



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



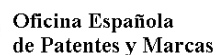
Oficina Española
de Patentes y Marcas

Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P200930659	
Fecha de recepción:	07 septiembre 2009, 14:31 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES1641.42	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UN VECTOR DE EXPRESION DE UNA PROTEINA RECOMBINANTE SIN AMINOACIDOS ADICIONALES	
Documentos enviados:	Descripcion-1.pdf (27 p.) Reivindicaciones-1.pdf (3 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) Dibujos-1.pdf (5 p.) FEERCPT-1.pdf (1 p.)	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS CONSULTORES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL SA - CIF A28750891 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	07 septiembre 2009, 14:31 (CEST)	
Codificación del envío:	A5:12:CA:A1:45:C2:89:72:32:F4:B2:55:EC:F6:BD:9C:E7:BE:6C:79	

/Madrid, Oficina Receptora/



(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	[X] []
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPANOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	[X] [] [] [] [] [] []
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.ºSOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
(4) LUGAR DE PRESENTACION: LUGAR		OEPM, Presentación Electrónica
(5-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL: NACIONALIDAD: CODIGO PAÍS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CODIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CODIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCION DEL DERECHO: INVENCION LABORAL: CONTRATO: SUCESSION:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC) España ES Q2818002D AVDA. MARIA LUISA, S/N PABELLON DE PERU SEVILLA 41 Sevilla 41013 España ES [X] [] []
(6-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CODIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	GONZALEZ GRAU JUAN MIGUEL España ES
(6-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CODIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	CABRAL SANTANA MARGARIDA España ES
(6-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CODIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	PORTILLO GUIADO MARIA CARMEN España ES
(7) TITULO DE LA INVENCION:		PROCEDIMIENTO PARA LA

		OBTENCION DE UN VECTOR DE EXPRESION DE UNA PROTEINA RECOMBINANTE SIN AMINOACIDOS ADICIONALES
(8) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI NO	[] [✓]
(9) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN	SI NO	[] [✓]
(10) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:	SI NO	[] [✓]
(11) DEPÓSITO:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	
(12) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:	LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS	[] []
(13) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR: FECHA:	
(14) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:	
(15) AGENTE/REPRESENTANTE:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/CIF/PASAPORTE: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: NÚMERO DE PODER:	PONS ARIÑO ANGEL España ES 50534279-T GLORIETA DE RUBEN DARIO, 4 MADRID 28 Madrid 28010 España ES 20081765
(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:	DESCRIPCIÓN: REIVINDICACIONES: DIBUJOS: RESUMEN: FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: ARCHIVO DE PRECONVERSION: DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: JUSTIFICANTE DE PAGO (1): LISTA DE SECUENCIAS PDF:	[✓] N.º de páginas: 27 [✓] N.º de reivindicaciones: 14 [✓] N.º de dibujos: 3 [✓] N.º de páginas: 1 [] N.º de figura(s): [] [] N.º de páginas: [✓] N.º de páginas: 1 [] N.º de páginas:

ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: OTROS (Aparecerán detallados):	[]
(17) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA: DOC COPIA DNI: DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENIA DE MEDIOS: DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: DOC COPIA OTROS:	[] [] N.º de páginas: [] N.º de páginas: [] N.º de páginas: [] N.º de páginas: [] N.º de páginas: [] N.º de páginas:
(18) NOTAS:	
(19) FIRMA DIGITAL: FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE: LUGAR DE FIRMA: FECHA DE FIRMA:	ENTIDAD PONS CONSULTORES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL SA - CIF A28750891 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J MADRID 07 Septiembre 2009

 MINISTERIO DE INDUSTRIA, TURISMO Y COMERCIO	 Oficina Española de Patentes y Marcas	TASA en materia de Propiedad Industrial CÓDIGO 511	Modelo 791
--	--	---	-----------------------

Identificación						
Sujeto Pasivo:						
N.I.F.:	Apellidos y Nombre o Razón social:					
Calle/Plaza/Avda.:	Nombre de la vía pública:	Nº	Esc	Piso	Puerta	Tfno.
Municipio:	Provincia:	Código Postal:				
Agente o Representante legal: (1)						
N.I.F.:	Apellidos y Nombre o Razón social:					
A28750891	PONS CONSULTORES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL SA					
Calle/Plaza/Avda.:	Nombre de la vía pública:	Nº	Esc	Piso	Puerta	Tfno.
Municipio:	Provincia:	Código Postal:				
Código de Agente o Representante: (2)	Dígito de control:					
0000	0					

Autoliquidación					
Titular del expediente si es distinto del pagador:					
Expediente Modalidad:	P	Número:		Tipo: (3)	
Clave:	IE01	Año:	2009	Concepto:	Solicitud de Invención por Internet
Unidades:	1	Importe:	77,94		
Referencia OEPM:	88009867234				
909992100200188009867234					

Declarante	Ingreso			
Fecha:	04/09/2009			
Firma:				
PONS CONSULTORES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL SA	Importe en Euros:			
	Adeudo en cuenta:			
	Entidad:	Oficina:	D.C.	Nro. Cuenta
	2100			
	NRC Asignado:	7915110628993Y1DC6D4E6		

- (1) Solo cuando el pago se realice con cargo a la cuenta corriente del representante o agente.
- (2) En el caso de que tenga asignado un número por la OEPM.
- (3) En el caso de patentes europeas, se pondrá una P si es el número de publicación o una S si es el número de solicitud.
- (4) Una copia de este impreso se acompañará con la presentación de documentación en la OEPM.



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS		
Hoja informativa sobre pago de tasas de una solicitud de patente o modelo de utilidad		
1. REFERENCIA DE SOLICITUD	ES1641.42	
2. TASAS	Importe (en euros)	
Concepto	Código de barras asignado	Importe
Solicitud de demanda de depósito o de rehabilitación.	88009867234	77,94
Solicitud de cambio de modalidad en la protección		0,00
Prioridad extranjera (0)		0,00
Petición IET		0,00
El solicitante se acoge a la exención del pago de tasas	☐	
El solicitante es una Universidad pública	☐	
Importe total		77,94
Importe abonado		77,94
Importe pendiente de pago		0,00

Se ha aplicado el 15% de descuento sobre la tasa de solicitud de acuerdo con la D. Adic. 8.2 Ley de Marcas.

Si no hubiera realizado el pago previamente al envío de la solicitud, consignando los números del código de barras en la casilla correspondiente, recibirá una notificación de la Oficina Española de Patentes y Marcas a partir de la recepción de la cual tendrá un mes para realizar dicho pago.

Transcurrido este plazo, sin que se hubiera procedido al pago de la tasa de solicitud, la solicitud de patente de invención o de modelo de utilidad se tendrá por desistida.

Procedimiento para la obtención de un vector de expresión de una proteína recombinante sin aminoácidos adicionales.

- La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología.
- 5 Específicamente, se refiere a un procedimiento para la obtención de una proteína recombinante sin aminoácidos adicionales, a un adaptador empleado para la realización de dicho procedimiento, así como a los vectores obtenidos mediante dicho procedimiento, a las células huésped que comprenden estos vectores y a la proteína recombinante de la expresión de dichas células.
- 10 Finalmente, la invención se refiere a un kit para llevar a cabo el procedimiento de la invención.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

- 15 La clonación y expresión de proteínas recombinantes es un paso decisivo para el estudio y caracterización de proteínas. La producción de proteínas recombinantes permite obtener un mejor rendimiento y una mayor pureza que la obtención de proteínas nativas a partir del organismo que la produce de forma natural. El diseño de estrategias de clonación resulta tedioso ya que la
- 20 posición del gen que codifica esa proteína ha de insertarse exactamente en el punto adecuado de forma que la lectura de los tripletes de nucleótidos sea correcta y se respete la traducción de los aminoácidos adecuados.

