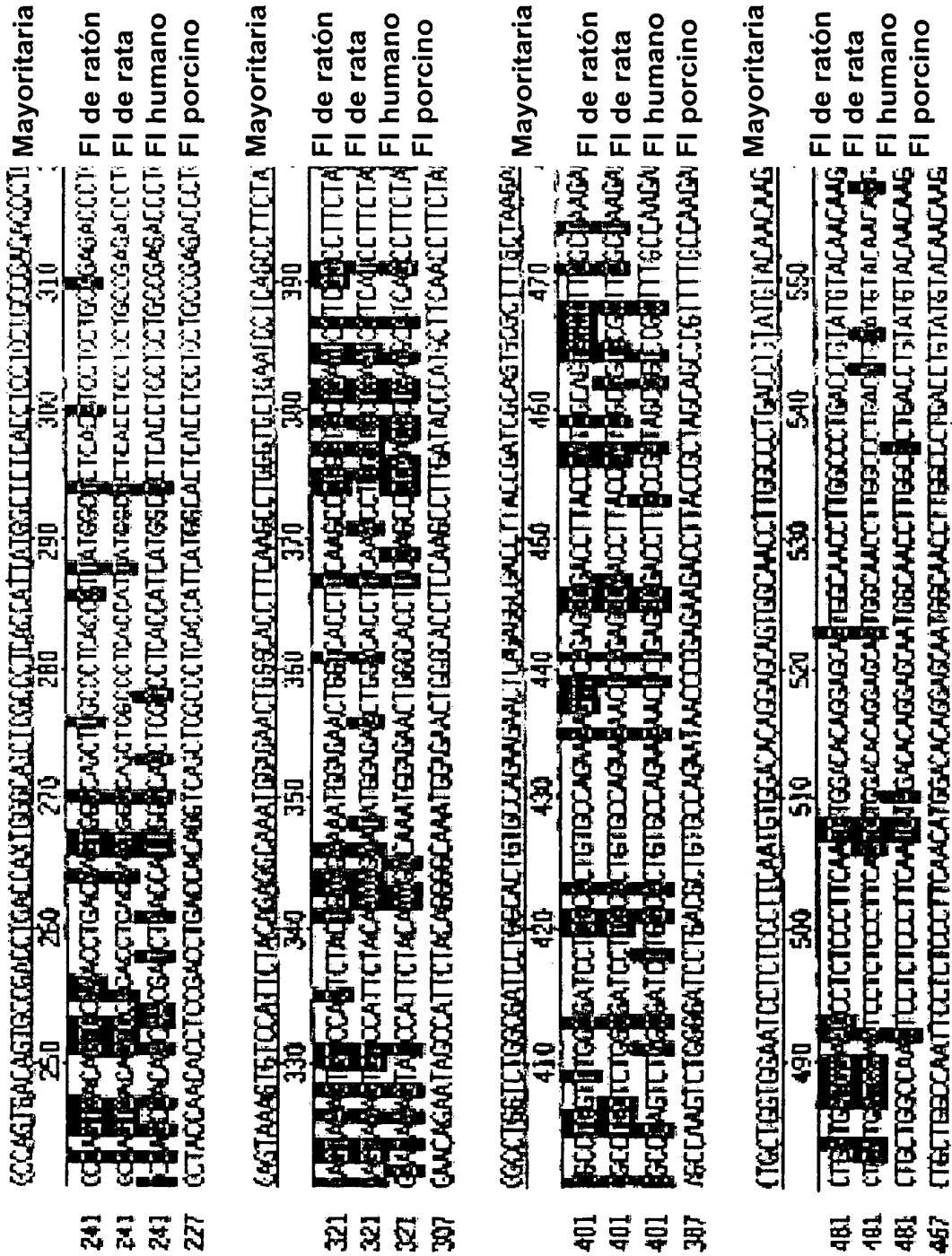
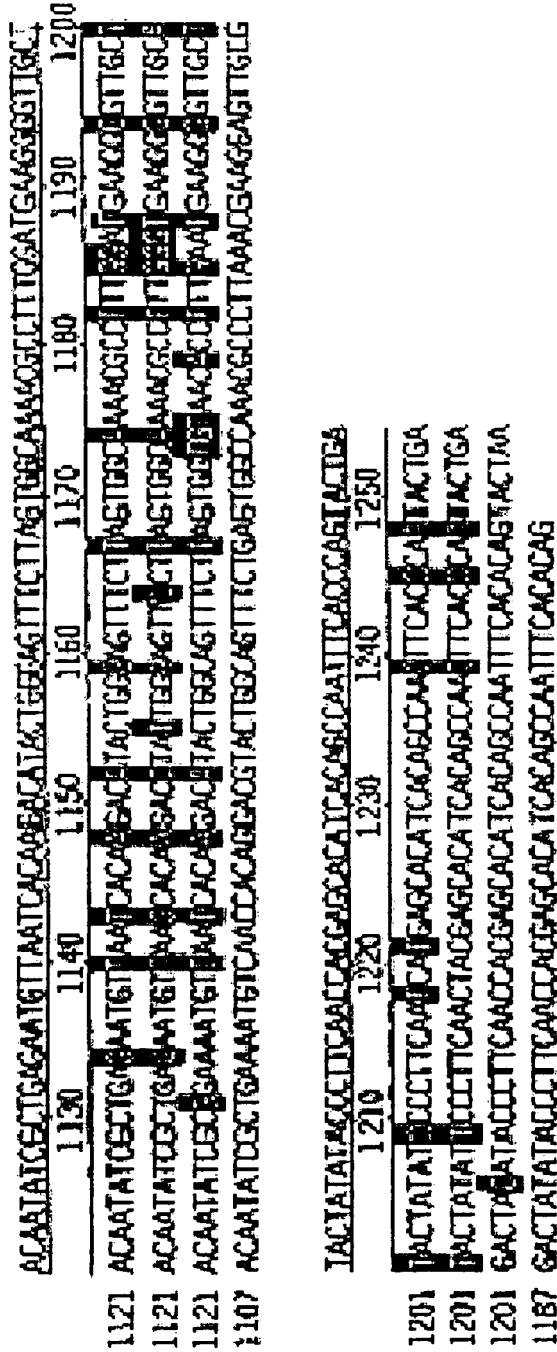