- La estrategia de clonación más común en la actualidad es la de fusionar a la
- 25 proteína recombinante que se desea obtener a una secuencia de aminoácidos conocida (glutathione S-transferase o GST [GE Healthcare, Novagen], His-tag [GE Healthcare, Novagen], Lytag [Biomedal], calmodulin-binding peptide, CBP [Stratagene], etc) que facilita la expresión y posterior purificación de la proteína recombinante. El empleo de estas proteínas de fusión facilita enormemente la
- 30 purificación de proteínas recombinantes. Sin embargo, un inconveniente de estas estrategias de clonación es que incorporan aminoácidos adicionales (no presentes en la proteína nativa) a la proteína recombinante final. Para reducir el

efecto de estas adiciones, tras el proceso de purificación, se elimina una parte de esa proteína fusionada a la proteína de interés utilizando digestión por proteasas como la enterokinasa (Biomedal), *AKH signal peptide* (Novagen) o Factor Xa (GE Healthcare), entre otras. No obstante, aún después de esta
5 digestión, el número de aminoácidos adicionales (no originales) que quedan fusionados a la proteína deseada ronda entre dos y más de 30, dependiendo de lo depurada de la clonación realizada y del kit de clonación empleado. Hoy en día los kits de clonación comerciales para la expresión de proteínas recombinantes de fusión incorporan aminoácidos adicionales en el rango
10 mencionado.

La adición de aminoácidos adicionales a las proteínas recombinantes puede producir comportamientos indeseados y cambios en las propiedades de la proteína expresada y que se desea estudiar. Por ejemplo, la producción de
15 anticuerpos a partir de proteínas recombinantes ha de llevarse a cabo con proteínas nativas o proteínas recombinantes sin ninguna adición de aminoácidos ya que se puede alterar la estructura tridimensional de la proteína recombinante o afectar los puntos de reconocimiento del anticuerpo, y por tanto, reducir o anular la eficiencia en la detección de la proteína deseada por
20 parte del anticuerpo. Este problema a menudo obliga a trabajar con proteínas nativas, lo que dificulta grandemente el proceso de purificación.

Por tanto, existe la necesidad de disponer de un método de clonación en el que la proteína obtenida sea fácil de purificar (utilizando proteínas fusionadas o
25 tags), y que tras la purificación nos permita eliminar fácil y absolutamente todos los aminoácidos que no pertenezcan a la secuencia aminoacídica de la proteína original.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

30

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de una proteína recombinante sin aminoácidos adicionales, a un adaptador empleado

para la realización de dicho procedimiento, así como a los vectores obtenidos mediante dicho procedimiento, a las células huésped que comprenden estos vectores, y a la proteína recombinante de la expresión de dichas células. Finalmente, la invención se refiere a un kit para llevar a cabo el procedimiento de la invención.

Esta invención proporciona una solución rápida, versátil y sencilla a la necesidad de obtener proteínas recombinantes sin aminoácidos adicionales que no pertenezcan a la secuencia aminoacídica de la proteína nativa y que puedan producir cambios o comportamientos indeseados en dichas proteínas. Los campos de aplicación de la presente invención son numerosos ya que en la actualidad se emplean proteínas recombinantes en muy diversas áreas, como por ejemplo en medicina, farmacia, agricultura o alimentación.

De manera general, la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de una proteína recombinante sin aminoácidos adicionales (de ahora en adelante, proteína de interés) que puede comprender los siguientes pasos:

A) Obtener:

20

- un vector de expresión que comprende:

- i) una secuencia que codifica para una etiqueta de purificación (Tag), y
- ii) tres sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de tipo II (R II 1, R II 2 y R II 3),

25

en el siguiente orden 5' - R II 1 - R II 2 - R II 3 - Tag - 3',

30

- una secuencia de ADN de doble cadena que comprende una secuencia que codifica para la proteína de interés (Sec) caracterizada porque presenta dos extremos compatibles con extremos generados por las

enzimas de restricción II (II 2 y II 3) (E II 2 y E II 3) en el siguiente orden
5' - E II 2 - Sec - E II 3 - 3',

y

5

- un adaptador que consiste en una secuencia de ADN de doble cadena que comprende:

- 10 i) dos extremos compatibles con extremos de un vector generados por enzimas de restricción de tipo II (E II 1 y E II 2), y
- ii) dos sitios de reconocimiento de un enzima de restricción de tipo IIS (R IIS 1 y R IIS 2) orientados en distinto sentido en el siguiente orden
5' - E II 1 - R IIS 1 - R IIS 2 - E II 2 - 3'.

15 B) digerir el vector de expresión del paso (A) con las enzimas de restricción II 1 y II 2,

C) clonar el adaptador obtenido en el paso (A) en el vector obtenido en el paso (B),

20

D) digerir el vector obtenido en el paso (C) con las enzimas de restricción II 2 y II 3,

25 E) clonar direccionalmente la secuencia de ADN del paso (A) en el vector obtenido en el paso (D),

30 F) digerir el vector obtenido en el paso (E) con la enzima de restricción IIS, de manera que es eliminada la secuencia nucleotídica, incluyendo el adaptador, que se encuentra entre la secuencia nucleotídica que codifica para la etiqueta de purificación del vector y la secuencia nucleotídica que comprende la secuencia que codifica para la proteína de interés,

G) religar el vector del paso (F) de manera que no quedan nucleótidos adicionales entre el último o el primer triplete de la secuencia de ADN que codifica para la etiqueta de purificación del vector y el primer o el último triplete de la secuencia de ADN que codifica para la proteína de interés,

5

H) introducir el vector obtenido en el paso (G) en una célula huésped,

I) purificar la proteína de fusión expresada en la célula huésped del paso (H), y

10

J) eliminar la etiqueta de purificación de la proteína de fusión del paso (I) mediante una proteasa, de manera que la proteína resultante es la proteína de interés nativa, es decir, no tiene ningún aminoácido adicional producto de la expresión de una secuencia de nucleótidos incorporada como consecuencia del procedimiento de clonación.

15

En este procedimiento los pasos (B) y (C) pueden llevarse a cabo después de los pasos (D) a (E).

20 Un primer aspecto de la invención se refiere a un adaptador para la obtención de una proteína recombinante sin aminoácidos adicionales (de ahora en adelante, adaptador de la invención) que consiste en una secuencia de ADN de doble cadena que comprende:

- 25 i) dos extremos compatibles con extremos de un vector generados por enzimas de restricción de tipo II (E II 1 y E II 2), y
- ii) dos sitios de reconocimiento de una enzima de restricción de tipo IIS (R IIS 1 y R IIS 2) orientados en distinto sentido en el siguiente orden 5' - E II 1 - R IIS 1 - R IIS 2 - E II 2 - 3'.

30

El adaptador de la invención puede obtenerse mediante cualquier método biológico o sintético, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, la restricción

de secuencias apropiadas o la hibridación de oligonucleótidos obtenidos mediante síntesis química directa.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de un
5 vector (de ahora en adelante, procedimiento primero de la invención) que comprende:

- a) digerir con las enzimas de restricción II 1 y II 2 un vector de expresión
que comprende:
- 10 i) una secuencia que codifica para una etiqueta de purificación (Tag), y
- ii) tres sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de tipo II (R II 1, R II 2 y R II 3) en el siguiente orden 5' - R II 1 - R II 2 - R II
15 3 - Tag - 3'.

y

- b) clonar el adaptador de la invención en el vector obtenido en el paso (a).
- 20

Otro aspecto de la invención se refiere a un vector obtenible por el procedimiento primero de la invención (de ahora en adelante, vector primero de la invención).

- 25 Otro aspecto de la invención se refiere a una célula huésped que comprende el vector primero de la invención (de ahora en adelante, célula huésped primera de la invención).

- Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de un
30 vector (de ahora en adelante, procedimiento segundo de la invención) que comprende:

- a) digerir con las enzimas de restricción II 1 y II 2 un vector de expresión que comprende:
- i) una secuencia que codifica para una etiqueta de purificación (Tag), y
 - ii) tres sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de tipo II (R II 1, R II 2 y R II 3) en el siguiente orden 5' - R II 1 - R II 2 - R II 3 - Tag - 3',
- b) clonar el adaptador de la invención en el vector obtenido en el paso (a),
- c) obtener una secuencia de ADN de doble cadena que comprende una secuencia que codifica para una proteína de interés (Sec) caracterizada porque presenta dos extremos compatibles con extremos generados por las enzimas de restricción II 2 y II 3 (E II 2 y E II 3) en el siguiente orden 5' - E II 2 - Sec - E II 3 - 3',
- d) digerir con las enzimas de restricción E II 2 y E II 3 el vector obtenido en el paso (b), y
- e) clonar la secuencia de ADN del paso (c) en el vector obtenido en el paso (d).

Otro aspecto de la invención se refiere a un vector obtenible por el procedimiento segundo de la invención (de ahora en adelante, vector segundo de la invención).

Otro aspecto de la invención se refiere a una célula huésped que comprende el vector segundo de la invención (de ahora en adelante, célula huésped segunda de la invención).

En el procedimiento descrito anteriormente, los pasos (a) y (b) pueden llevarse a cabo después de los pasos (c) a (d). Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de un vector (de ahora en adelante, procedimiento tercero de la invención) que comprende:

5

- a) obtener una secuencia de ADN de doble cadena que comprende una secuencia que codifica para una proteína de interés (Sec) caracterizada porque presenta dos extremos compatibles con extremos generados por las enzimas de restricción II 2 y II 3 (E II 2 y E II 3) en el siguiente orden

10

5' - E II 2 - Sec - E II 3 - 3',

- b) digerir con las enzimas de restricción II 2 y II 3 un vector de expresión que comprende:

15

- i) una secuencia que codifica para una etiqueta de purificación (Tag), y
- ii) tres sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de tipo II (II 1, II 2 y II 3) en el siguiente orden 5' - R II 1 - R II 2 - R II 3 - Tag - 3',

20

- c) clonar la secuencia de ADN del paso (a) en el vector obtenido en el paso (b),

25

- d) digerir con las enzimas de restricción II 1 y II 2 el vector obtenido en el paso (c), y

- e) clonar el adaptador de la invención en el vector obtenido en el paso (d).

30

Otro aspecto de la invención se refiere a un vector obtenible por el procedimiento tercero de la invención (de ahora en adelante, vector tercero de la invención).

Otro aspecto de la invención se refiere a una célula huésped que comprende el vector tercero de la invención (de ahora en adelante, célula huésped tercera de la invención).

- 5 La secuencia de ADN de doble cadena que comprende la secuencia que codifica para la proteína de interés (Sec) puede obtenerse mediante cualquier método biológico o sintético, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, la restricción de secuencias apropiadas o la amplificación de la secuencia de ADN de la proteína de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por ejemplo, empleando oligonucleótidos cebadores apropiados pueden incorporarse mediante PCR los sitios de reconocimiento y corte de las enzimas de restricción II 2 y II 3 en los extremos de la secuencia de ADN que codifica para la proteína de interés. La abreviatura Sec, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de interés.

- Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un vector de expresión de una proteína recombinante sin aminoácidos adicionales (de ahora en adelante, procedimiento cuarto de la invención), que comprende:

- a) digerir con la enzima de restricción IIS el vector segundo o tercero de la invención, y
- 25 b) religar el vector obtenido en el paso (a).

- El adaptador de la invención se diseña de manera que cuando se digiere el vector segundo o tercero de la invención con la enzima de restricción IIS, es eliminada la secuencia nucleotídica, incluyendo el adaptador, que se encuentra entre la secuencia nucleotídica que codifica para la etiqueta de purificación del vector y la secuencia nucleotídica que comprende la secuencia que codifica para la proteína de interés.

Por tanto, cuando se religa el vector, no quedan nucleótidos adicionales entre el último triplete de la secuencia de ADN que codifica para la etiqueta de purificación del vector (Tag) y el primer triplete de la secuencia de ADN que codifica para la proteína de interés (Sec), o entre el primer triplete de la
5 secuencia de ADN que codifica para la etiqueta de purificación del vector (Tag) y el último triplete de la secuencia de ADN que codifica para la proteína de interés (Sec). Para obtener una proteína de fusión es evidente que la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de interés (Sec) y la secuencia de nucleótidos que codifica para la etiqueta de purificación (Tag) deben
10 encontrarse en el marco de lectura correcto y no debe existir ningún codón de terminación entre ambas.

Otro aspecto de la invención se refiere a un vector obtenible por el procedimiento cuarto de la invención (de ahora en adelante, vector cuarto de la
15 invención o vector de expresión de una proteína recombinante sin aminoácidos adicionales).

Otro aspecto de la invención se refiere a una célula huésped que comprende el vector cuarto de la invención (de ahora en adelante, célula huésped cuarta de
20 la invención).

Otro aspecto de la invención se refiere a una proteína de fusión expresada por la célula huésped cuarta de la invención (de ahora en adelante, proteína de fusión de la invención).
25

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de una proteína recombinante sin aminoácidos adicionales (de ahora en adelante, procedimiento quinto de la invención), que comprende:

- 30
- a) purificar la proteína de fusión de la invención, y
 - b) eliminar la etiqueta de purificación de la proteína de fusión del paso (a) mediante una proteasa.

Otro aspecto de la invención se refiere a la proteína recombinante sin aminoácidos adicionales obtenible por el procedimiento quinto de la invención.

5 Los términos “secuencia de aminoácidos” o “proteína” se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados.

10 Los términos “secuencia nucleotídica”, “secuencia de nucleótidos”, “ácido nucleico”, “oligonucleótido” y “polinucleótido” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados. Preferiblemente, los nucleótidos son desoxinucleótidos, y la
15 secuencia nucleotídica es un molécula de ADN de doble cadena. Esta secuencia nucleotídica puede obtenerse, por ejemplo, a partir de ARN de cadena simple por procedimientos estándar de transcripción inversa.

La expresión “sin aminoácidos adicionales”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a que la proteína de interés una vez expresada,
20 purificada y procesada mediante una proteasa tiene la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa, es decir, no tiene ningún aminoácido adicional producto de la expresión de una secuencia de nucleótidos incorporada como consecuencia del procedimiento de clonación.

25 Los términos “adaptador” o “casette”, tal y como se utilizan en la presente descripción, se refieren a una secuencia nucleotídica que contiene idealmente los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de tipo IIS (R IIS 1 y R IIS 2) en sentidos opuestos y colocados estratégicamente para el fin descrito. En una realización preferida el adaptador además comprende un sitio de
30 reconocimiento para una enzima de restricción (Rc) que no esté presente en el vector para detectar la inserción de este adaptador en el vector. El tamaño del adaptador es función de los sitios de reconocimiento de la enzimas IIS

seleccionadas, de la distancia a la que han de cortar que depende del vector utilizado y del sitio de reconocimiento de la enzima empleada para detectar la inserción del adaptador en el vector. La adición de nucleótidos sin función definida puede dar lugar a adaptadores muy largos que encarecerían su
5 síntesis.

El término “proteína recombinante”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una proteína codificada por un ADN recombinante. El término “ADN recombinante”, tal y como se utiliza en la presente descripción se
10 refiere a una molécula de ADN formado por recombinación de orígenes diferentes. La expresión “recombinación”, tal y como se utilizan en la presente descripción se refiere a la unión de moléculas de ADN para dar lugar a nuevas combinaciones, ya sea biológicamente o por medio de la manipulación en laboratorio (por ejemplo, mediante ingeniería genética).

15 Los términos “enzima de restricción” o “endonucleasa de restricción”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una enzima que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN (de ahora en adelante, sitio de reconocimiento) y cortar el ADN en ese
20 punto en concreto o en un sitio no muy lejano a éste (de ahora en adelante, sitio de corte).

El término “enzima de restricción de tipo II”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un tipo de enzima de restricción que sólo tiene
25 actividad de restricción (carece de actividad de modificación), únicamente requiere Mg^{++} como cofactor (no requiere de cofactores como ATP o S-adenosilmetionina), y corta al ADN en el sitio de reconocimiento. Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término “enzima de restricción de tipo II” excluye las enzimas de restricción de tipo IIS. Las enzimas de restricción
30 denominadas en la presente descripción como enzimas II 1, II 2 y II 3 son enzimas de restricción de tipo II. Las abreviaturas R II 1, R II 2 y R II 3, tal y como se emplean en la presente descripción, se refieren a sitios de

reconocimiento para las enzimas II 1, II 2 y II 3, respectivamente. Las abreviaturas E II 1, E II 2 y E II 3, tal y como se emplean en la presente descripción, se refieren a extremos compatibles con los extremos generados por las enzimas II 1, II 2 y II 3, respectivamente.

5

El término “enzima de restricción de tipo IIS”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a un tipo de enzima de restricción que sólo tiene actividad de restricción (carece de actividad de modificación), únicamente requiere Mg^{++} como cofactor (no requiere de cofactores como ATP o S-adenosilmetionina), y corta al ADN en un sitio distinto del sitio de reconocimiento. La enzima de restricción denominada en la presente descripción como enzima IIS es un enzima de restricción de tipo IIS. Las abreviaturas R IIS 1 y R IIS 2, tal y como se emplean en la presente descripción, se refieren a dos sitios de reconocimiento para la enzima IIS orientados en sentido contrario.