FIG. 4-1





Informe de Alineamiento de ClustalW sin título (Lento/Exacto, IUB)  
 Viernes, 4 de febrero de 2005, 10:07 AM



Decoración "Decoración nº 1": Restos de sombras (con negro sólido) que difieren del FI Porcino

FIG. 4-4

Distancias entre parejas de secuencias de ClustalW sin título (Lento/Exacto, IUB)  
 Viernes, 4 de febrero de 2005, 10:08 AM

Porcentaje de Identidad

	1	2	3	4		
Divergencia	1	92.4	82.9	78.8	1	FI de ratón
	2	8.1	82.4	78.5	2	FI de rata
	3	19.8	20.4	83.3	3	FI humano
	4	23.6	24.0	17.4	4	FI porcino
		1	2	3	4	

FIG.5

Informe de Alineamiento de ClustalW sin título (Lento/Exacto, Gonnet)  
 Lunes, 31 de enero de 2005, 2:07 PM

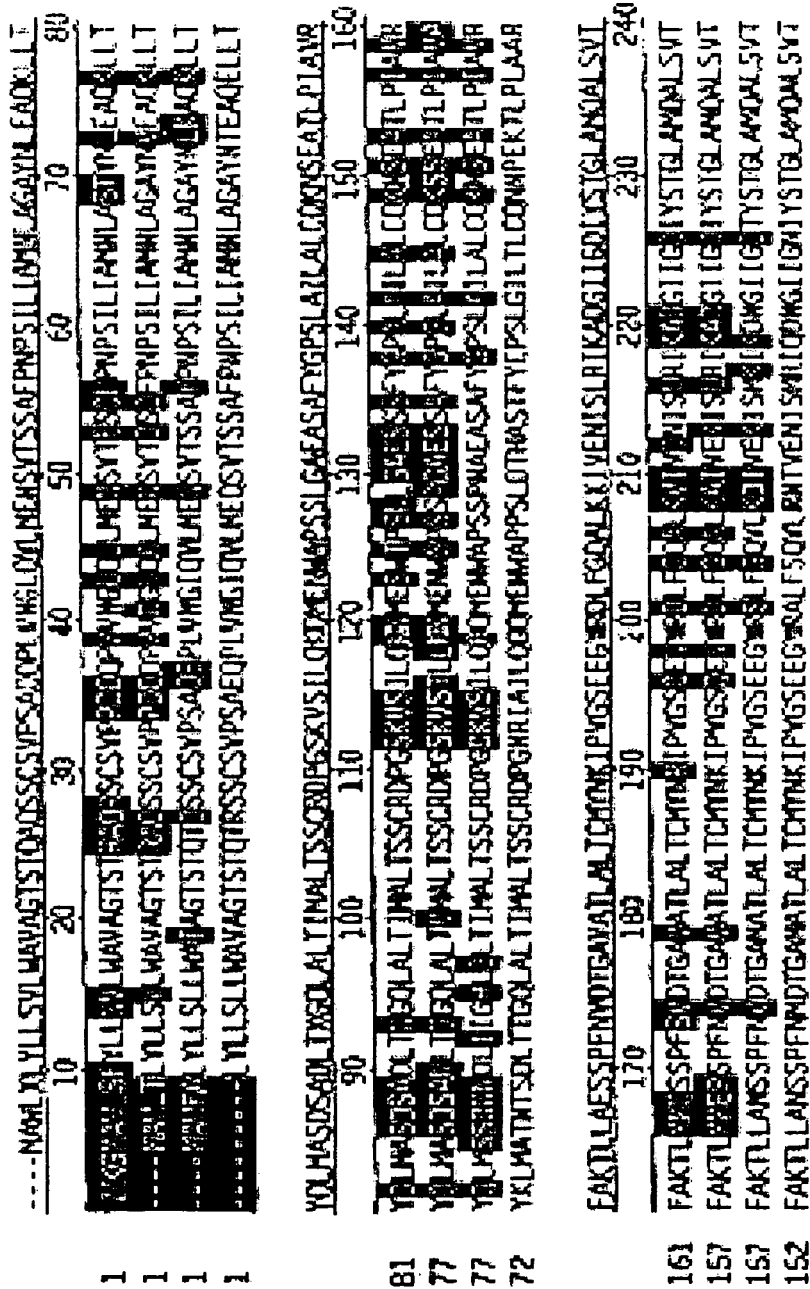


FIG. 6



Distancias entre parejas de secuencias de ClustalW sin titulo (Lento/Exacto, Gonnet)  
 Lunes, 31 de enero de 2005, 2:08 PM

**Porcentaje de Identidad**

		1	2	3	4	
Divergencia	1		89.3	76.6	72.2	1
	2	10.6		80.8	73.4	2
	3	24.2	22.2		80.8	3
	4	32.3	31.5	20.9		4
		1	2	3	4	

FI de ratón  
 FI de rata  
 FI humano  
 FI porcino

**FIG.7**

# ES 2 321 030 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Abbott Laboratories Wonderling, Ramani S. Uher, John F.

5 <120> ENSAYO DIAGNÓSTICO PARA VITAMINA B12

<130> 7330WOO1

10 <140> No recibida todavía

<141> 2006-02-02

<150> 11/052,128

15 <151> 2005-02-07

<160> 17