15

El mecanismo de corte de ADN por la enzima de restricción se realiza a través de la ruptura de dos enlaces fosfodiéster en la doble cadena, lo que da lugar a dos extremos de ADN. Según el tipo de enzima, se pueden generar extremos cohesivos o extremos romos.

20

El término “extremos compatibles”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a extremos de dos moléculas de ADN de doble cadena distintas que pueden ser ligados entre sí.

25

Los extremos romos son generados cuando la enzima corta las dos cadenas de ADN por el mismo lugar, generando dos extremos de doble cadena. Los extremos romos pueden ser ligados a otros extremos romos cualesquiera, es decir, un extremo romo es compatible con cualquier otro extremo romo. La reacción de ligación entre dos extremos romos ocurre por lo general con menor eficacia que la reacción de ligación entre dos extremos cohesivos. En resumen, las enzimas de corte romo proporcionan alta versatilidad, pero baja eficacia

30

para la generación de ADN recombinante aunque también pueden ser utilizadas para la clonación y expresión de proteínas.

5 Los extremos cohesivos son generados cuando la enzima corta las dos hebras
asimétricamente, dejando dos extremos de cadena simple complementarios
entre sí. La complementariedad de bases en los extremos cohesivos facilita la
unión de los fragmentos; de manera que las moléculas de ADN cortadas con
un determinado enzima de restricción de corte cohesivo tienen extremos
10 compatibles con otras moléculas cortadas con el mismo enzima de restricción
de corte cohesivo o con otro enzima de restricción de corte cohesivo que
genere extremos de cadena simple idénticos. Los cortes cohesivos tienen por
tanto dos propiedades importantes en clonación: especificidad (sólo se pueden
religar con extremos cohesivos idénticos) y eficacia (la complementariedad de
bases en los extremos cohesivos facilita la unión de las moléculas de ADN
15 generadas por el corte mediante puentes de hidrógeno que facilitan la reacción
de ligación).

En una realización preferida de cualquiera de los aspectos de la presente
invención, las enzimas de restricción de tipo II (II 1, II 2 y/o II 3) son enzimas de
20 restricción de corte cohesivo. Por tanto, en una realización preferida, los
extremos del adaptador o los extremos de la secuencia de ADN de doble
cadena que comprende la secuencia que codifica para la proteína de interés
son extremos compatibles con lo extremos cohesivos generados por las
enzimas de restricción II 1, II 2 y/o II 3 (E II 1, E II 2 y/o E II 3) en los vectores
25 de la invención.

Algunos ejemplos de enzimas de restricción de tipo II que tienen extremos
romos son, pero sin limitarse, Fspl, HindII, EcoRV, HpaI, MscI, NaeI, NruI,
PvuII, SmaI, SfoI, SmaI, SnaBI o StuI.

30

Algunos ejemplos de enzimas de restricción de tipo II que tienen extremos
cohesivos son, pero sin limitarse, Acc65I, AclI, AgeI, ApaLI, Apol, AscI, AsiSI,

AvrII, BamHI, BclI, BfaI, BglII, BsaWI, BsiW, BspEI, BspHI, BssHI, BsrGI, BstBI, BstYI, ClaI, EaeI, EagI, EcoRI, HpaII, HinPII, MfeI, MluI, MseI, NarI, NcoI, NdeI, NheI, NotI, NsiI, PaeI, PciI, PspXI, PstI, PvuI, RcaI, Sall, SbfI, SfiI, SpeI, XbaI, XhoI o XmaI. Los sitios de reconocimiento y de corte de dichas enzimas son
5 conocidos en el estado de la técnica.

Algunos grupos de enzimas de restricción de tipo II que tienen extremos cohesivos compatibles son, por ejemplo, pero sin limitarse, BglII, BamHI, BclI y BstYI; EcoRI, MfeI y ApeI; PstI, NsiI y SbfI ; ApaI y SfiI; NcoI, BspHI, RcaI y
10 PciI ; SpeI, NheI, XbaI y AvrII; Acc65I, BsiWI y BsrGI; AclI, ClaI, BstBI, HinPII, HpaII, y NarI AgeI, XmaI, BsaWI y BspEI; MluI, AscI y BssHI; AscI, NdeI, MseI y BfaI; PvuI, PaeI y AsiSI; EaeI, EagI y NotI; o XhoI, PspXI y Sall.

Algunos ejemplos de enzimas de restricción de tipo IIS son, pero sin limitarse,
15 AarI, Acc36I, AceIII, AclWI, AfoI, AfoI, Afo26I, AfoXI, AsuHPI, BaeI, Bbr7I, BbsI, BbvI, BbvII, Bbv16II, BccI, Bce83I, BceAI, Bcefl, Bcgl, BciVI, Bco5I, Bco116I, BcoKI, Bfil, Bful, BfuAI, BinI, Bli736I, Bme585I, Bmrl, Bmul, Bpil, Bpml, BpuAI, BpuEI, BpuSI, Bsal, BsaXI, BscAI, BseMII, BseRI, BsgI, BsmAI, BsmFI, Bsp24I, BspCNI, BspMI, BsrDI, BstF5I, BtgZI, BtsI, CjeI, CjePI, CspCI, CstMI, Ecil,
20 Eco31I, Eco57I, Eco57MI, Esp3I, Fall, Faul, FokI, GsuI, HaeIV, Hgal, Hin4I, HphI, HpyAV, Ksp632I, MbolI, MlyI, Mmel, MnlI, PfiI, Ppil, PstI, RleAI, SapI, SfaNI, SspD5I, SthI32I, StsI, TaqII, TspDTI, TspGWI, TstI o Tth111II. Los sitios de reconocimiento y de corte de dichas enzimas son conocidos en el estado de la técnica.

25

La expresión “orientados en distinto sentido”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la capacidad de las enzimas de restricción de tipo IIS de cortar la secuencia de ADN a cierta distancia del punto de reconocimiento y a un solo lado de éste. Orientando la secuencia de
30 reconocimiento en dirección 5' a 3' o 3' a 5' se consigue que estas enzimas corten a cierta distancia en la secuencia de ADN relativo al punto de reconocimiento. La orientación de la secuencia de reconocimiento determina

exactamente el punto de corte del enzima de restricción de tipo IIS. Por tanto, se puede diseñar el punto exacto donde ha de estar el sitio de reconocimiento para que el corte se produzca en el lugar necesario. De esta forma se pueden obtener dos cortes fuera de la secuencia del cassette introducido y en los puntos
 5 de corte necesarios para el diseño experimental deseado consiguiéndose la eliminación de nucleótidos y codones adicionales.

El término “vector de clonación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ADN en la que se puede integrar otro
 10 molécula de ADN, sin que pierda la capacidad de autorreplicación. Ejemplos de vectores de expresión son, pero sin limitarse, plásmidos, cósmidos, fagos de ADN o cromosomas artificiales de levadura.

El término vector de “expresión”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un vector de clonación adecuado para expresar un
 15 ácido nucleico que ha sido clonado en el mismo tras ser introducido en una célula, denominada célula huésped. Dicho ácido nucleico se encuentra, por lo general, unido operativamente a secuencias de control.

Ejemplos de vectores de expresión que pueden emplearse en el paso (a) del procedimiento segundo o en el paso (b) del procedimiento tercero, son pero sin limitarse, los de la familia de vectores pGEX (de GE Healthcare), los de la familia de vectores pALEX (de Biomedal), los de la familia de vectores pDEST, la familia de vectores, pIEx, pTriEx, pBiEx o pBAC (Novagen), el vector pKLAC
 20 (New England Biolabs), los de la familia de vectores pET (por ejemplo, de), los de la familia de vectores pAdVantage (Promega), los de la familia de vectores pFLAG (Sigma-Aldrich) o los de la familia de vectores pBacPak (Clontech).

Los vectores primero, segundo, tercero o cuarto de la invención generados
 30 mediante los procedimientos primero segundo o tercero, a partir del vector de expresión empleado en el paso (a) del procedimiento segundo o en el paso (b) del procedimiento tercero, son asimismo vectores de expresión.

El termino “expresión” se refiere al proceso por el cuál se sintetiza un polipéptido a partir de un polinucleótido. Incluye la transcripción del polinucleótido en un ARN mensajero (ARNm) y la traducción de dicho ARNm en una proteína o un polipéptido. La expresión puede tener lugar, por ejemplo, en una célula huésped, pero también mediante cualquier proceso de expresión proteica *in vitro*.

El término “célula huésped”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier organismo procariota o eucariota que es recipiente de un vector de expresión, de clonación o de cualquier otra molécula de ADN. Las células huésped pueden ser células procarióticas como, por ejemplo, pero sin limitarse, *E. coli*, o eucarióticas como, por ejemplo, pero sin limitarse, células de levadura, insecto, anfibio o células de mamífero.

Los vectores de la presente invención pueden ser introducidos en una célula huésped mediante transformación o transfección. El término "transformación", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la introducción de un ácido nucleico exógeno al interior de una célula procariota. El término "transfección", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la introducción de un ácido nucleico exógeno al interior de una célula eucariota.

El término “secuencia de control”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a secuencias nucleotídicas que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias a las que están ligadas. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa. Ejemplos de secuencias de control, son por ejemplo, pero sin limitarse, promotores, señales de inicio de la transcripción, señales de terminación de la transcripción, señales de poliadenilación o activadores transcripcionales.

La expresión “unidos operativamente”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a un
5 polinucleótido, está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Como se usa aquí, el término “promotor” hace referencia a una región del ADN,
10 generalmente “aguas arriba” o “upstream” del punto de inicio de la transcripción, que es capaz de iniciar la transcripción en una célula. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores constitutivos, promotores específicos de tipo celular o de tejido o promotores inducibles o reprimibles.

15 Las secuencias de control dependen del origen de la célula en la que se quiere expresar el ácido nucleico. Ejemplos de promotores procariotas incluyen, por ejemplo, pero sin limitarnos, los promotores de los genes *trp*, *recA*, *lacZ*, *lacI*, *tet*, *gal*, *trc*, o *tac* de *E. coli*, o el promotor del gen α -amilasa de *B. subtilis*. Para
20 la expresión de un ácido nucleico en una célula procariota también es necesaria la presencia de un sitio de unión ribosomal situado “upstream” de la secuencia codificante. Secuencias de control apropiadas para la expresión de un polinucleótido en células eucariotas son asimismo conocidas en el estado de la técnica.

25 La expresión “clonar”, “clonación” o “clonado”, tal y como se utilizan en la presente descripción, se refieren a la inserción de una molécula de ADN en un vector de clonación.

30 La expresión “digerir”, “digestión” o “restricción”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refieren al corte de una molécula de ADN mediante, al menos, un enzima de restricción. La digestión de una molécula de ADN tiene

lugar cuando se pone en contacto dicho ADN con, al menos, un enzima de restricción, en un tampón, y a una temperatura apropiados para que la enzima inicie el proceso de digestión, cortando el ADN en varios fragmentos o moléculas de ADN.

5

Las expresiones “ligar”, “ligación” o “ligado”, tal y como se utilizan en la presente descripción, se refieren a la unión de forma covalente de dos moléculas de ADN. Estas expresiones incluyen a la inserción de una molécula de ADN dentro de un vector de clonación previamente linearizado mediante su
10 digestión con enzimas de restricción; que tiene como resultado es un vector recombinante y circular. Asimismo, estas expresiones incluyen las expresiones religar, religación o religado. Las expresiones “religar”, “religación” o “religado”, tal y como se utilizan en la presente descripción, se refieren a la unión de forma covalente de dos extremos de un vector de clonación linearizado previamente
15 mediante su digestión con enzimas de restricción; que tiene como resultado es un vector circular. La reacción de ligación la lleva a cabo una enzima ligasa de ADN, que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el 5’ de un fosfato y el 3’ de un nucleótido. La ligasa de ADN usada más habitualmente es la ligasa de ADN del fago T4, que requiere ATP como cofactor y que puede
20 reparar tanto extremos cohesivos como extremos romos, sin embargo, otras ligasas de ADN descritas en el estado de la técnica también pueden ser empleadas para llevar a cabo los procedimientos primero, segundo o tercero de la presente invención.

25 Los términos “etiqueta de purificación” o “etiqueta de afinidad”, tal y como se utilizan en la presente descripción, se refieren a una secuencia de aminoácidos que ha sido incorporada (generalmente, por ingeniería genética) a una proteína para facilitar su purificación. La etiqueta puede ser, por ejemplo, otra proteína o una secuencia corta de aminoácidos. Algunos ejemplos de etiquetas de
30 purificación conocidos en el estado de la técnica son, pero sin limitarse: péptido de unión a calmodulina (CBP), enzima glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa (MBP), estreptoavidina, tiorredoxina, proteína fluorescente

verde (GFP), His-tag, Streptag, c-Myc, Flag, o HA. La abreviatura Tag, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica para la etiqueta de purificación.

- 5 Las expresiones “purificar” o “purificación”, tal y como se utilizan en la presente descripción, se refieren a la separación de la proteína de fusión de la invención de una mezcla compleja de proteínas extraída de la célula cuarta de la invención. La extracción de la mezcla compleja de proteínas de la célula cuarta generalmente requiere la homogenización del tejido, por ejemplo, pero sin
10 limitarse, mecánicamente, enzimáticamente, mediante choque osmótico o sonicación, en un tampón de extracción adecuado para estabilizar las proteínas y/o evitar la acción de proteasas. Una vez obtenida la mezcla compleja de proteínas de la célula cuarta, la purificación puede ser llevada a cabo mediante diferentes métodos conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo,
15 pero sin limitarse, inmunoprecipitación, métodos electroforéticos o métodos cromatográficos. Algunos métodos cromatográficos son, por ejemplo, pero sin limitarse, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica o cromatografía de afinidad.
- 20 La expresión “proteína de fusión”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una proteína que comprende o está constituida por la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés y la secuencia de aminoácidos de la etiqueta de purificación. Se origina por expresión de un ADN recombinante en el que la secuencia nucleotídica que codifica la proteína de
25 interés se encuentra en el marco de lectura apropiado de la secuencia nucleotídica que codifica para la etiqueta de purificación.

- Los términos “proteasa” o “peptidasa”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una enzima que cataliza la degradación de proteínas
30 por hidrólisis de las uniones peptídicas. Algunos ejemplos proteasas son, pero sin limitarse, trombina, factor Xa o enteroquinasa.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo cualquiera de los procedimientos primero, segundo o tercero de la invención que comprende:

- 5 a) el adaptador de la invención, y
- b) un vector de expresión que comprende:
 - i) una secuencia que codifica para una etiqueta de purificación, y
 - ii) tres sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de tipo II
 - 10 (R II 1, R II 2 y R II 3) en el siguiente orden 5' - R II 1 - R II 2 - R II
 - 3 - Tag - 3'.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo el procedimiento cuarto:

- 15 a) el vector primero, segundo o tercero de la invención, y
- a) una proteasa.

Dicho kit puede comprender además, sin ningún tipo de limitación, tampones, cebadores, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo cualquiera de procedimientos de la invención.

25 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Muestra un ejemplo de cassette o adaptador. Se presenta un caso en el que la enzima de tipo IIS utilizada es *BtgZI* y los dos puntos de reconocimiento están orientados en distinto sentido (indicado por las flechas horizontales). Las flechas verticales indican los puntos de corte de dicho enzima de restricción.

Figura 2. Muestra un ejemplo del proceso de diseño, inserción y clonación de un gen de interés utilizando el vector pAlex2a (Biomedal). El producto obtenido, después de su purificación y digestión con enterokinasa, será la proteína recombinante sin ningún aminoácido adicional que no se encuentra en la proteína original o nativa. La digestión con enterokinasa elimina la proteína fusionada LYTAG. Este diseño utiliza dos puntos de corte de la enzima de tipo IIS, *BtgZI*. El proceso de inserción del cassette en el vector de clonación y expresión se describe en la Figura 2A mientras que el proceso de clonación de un gen de interés se describe en la Figura 2B.

Figura 3. Muestra un ejemplo del proceso de diseño, inserción y clonación de un gen de interés utilizando el vector pGEX-5X-1 (GE Healthcare). El producto obtenido, después de su purificación y digestión con Factor Xa, será la proteína recombinante sin ningún aminoácido adicional que no se encuentra en la proteína original o nativa. La digestión con la proteasa Factor Xa elimina la proteína fusionada GST. Este diseño utiliza dos puntos de corte de la enzima de tipo IIS, *BtgZI*. El proceso de inserción del cassette en el vector de clonación y expresión se describe en la Figura 3A mientras que el proceso de clonación de un gen de interés se describe en la Figura 3B.