20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 1056

25 <212> ADN

<213> *S. scrofa*

30 <400> 1

```

tacaacttga aggccccagaa gctcctgact tacaagctca tggctaccaa cacctccgac 60
ctgaaccacag gtcagctcgc cctcaaccatc atggcactca cctcctcctg cogagaccct 120
gggaaccgaa tagccattct acaggggcaa atggagaact gggcacctcc aagccttgat 180
accatgctt caacotteta cgagccaagt ctggggatcc tgacgctytg ccagaataac 240
ccggagaaga ccttaccgct agcagccctt ttggccaga ccttctctgc caattcctct 300
cccttcacca tggacacagg agcaatggca accctggccc tgacctgtat gtacaacaaag 360
atccocgtag gctcagagga aggtacaga gccctgttca gtcaggtact gaggaatact 420
gtggoganta tcagcatgag gatccaaagc aacggatca ttggaaacat ctatagaaact 480
ggcctcgcca tgcaggctct ctctgtgaca cctgagcaae ctaaacayga gtgggactgc 540
cagaagacaa tggatactgt acttactgag attaaggagg ggaantteca caaccctatg 600
gcaattgccc aaatcctccc ttcctgaaa ggcagacct atctagatgt gcccctatgt 660
tcttgcagcc cctgtentga ggtgccacca actctacca accaccccag ccttctccc 720
accocagcac ccaacatcac cgtcatatac accataata accagctyag gggcgtggag 780
ctgctcttca atgaaacat cagtgttagt gtcaaaagag gatccgtgct acttattgtc 840
ctggaggagg cacagcgcaa aaaccccag ttcaatttg aaacgacaat gacgtcctgg 900
ggaccggtgg tctcttctat taacaatata gctgaaeatg tcaaccacag gacgtactgg 960
cagtttctga gtggccaac gccctaaac gaaggsqttg cggactatat acccttcaac 1020
cacgagcaca tcacagccaa tttcacacag tactaa 1056