EJEMPLOS

30

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos

ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

5

EJEMPLO 1. Diseño de un adaptador con dos sitios de reconocimiento de tipo IIS para la enzima *BtgZI* orientados en distinto sentido.

El diseño del cassette ha de tener en cuenta que los puntos de reconocimiento de las enzimas de restricción tipo IIS han de orientarse hacia los extremos exteriores de la secuencia del cassette y dirijan el corte al punto exacto del vector de expresión. De este modo el primer codon (que codifica para la metionina) en el gen a expresar quede inmediatamente detrás de la secuencia de la etiqueta de purificación que se eliminará con la proteasa adecuada tras el proceso de purificación de la proteína expresada. El ejemplo presentado (Figura 1) corresponde a un caso aplicado para modificar el vector pALEX2a (Biomedal) (Figura 2A). Es muy importante tener en cuenta el número de nucleótidos que serán eliminados al digerir con el enzima de restricción de tipo IIS seleccionado y comprobar que el punto de corte será en el punto necesario como se ha mencionado.

20

EJEMPLO 2. Diseño, inserción y clonación de un gen de interés utilizando el vector pAlex2a (Biomedal).

Este ejemplo permite demostrar que un vector de expresión como pALEX2a (Biomedal) se puede modificar con el fin de obtener la expresión de proteínas recombinantes sin ningún aminoácido adicional, es decir, exactamente idénticas a las proteínas nativas. Para ello, se procedió a digerir el vector pALEX2a con las enzimas *PshAI* y *EcoRV* (ambos dan lugar a extremos romos) y se volvió a clonar de forma que se eliminó el fragmento comprendido entre los puntos de corte de estos dos enzimas. El vector obtenido se digirió con *BamHI* y *Ascl* para insertar en ese punto un cassette previamente diseñado.

30

Este cassette contiene dos puntos de reconocimiento del enzima *BtgZI* orientados en distinto sentido, es decir con la secuencia de reconocimiento orientada en dirección 5'-3' en distinta hebra del ADN (indicado con flechas horizontales en la Figura 2A). Este cassette también contiene un punto de reconocimiento y de corte del enzima de restricción *NdeI*, no encontrado en el resto del vector pALEX2a que puede ser utilizado para comprobar por digestión con este enzima la presencia de este cassette en los clones que se obtienen y evaluar de este modo si la clonación ha ocurrido de modo satisfactorio. Los extremos cohesivos del cassette han sido diseñados para adaptarse a los extremos cohesivos dejados por los enzimas *BamHI* y *Ascl* en donde se insertará en el vector modificado. Tras ligación y clonación del cassette en el vector modificado se obtiene un vector listo para la inserción de genes que codifiquen proteínas en los puntos de clonación situados más adelante en la secuencia del vector. En este caso se seleccionó el punto entre los enzimas *Ascl* y *HindIII*. El gen a insertar se amplificó por PCR con los primers mostrados en la Figura 2B que llevan adicionados puntos de reconocimiento de estos dos enzimas para su clonación direccional en ese punto y de forma que el enzima *BtgZI* dirigido hacia el gen insertado corte en el punto exacto para lograr la expresión de un gen sin ningún aminoácido adicional e indeseado. Tras la clonación y expresión del gen de interés, este gen es purificado utilizando la etiqueta de purificación propia del vector pALEX2a, LYTAG. Una vez purificado, se digerirá con enterokinasa para eliminar esta etiqueta de purificación y obtener el gen deseado sin modificación alguna con respecto a la proteína nativa.

25

El procedimiento seguido se basa en métodos estándar comunes en cualquier laboratorio de biología molecular o biotecnología, utilizando procedimientos típicos de ligación, clonación y digestión de ADN con enzimas de restricción. Este procedimiento se esquematiza en la figura 2 para un caso práctico que se ha desarrollado a modo de ejemplo de la presente invención.

30

EJEMPLO 3. Diseño, inserción y clonación de un gen de interés utilizando el vector pGEX-5X-1 (GE Healthcare).

El ejemplo 3 es otro caso de la aplicación de los procedimientos presentados en esta invención. Este caso de aplicación se ha llevado a cabo con el vector pGEX-5X-1 (GE Healthcare).

Para ello, se procedió a digerir el vector pGEX-5X-1 con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI para insertar en ese punto un cassette previamente diseñado. Este cassette contiene dos puntos de reconocimiento del enzima *Btg*ZI orientados en distinto sentido, es decir con la secuencia de reconocimiento orientada en dirección 5'-3' en distinta hebra del ADN (indicado con flechas horizontales en la Figura 3A). Este cassette también contiene puntos de reconocimiento y de corte de los enzimas de restricción *Nde*I y *Kpn*I, no encontrados en el resto del vector pGEX-5X-1 que pueden ser utilizados para comprobar por digestión con este enzima la presencia de este cassette en los clones que se obtienen y evaluar de este modo si la clonación ha ocurrido de modo satisfactorio. El punto de reconocimiento y corte del enzima *Bam*HI se añade para satisfacer las distancias necesarias para los puntos de corte del enzima *Btg*ZI y para utilizarlo como punto de inserción del gen a expresar. Los extremos cohesivos del cassette han sido diseñados para adaptarse a los extremos cohesivos dejados por los enzimas *Bam*HI y *Eco*RI en donde se insertará en el vector modificado. Tras ligación y clonación del cassette en el vector modificado se obtiene un vector listo para la inserción de genes que codifiquen proteínas en los puntos de clonación situados más adelante en la secuencia del vector. En este caso se seleccionó el punto entre los enzimas *Bam*HI y *Sal*I. El gen a insertar se amplificó por PCR con los primers mostrados en la Figura 3B que llevan adicionados puntos de reconocimiento de estos dos enzimas para su clonación direccional en ese punto y de forma que el enzima *Btg*ZI dirigido hacia el gen insertado corte en el punto exacto para lograr la expresión de un gen sin ningún aminoácido adicional e indeseado. Tras la clonación y expresión del gen de interés, este gen es purificado utilizando la etiqueta de purificación

propia del vector pGEX-5x-1. Una vez purificado, se digerirá con la proteasa Factor Xa para eliminar esta etiqueta de purificación y obtener el gen deseado sin modificación alguna con respecto a la proteína nativa.

- 5 El procedimiento seguido se basa en métodos estándar comunes en cualquier laboratorio de biología molecular o biotecnología, utilizando procedimientos típicos de ligación, clonación y digestión de ADN con enzimas de restricción. Este procedimiento se esquematiza en la figura 3 para un caso práctico que se ha desarrollado a modo de ejemplo de la presente invención.

10

Brevemente, los pasos a seguir consisten en lo siguiente:

1. Construcción de secuencias adecuadas que constituyen el cassette. Los oligonucleótidos correspondientes a cada hebra del cassette a construir se sintetizan comercialmente (en nuestro caso se encargó a la compañía
15 Invitrogen), luego se hibridan para obtener el ADN de doble hebra que constituirá el cassette. Para la hibridación de estos dos oligonucleótidos, primero se calienta a 95°C una mezcla equimolar de ambos oligonucleótidos en tampón Tris-HCl (10 mM, pH 8.0) y se enfrían lentamente hasta alcanzar temperatura
20 ambiente. A la hora de diseñar estos cassettes han de tenerse en cuenta la posición y orientación de las secuencias de reconocimiento y los puntos de corte del (de las) enzima(s) de restricción de tipo IIS, las posiciones de inserción del gen a expresar (específicamente del codón de iniciación), así como del punto de corte de la proteasa que separará la proteína fusionada que
25 facilita la purificación de la proteína recombinante.

2. Inserción del cassette en un vector de clonación adecuado para la expresión de genes. Para ello, simplemente se abre el vector por digestión con enzimas de restricción que darán lugar a las secuencias complementarias que lleva el
30 cassette de forma que este se insertará direccionalmente. A continuación, una reacción de ligación típica, con ligasa del fago T4 da lugar al vector listo para su transformación en las células huésped. En nuestro caso, *Escherichia coli*.

3. El vector con el cassette insertado se utilizaría para insertar el gen recombinante cuya proteína se desea expresar. Para ello se siguen métodos convencionales en biotecnología.

- 5 4. Una vez el gen ha sido insertado, se ha de digerir con la enzima de restricción de tipo IIS cuyos puntos de reconocimiento lleva el cassette. El producto de la digestión se religa con ligasa del fago T4 y se transforma en la célula huésped. El resultado es que tras esta última digestión con enzimas de restricción del tipo IIS se eliminan los nucleótidos que darían lugar a la
10 incorporación de aminoácidos adicionales en la proteína final. La proteína recombinante resultante será idéntica a la proteína nativa ya que no poseerá ningún aminoácido adicional.

El diseño del cassette es muy sencillo y las únicas consideraciones que han de
15 seguirse es que lleve dos puntos de reconocimiento de la enzima de tipo IIS a utilizar, orientados en sentido contrario, y cuyos puntos de corte coincidan con los lugares necesarios para que al religarse den lugar a que el triplete correspondiente al primer aminoácido a sintetizar sea ATG (correspondiente a la Metionina).

20

Este procedimiento se esquematiza en las figuras 2 y 3 para dos casos prácticos que se han desarrollado a modo de ejemplos de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Adaptador para la obtención de una proteína recombinante sin aminoácidos adicionales que consiste en una secuencia de ADN de doble cadena que
5 comprende:

- i) dos extremos compatibles con extremos de un vector generados por enzimas de restricción de tipo II (E II 1 y E II 2), y
- ii) dos sitios de reconocimiento de para una enzima de restricción de
10 tipo IIS (R IIS 1 y R IIS 2) orientados en distinto sentido,

en el siguiente orden 5' - E II 1 - R IIS 1 - R IIS 2 - E II 2 - 3'.

2. Procedimiento de obtención de un vector que comprende:
15

a) digerir con las enzimas de restricción II 1 y II 2 un vector de expresión que comprende:

- i) una secuencia que codifica para una etiqueta de purificación (Tag), y
- ii) tres sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de tipo II
20 (R II 1, R II 2 y R II 3),

en el siguiente orden 5' - R II 1 - R II 2 - R II 3 - Tag - 3'.

25

y

1. clonar el adaptador según la reivindicación 1 en el vector obtenido en el paso (a).
30

3. Procedimiento según la reivindicación 2, que además comprende:

- b) obtener una secuencia de ADN de doble cadena que comprende una secuencia que codifica para una proteína de interés (Sec) caracterizada porque presenta dos extremos compatibles con extremos generados por las enzimas de restricción II 2 y II 3 (E II 2 y E II 3) en el siguiente orden 5' - E II 2 - Sec - E II 3 - 3',
- c) digerir con las enzimas de restricción II 2 y II 3 el vector obtenido en el paso (b), y
- d) clonar la secuencia de ADN del paso (c) en el vector obtenido en el paso (d).
4. Procedimiento según la reivindicación 3, donde los pasos (a) y (b) se llevan a cabo después de los pasos (c) a (d).
5. Vector obtenible por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
6. Célula huésped que comprende un vector según la reivindicación 5.
7. Procedimiento para la obtención de un vector de expresión de una proteína recombinante sin aminoácidos adicionales, que comprende:
- a) digerir con la enzima de restricción IIS el vector según la reivindicación 5, y
- b) religar el vector del paso (a).
8. Vector obtenible por el procedimiento según la reivindicación 7.
9. Célula huésped que comprende un vector según la reivindicación 8.
10. Proteína de fusión expresada por la célula huésped según la reivindicación 9.

11. Procedimiento de obtención de una proteína recombinante sin aminoácidos adicionales, que comprende:

- a) purificar la proteína de fusión según la reivindicación 10, y
- 5 b) eliminar la etiqueta de purificación de la proteína de fusión del paso (a) mediante una proteasa.

12. Proteína recombinante sin aminoácidos adicionales obtenible por el procedimiento según la reivindicación 11.

10

13. Kit para llevar a cabo los procedimientos según cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 o 7 que comprende:

- a) el adaptador según la reivindicación 1, y
- 15 b) un vector de expresión que comprende:
 - i) una secuencia que codifica para una etiqueta de purificación (Tag), y
 - ii) tres sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de tipo II (R II 1, R II 2 y R II 3),

20

en el siguiente orden 5' - R II 1 - R II 2 - R II 3 - Tag - 3'.

14. Kit para llevar a cabo los procedimientos según cualquiera de las reivindicaciones 11 que comprende:

25

- a) el vector según cualquiera de las reivindicaciones 5 u 8, y
- b) una proteasa.

30

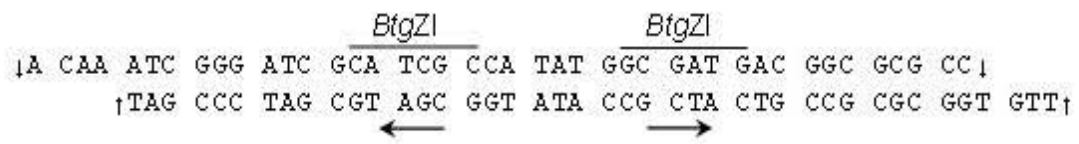
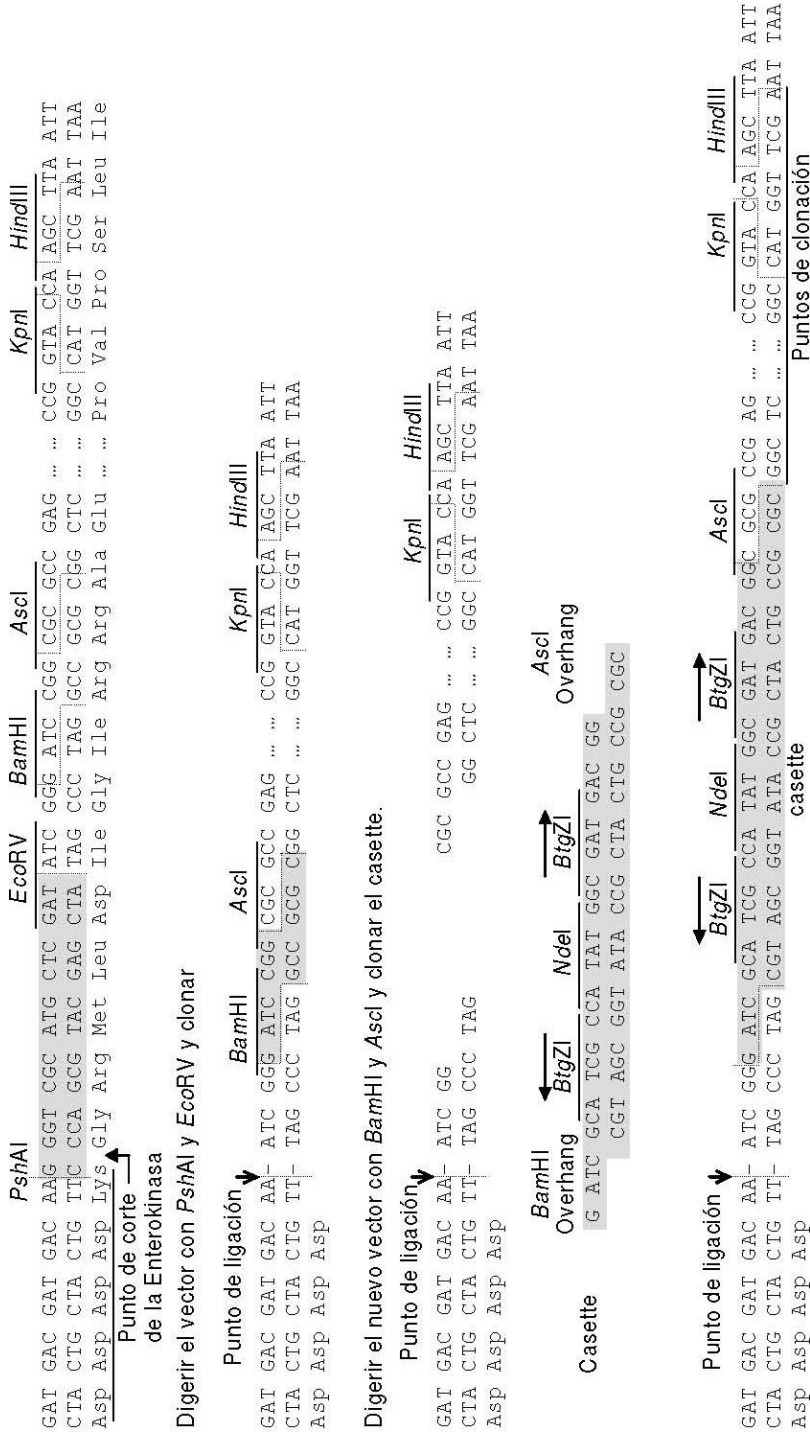
FIG.1

FIG.2A

pALEX2a. Biomedal. Construcción del vector modificado que incorpora el cassette



El vector está listo para insertar el gen de interés.