```

50 <210> 2

<211> 1056

<212> ADN

55 <213> *S. scrofa*

<400> 2

```

ttagtactgt gtgaaattgg ctgtgatgtg ctctgtgttg aagggtatat agtccgcaac 60
tccttcgctt aagggcgttt ggccaotcay aaactyocag taogtccctg ggttgacatt 120
ttcagcgata ttgttaatag aagagaccac cgttcccag gaogtcattg tcgtttcaaa 180
tttgaacttg gggtttttgc gctgtgcctc ctccaggaca ataagtagca cggatcctct 240
tttcacacta acactyatgg ttctattgaa gagcagctcc acgcccctca gctgggtatt 300
tatggtgat atgacggtga tgttgggtgc tggggtggga acagggctgg ggtgggtggg 360
tagagtgggt ggcacctcat gaccagggct gcaagacaca tggggcacat ctatagatgg 420
cttgccttto agggaaagga ggattkgggo aatggcoatg gggttgtgga atttcccctc 480

```

ES 2 321 030 T3

```

ottaatctca gtaagtacag tatccatggt cttctggcag tcccactcct tgttaggttg 540
ctcaggtgtc acagagagag cctgcattggc gaggccagtg ctatagatgt ttccaatgat 600
tcogttgtet tggatcctca tgetgatatt ctccacagta ttcttcagta cctgactgae 660
cagggctctg taccctkoot ctgagcctac ggggatcttg ttgtacatac aggtcagggc 720
caaggttgc attgctcttg tctccatggt gaagggagag gaattggcca gcagggtctt 780
ggcaaacgg gctgctagcg gtaaggtctt ctccgggta ttctggcaca gcgtcaggat 840
ccccagactt ggctcgtaga aggttgaage atgggtatca aggcttggag gtgcccagtt 900
ctccatttgc cctgtagaa tggctattct gtccccaggg tctcggcagg aggaggtgag 960
tgccatgatg gtgagggcga gctgacctgt ggtcaggtcg gaggtgttgg tagccatgag 1020
cttgaagtc aggagcttct ggccttcaa gttgta 1056
    
```

<210> 3

<211> 351

<212> PRT

<213> *S. scrofa*

<400> 3

```

Tyr Asn Leu Lys Ala Gln Lys Leu Leu Thr Tyr Lys Leu Met Ala Thr
 1          5          10          15
Asn Thr Ser Asp Leu Thr Thr Gly Gln Leu Ala Leu Thr Ile Met Ala
20          25          30
Leu Thr Ser Ser Cys Arg Asp Pro Gly Asn Arg Ile Ala Ile Leu Gln
35          40          45
Gly Gln Met Glu Asn Trp Ala Pro Pro Ser Leu Asp Thr His Ala Ser
50          55          60
Thr Phe Tyr Glu Pro Ser Leu Gly Ile Leu Thr Leu Cys Gln Asn Asn
65          70          75          80
Pro Glu Lys Thr Leu Pro Leu Ala Ala Arg Phe Ala Lys Thr Leu Leu
85          90          95
Ala Asn Ser Ser Pro Phe Asn Met Asp Thr Gly Ala Met Ala Thr Leu
100          105          110
Ala Leu Thr Cys Met Tyr Asn Lys Ile Pro Val Gly Ser Glu Glu Gly
115          120          125
Tyr Arg Ala Leu Phe Ser Gln Val Leu Arg Asn Thr Val Glu Asn Ile
130          135          140
Ser Met Arg Ile Gln Asp Asn Gly Ile Ile Gly Asn Ile Tyr Ser Thr
145          150          155          160
Gly Leu Ala Met Gln Ala Leu Ser Val Thr Pro Glu Gln Pro Asn Lys
165          170          175
Glu Trp Asp Cys Gln Lys Thr Met Asp Thr Val Leu Thr Glu Ile Lys
180          185          190
Glu Gly Lys Phe His Asn Pro Met Ala Ile Ala Gln Ile Leu Pro Ser
195          200          205
Leu Lys Gly Lys Thr Tyr Leu Asp Val Pro His Val Ser Cys Ser Pro
210          215          220
Gly His Glu Val Pro Pro Thr Leu Pro Asn His Pro Ser Pro Val Pro
225          230          235          240
Thr Pro Ala Pro Asn Ile Thr Val Ile Tyr Thr Ile Asn Asn Gln Leu
245          250          255
Arg Gly Val Glu Leu Leu Phe Asn Glu Thr Ile Ser Val Ser Val Lys
260          265          270
Arg Gly Ser Val Leu Leu Ile Val Leu Glu Glu Ala Gln Arg Lys Asn
275          280          285
Pro Lys Phe Lys Phe Glu Thr Thr Met Thr Ser Trp Gly Pro Val Val
290          295          300
Ser Ser Ile Asn Asn Ile Ala Glu Asn Val Asn His Arg Thr Tyr Trp
305          310          315          320
Gln Phe Leu Ser Gly Gln Thr Pro Leu Asn Glu Gly Val Ala Asp Tyr
325          330          335
Ile Pro Phe Asn His Glu His Ile Thr Ala Asn Phe Thr Gln Tyr
340          345          350
    
```

ES 2 321 030 T3

<210> 4  
 <211> 1232  
 <212> ADN  
 5 <213> *S. scrofa*  
 <400> 4

```

10      cctctacctc ctgagccttc totgggctgt ggcgggaacc agcaccgaga cccgaagctc 60
      atgctctgtt cctctgag agcagccctt ggtaaatggc atccaggtgc tcatggagca 120
      gtcoygaoc agctggcct tcccaaaccc cagcatoctg attgcaatga acctggccgg 180
      ygcctacaac acagagggcc aggagctcct gacttacaag ctcatggcta ccaacacctc 240
      cgaactgacc acaggtcagc tggccctcac catcatggca ctcaectcct ectgcccaga 300
15      ccttgggaa cagaatagcca ttctaagggg gcaaatggag aactgggcac ctccaagcct 360
      tgatacccat gottcaacct tctacggacc aagtotgggg atcctgacgc tgtgccaga 420
      faaccggag aagaccttac cgttagcagc ccgttttgcc aagaccctgc tggccaatte 480
      ctctcccttc aacatggaca caggagcaat ggcaaccttg gcctgacct gtatgtacaa 540
      caagatcccc gtaggtcag aggaagggtc cagagccctg ttcagtcagg tactgaggaa 600
20      tactgtggag aatatcagca tgaggatcca agacaacgga atcattgga acatctatag 660
      cactggcctc ccacatggagg ctctctctgt gacacctgag caacctaa caagcagggg 720
      ctgccagaag accatggata ctgtacttac tgagattaag gaggggaat tcccaacccc 780
      catggccatt gcccaatcc tccctccct gaaaggcaag aoctatctag atgtgcccc 840
      tgtgtcttgc agccctggtc atgaggtgoc acaacteta cccaaccacc ccagccctgt 900
25      tcccacccca gcacccaaca tcaccgtcat atacaccata aataaccagc tgaggggggt 960
      ggagctgctc ttcaatgaaa ccctcagttg tagtvtgaaa agaggtaccg tgctacttat 1020
      tctcctggag gaggcacagc gcaaaaaccc caagttcaaa tttgaaacga caatgaogtc 1080
      ctggggaccg gtggtctctt ctatlaaaa taatgctgaa aatgtcaacc acaggacgta 1140
      ctggcagttt ctgagtggcc aacggcctt aaacgaagga gttgcccact atataccctt 1200
30      caaccacagc cacatcacag ccaatttcac ac
    
```

<210> 5  
 <211> 1232  
 35 <212> ADN  
 <213> *S. scrofa*  
 <400> 5

```

40      ctgtgtgaaa ttggctgtga tgtgctcgtg gttgaagggt atatagtcog caactccttc 60
      gtttaagggc gtttggccac tcagaaactg ccagtagctc ctgtggttga cattttcagc 120
      gatattgtta atagaagaga ccaccggctc ccaggacgtc attgtcgttt caaatttgaa 180
      ctgggggttt ttgogctgtg ectcctccag gacaataagt agcacggatc ctcttttcac 240
45      actaacactg atggtttcat tgaagagcag ctccaogccc ctcaagctgg tatttatggt 300
      gtatatgacg gtgatgttgg gtgctggggg gggaacaggg ctggggtygt tgggtagagt 360
      tggtygcacc tcatgaccag ggctgcaaga cacatggggc acatctagat aggtcttgcc 420
      tttcagggaa gggaggattt gggcaatggc catggggtt tgaatttcc octoctaat 480
      ctcaagtaagt acagtatcca tggctctctg gcagtcacc tccttgtag gttgctcagg 540
50      tytcacagag agagcctgca tggcgaggcc agtgcctatag atgtttcaa tgattccgtt 600
      gtcttgatc ctcatgtctg tattctccac agtattcctc agtacctgac tgaacagggc 660
      tetgtaocct tctctgagc ctacggggat ctgtttgtac atacaggtca gggccaaggt 720
      tgcaattgct cctgtgtcca tgttgaaggg agaggaattg gccagcaggg tcttggcaaa 780
      acgggotgot agcggtaagg tcttctccgg gttattctgg cacagcgtca ggtatcccag 840
55      acttggctcg tagaagggtt aagcatgggt atcaaggctt ggaggtgccc agttctocat 900
      ttgcccctgt agaatggcta ttctgttccc agggctctcg caggaggagg tgaagtgcot 960
      gatggtgagg gcgagctgac ctgtggtcag gtcggaggtg ttggtagcca tgagcttgta 1020
      agtcaggagc tcttggcct ctgtgttyta ggtccggcc aggttcaatgg caatcaggat 1080
      gctgggggtt ggggaaggcc agctggtcac ggaactgctcc atgagcaect ggtatgcatt 1140
60      aaccaagggc tgctctgcag agggaacaga gcatgagctt cgggtctggg tgctggttcc 1200
      ggccacagcc cagagaaggc tcaggaggtg ga
    
```