FIG.2B

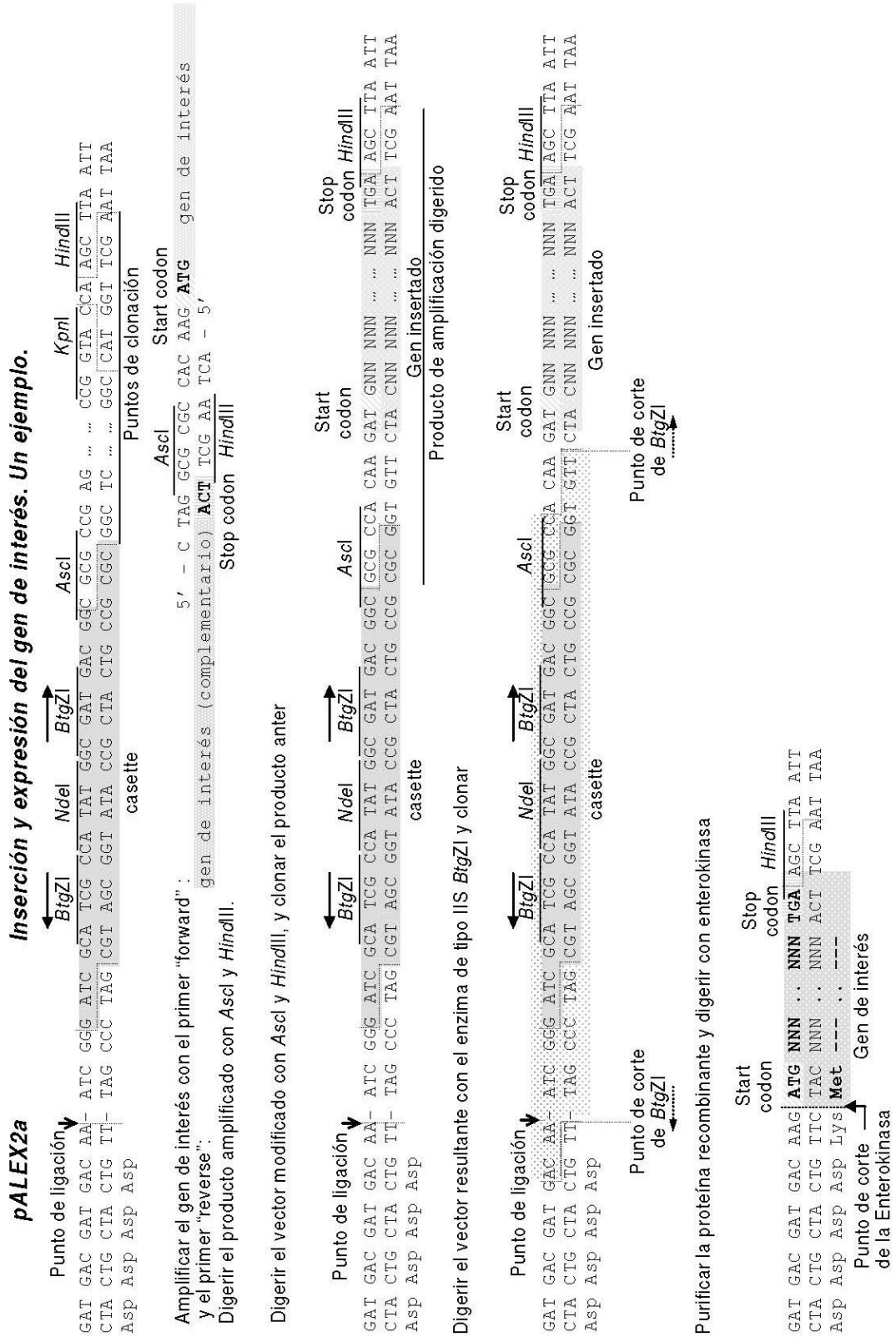
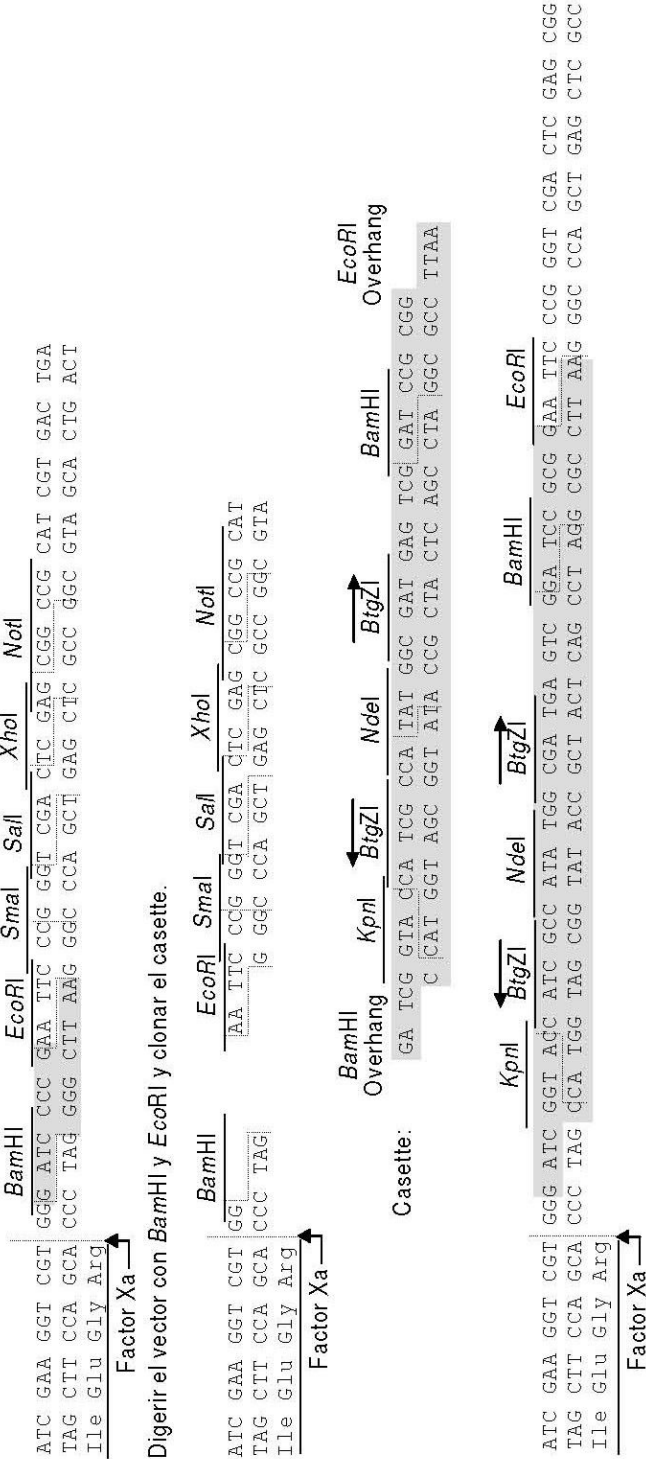


FIG.3A

pGEX-5X-1. GE Healthcare. Construcción del vector modificado que incorpora el cassette



El vector está listo para insertar el gene de interés.

RESUMEN

Procedimiento para la obtención de un vector de expresión de una proteína recombinante sin aminoácidos adicionales.

5

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. Específicamente, se refiere a un procedimiento para la obtención de una proteína recombinante sin aminoácidos adicionales, a un adaptador empleado para la realización de dicho procedimiento, así como a los vectores obtenidos mediante dicho procedimiento, a las células huésped que comprenden estos vectores y a la proteína recombinante de la expresión de dichas células. Finalmente, la invención se refiere a un kit para llevar a cabo el procedimiento de la invención.

10