<210> 6  
 65 <211> 411  
 <212> PRT  
 <213> *S. scrofa*

ES 2 321 030 T3

<400> 6

5 Leu Tyr Leu Leu Ser Leu Leu Trp Ala Val Ala Gly Thr Ser Thr Gln  
 1 5 10  
 Thr Arg Ser Ser Cys Ser Val Pro Ser Ala Glu Gln Pro Leu Val Asn  
 20  
 Gly Ile Gln Val Leu Met Glu Gln Ser Val Thr Ser Ser Ala Phe Pro  
 35 40  
 10 Asn Pro Ser Ile Leu Ile Ala Met Asn Leu Ala Gly Ala Tyr Asn Thr  
 50 55 60  
 Glu Ala Gln Glu Leu Leu Thr Tyr Lys Leu Met Ala Thr Asn Thr Ser  
 65 70 75 80  
 15 Asp Leu Thr Thr Gly Gln Leu Ala Leu Thr Ile Met Ala Leu Thr Ser  
 85 90 95  
 Ser Cys Arg Asp Pro Gly Asn Arg Ile Ala Ile Leu Gln Gly Gln Met  
 100 105 110  
 20 Glu Asn Trp Ala Pro Pro Ser Leu Asp Thr His Ala Ser Thr Phe Tyr  
 115 120 125  
 Glu Pro Ser Leu Gly Ile Leu Thr Leu Cys Gln Asn Asn Pro Glu Lys  
 130 135 140  
 Thr Leu Pro Leu Ala Ala Arg Phe Ala Lys Thr Leu Leu Ala Asn Ser  
 145 150 155 160  
 25 Ser Pro Phe Asn Met Asp Thr Gly Ala Met Ala Thr Leu Ala Leu Thr  
 165 170 175  
 Cys Met Tyr Asn Lys Ile Pro Val Gly Ser Glu Glu Gly Tyr Arg Ala  
 180 185 190  
 30 Leu Phe Ser Gln Val Leu Arg Asn Thr Val Glu Asn Ile Ser Met Arg  
 195 200 205  
 Ile Gln Asp Asn Gly Ile Ile Gly Asn Ile Tyr Ser Thr Gly Leu Ala  
 210 215 220  
 Met Gln Ala Leu Ser Val Thr Pro Glu Gln Pro Asn Lys Glu Trp Asp  
 225 230 235 240  
 35 Cys Gln Lys Thr Met Asp Thr Val Leu Thr Glu Ile Lys Glu Gly Lys  
 245 250 255  
 Phe His Asn Pro Met Ala Ile Ala Gln Ile Leu Pro Ser Leu Lys Gly  
 260 265 270  
 40 Lys Thr Tyr Leu Asp Val Pro His Val Ser Cys Ser Pro Gly His Glu  
 275 280 285  
 Val Pro Pro Thr Leu Pro Asn His Pro Ser Pro Val Pro Thr Pro Ala  
 290 295 300  
 Pro Asn Ile Thr Val Ile Tyr Thr Ile Asn Asn Gln Leu Arg Gly Val  
 305 310 315 320  
 45 Glu Leu Leu Phe Asn Glu Thr Ile Ser Val Ser Val Lys Arg Gly Ser  
 325 330 335  
 Val Leu Leu Ile Val Leu Glu Glu Ala Gln Arg Lys Asn Pro Lys Phe  
 340 345 350  
 50 Lys Phe Glu Thr Thr Met Thr Ser Trp Gly Pro Val Val Ser Ser Ile  
 355 360 365  
 Asn Asn Ile Ala Glu Asn Val Asn His Arg Thr Tyr Trp Gln Phe Leu  
 370 375 380  
 Ser Gly Gln Thr Pro Leu Asn Glu Gly Val Ala Asp Tyr Ile Pro Phe  
 385 390 395 400  
 55 Asn His Glu His Ile Thr Ala Asn Phe Thr Gln  
 405 410

<210> 7

<211> 1200

<212> ADN

<213> *S. scrofa*

65

ES 2 321 030 T3

<400> 7

5 agcaccacaga cccgaagctc atgctctgtt cctctctgag agcagccctt ggttaatggc 60  
 atccagytgc tcatggagca gtccgtgacc agctcggcct tcccaaaccc cagcatcctg 120  
 attgccatga acctggccgg agcctacaac acagagccc aggagctcct gacttacaag 180  
 ctcatggcta ccaacacctc egacctgacc acaggtcagc tcyccctcac catcatggca 240  
 ctcaoctcct cctgcccaga cctggggaac agaataggca ttotacsggg gcaaatggag 300  
 aactggggcac ctccaagcct tgatacccat gcttcaacct tctaegagcc aagtctgggg 360  
 10 atcctgagcg tgtgccagaa taaccoggag aagaccttac cgttagcagc cgttttggcc 420  
 aagaccctgc tggccaattc ctctcccttc aacatggaca caggagcaat ggcaaccttg 480  
 gccctgacct gtatgtacaa caagatcccc gtaggctoag aggaagggta cagagocctg 540  
 ttcagtcagg tactgaggaa tactgtggag aatatcagca tgaggatcca agacaacgga 600  
 atcattggaa acatctatag cactggctc gccatgcagg ctctctctgt gacacctgag 660  
 15 caacctaca aggagtggga ctgccagaag acaatggata ctgtacttac tgagattaag 720  
 gaggggaat tccacaacco catggccatt gcccaaatcc tcccttccct gaaaggcaag 780  
 acctatctag atgtgcccc tgtgtcttgc agccttggc atgaggtgcc accaactcta 840  
 cccaaceaac ccaagcctgt tcccaccca gacccaaa taacogtoat ataacacata 900  
 aataaccagc tgaggggcgt ggagctgctc tcaatgaaa ccatcagttg kagtgtgaaa 960  
 20 agaggatccg tgcacttat tgcctggag gaggcaagc gcaaaasccc caagttcaa 1020  
 tttgaaacc caatgacgtc ctggggaccg tgggtctctt ctattasca tatcgtgaa 1080  
 aatgtcaacc acaggacgta ctggcagtt ctgagtgcc aaacgcctt aaacgaagga 1140  
 gttgcggact atataccctt caaccacgag cacatcacag ccaatttcac acagtactaa 1200

<210> 8

<211> 1200

<212> ADN

<213> *S. scrofa*

<400> 8

35 ttagtactgt gtgaaattgg ctgtgatgtg ctogtgggtg aagggtatat agtccgcaac 60  
 tccttcggtt aagggcggtt ggccactcag aaactgcccag tacgtcctgt ggttgacatt 120  
 ttcagcgata ttgttaatag aagagaccac cggctcccag gacgtcattg togtttcmaa 180  
 40 tttgaacttg gggtttttgc ctgtgctcct cccaggaca ataagtagca cggatcctct 240  
 tttcacacta acactgatgg tttcaattgaa ggcagctcc acgcccctca gctggttatt 300  
 tatgggtgat atgacgggta tgttgggtgc tggggggga acagggctgg ggtgattggg 360  
 tagagttggt ggcacctcat gaccagggct gcaagacaca tggggcacat ctagataggt 420  
 cttgccttcc agggaaagga ggatttgggc aatggccatg gggttgtgga atttcccctc 480  
 cttaattctca gtaagtacag tatccatggt ettctggcag tcccactcct tgttaggttg 540  
 45 ctcaggtgtc acagagagag cctgcatygc gaggccagty ctatagatgt ttccaatgat 600  
 tccgttctct tggatcctca tgcctgatatt ctccacagta ttccctcagta cctgactgaa 660  
 cagggctctg tacccttct ctgagctctae ggggatcttg ttgtacatac aggtcagggc 720  
 caaggttggc attgctcctg tgtccatggt gaagggagag gaattggcca gcagggtctt 780  
 ggcanaacgg gctgctagcg gtaaggtctt ctccgggtta ttctggcaca gctcaggat 840  
 50 cccagactt ggcctcgtaga aggttgaagc atgggtatca aggottgag gtgccagtt 900  
 ctccatttgc cctgttagaa tggctattct gttcccaggg tctcggcagg aggaggtgag 960  
 tgccatgatg gtgagggcga gctgacctgt ggtcaggtog gagggttgg tagccatgag 1020  
 cttgtaagtc aggagctcct gggcctctgt gttgtaggct ccggccaggt tcatggcaat 1080  
 55 caggatgctg gggtttggga aggcogagct ggtcacggac tgtccatgga gcacctggat 1140  
 gccattaac aagggctgct ctgcagaggg aacagagcat gagcttcggg totgggtgct 1200

<210> 9

<211> 399

<212> PRT

<213> *S. scrofa*

65

ES 2 321 030 T3

<400> 9

5 Ser Thr Gln Thr Arg Ser Ser Cys Ser Val Pro Ser Ala Glu Gln Pro  
1 5 10  
Leu Val Asn Gly Ile Gln Val Leu Met Glu Gln Ser Val Thr Ser Ser

10 Ala Phe Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ile Ala Met Asn Leu Ala Gly Ala  
35 40 45  
Tyr Asn Thr Glu Ala Gln Glu Leu Leu Thr Tyr Lys Leu Met Ala Thr  
50 55 60  
Asn Thr Ser Asp Leu Thr Thr Gly Gln Leu Ala Leu Thr Ile Met Ala  
65 70 75 80  
Leu Thr Ser Ser Cys Arg Asp Pro Gly Asn Arg Ile Ala Ile Leu Gln  
85 90 95  
Gly Gln Met Glu Asn Trp Ala Pro Pro Ser Leu Asp Thr His Ala Ser  
100 105 110  
20 Thr Phe Tyr Glu Pro Ser Leu Gly Ile Leu Thr Leu Cys Gln Asn Asn  
115 120 125  
Pro Glu Lys Thr Leu Pro Leu Ala Ala Arg Phe Ala Lys Thr Leu Leu  
130 135 140  
25 Ala Asn Ser Ser Pro Phe Asn Met Asp Thr Gly Ala Met Ala Thr Leu  
145 150 155 160  
Ala Leu Thr Cys Met Tyr Asn Lys Ile Pro Val Gly Ser Glu Glu Gly  
165 170 175  
30 Tyr Arg Ala Leu Phe Ser Gln Val Leu Arg Asn Thr Val Glu Asn Ile  
180 185 190  
Ser Met Arg Ile Gln Asp Asn Gly Ile Ile Gly Asn Ile Tyr Ser Thr  
195 200 205  
35 Gly Leu Ala Met Gln Ala Leu Ser Val Thr Pro Glu Gln Pro Asn Lys  
210 215 220  
Glu Trp Asp Cys Gln Lys Thr Met Asp Thr Val Leu Thr Glu Ile Lys  
225 230 235 240  
40 Glu Gly Lys Phe His Asn Pro Met Ala Ile Ala Gln Ile Leu Pro Ser  
245 250 255  
Leu Lys Gly Lys Thr Tyr Leu Asp Val Pro His Val Ser Cys Ser Pro  
260 265 270  
Gly His Glu Val Pro Pro Thr Leu Pro Asn His Pro Ser Pro Val Pro  
275 280 285  
45 Thr Pro Ala Pro Asn Ile Thr Val Ile Tyr Thr Ile Asn Asn Gln Leu  
290 295 300  
Arg Gly Val Glu Leu Leu Phe Asn Glu Thr Ile Ser Val Ser Val Lys  
305 310 315 320  
50 Arg Gly Ser Val Leu Leu Ile Val Leu Glu Glu Ala Gln Arg Lys Asn  
325 330 335  
Pro Lys Phe Lys Phe Glu Thr Thr Met Thr Ser Trp Gly Pro Val Val  
340 345 350  
55 Ser Ser Ile Asn Asn Ile Ala Glu Asn Val Asn His Arg Thr Tyr Trp  
355 360 365  
Gln Phe Leu Ser Gly Gln Thr Pro Leu Asn Glu Gly Val Ala Asp Tyr  
370 375 380  
60 Ile Pro Phe Asn His Glu His Ile Thr Ala Asn Phe Thr Gln Tyr  
385 390 395

<210> 10

<211> 30

65 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

## ES 2 321 030 T3

	<220>	
	<223> Cebador Directo huIF200For	
5	<400> 10	
	tacaactga aggcccagaa gctcctgact	30
10	<210> 11	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador Inverso huIF Inverso 1	
20	<400> 11	
	ttagtactgt gtgaaattgg ctgtgatgtg ctc	33
25	<210> 12	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador Directo huIF-For14	
35	<400> 12	
	cctctacct cctgagcctt ctctgggct	29
40	<210> 13	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador Inverso hu1F 1248Rev	
50	<400> 13	
	ctgttgaaa ttggctgtga tgtgc	25
55	<210> 14	
	<211> 39	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Directo pIFMP-ForI	
65	<400> 14	
	atacagaatt catgagcacc cagaccgaa getcatget	39

## ES 2 321 030 T3

	<210> 15	
	<211> 44	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Inverso pIFMP-RevXhoI	
10	<400> 15	
	gatacctcga gttagtactg tgtgaaattg gctgtgatgt gctc	44
15	<210> 16	
	<211> 36	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Directo pIF-PIC-MP-For EcoRI	
25	<400> 16	
	atacagaatt cagcaccag acccgaagct catgct	36
30	<210> 17	
	<211> 44	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Inverso pIF-MP-pMAL-SalI Rev	
40	<400> 17	
	gatatgctga cttagtactg tgtgaaattg gctgtgatgt gctc	44
45		
50		
55		
60		
65		