

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 888**

51 Int. Cl.:
C12N 9/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07012583 .6**
96 Fecha de presentación: **27.06.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2009099**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.12.2008**

54 Título: **MODULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE RETROVIRUS POR APOBEC4.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.12.2011

73 Titular/es:
**Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten
durch den Präsidenten des Paul-Ehrlich-Instituts
Prof. Dr. Johannes Löwer
Paul-Ehrlich-Strasse 51-59
63225 Langen, DE**

72 Inventor/es:
**Perkovic, Mario;
Münk, Carsten;
Cichutek, Klaus y
Marino, Daniela**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 370 888 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

Modulación de la producción de retrovirus por APOBEC4

Campo Técnico

5 La invención se refiere a la modulación de la liberación de retrovirus o partículas virales de los mismos desde células por APOBEC4 humana o una APOBEC4 humana modificada y a diversos usos de los mismos.

Técnica Antecedente

10 La familia del polipéptido catalítico de tipo 4 de la enzima de edición del ARNm de la apolipoproteína B (APOBEC4) es un miembro de la superfamilia AID/APOBEC específica de vertebrados de citidina desaminasas de edición de ARN/ADN (ROGOZIN, IB, y col. APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. Cell Cycle. 2005, vol.4, nº 9, pág. 1281-5). La superfamilia de proteínas AID/APOBEC contiene cinco subfamilias (AID, APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3 y APOBEC4) e incluye varios miembros con la capacidad de desaminar citosina para dar uracilo en polinucleótidos monocatenarios, mientras que cumplen diversas funciones fisiológicas (CONTICELLO, SG, y col. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. Mol Biol Evol. 2005, vol.22, no.367, p.77), entre 15 las que se encuentra la inhibición de retrovirus por mecanismos dependientes e independientes de edición de ácidos nucleicos (HOLMES, RK, y col. APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? Trends Biochem Sci. 2005, vol.32, no.3, p.118-128). Se ha descrito un procedimiento para inactivar enzimas APOBEC por medio del virus espumoso Bet (documento WO 2005/117947), y el documento WO 2006/065377 desvela un procedimiento para la identificación de agentes que reducen el nivel de APOBEC3C activo en una célula.

20 En mamíferos, la expresión de APOBEC4 está regulada positivamente en testículos, lo que sugiere la posibilidad de que sea una enzima de edición para ARNm implicados en la espermatogénesis. Sin embargo, aún se desconoce la función o funciones fisiológicas exactas de APOBEC4. La secuencia de ácido nucleico y de aminoácidos de APOBEC4 se conoce y está disponible para diversas especies, entre otras, ser humano (número de acceso del GenBank NM_203454, GI 44888831), ratón (número de acceso del GenBank NC_000067, GI 38073497), o rata 25 (número de acceso del GenBank NM_001017492, GI 62945336). APOBEC4 es una proteína de aproximadamente 370 aminoácidos y 41000 Da (APOBEC4 humana: 367 aminoácidos; 41581 Da) y comprende un dominio de dedo de cinc y, en la mayoría de las especies, una cola de polilisina C terminal.

Divulgación de la Invención

30 La invención se refiere a la materia objeto definida en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se basa en el descubrimiento de que la expresión de la proteína APOBEC4 o una proteína APOBEC4 modificada en una célula que produce un retrovirus conduce a una mayor o menor producción de retrovirus o partículas virales a partir de dicha célula. Específicamente, la estabilización de la proteína por modificación del extremo N, entre otras cosas, mediante adición de una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, el marcador V5, el marcador c-myc o el marcador HA, conduce a una mayor producción de retrovirus o partículas virales desde dicha célula. La modificación del 35 extremo C, entre otras cosas, mediante la adición de al menos un marcador V5, marcador c-myc o marcador HA conduce a una menor producción de retrovirus o partículas virales desde dicha célula. También se desvela que la cola de polilisina C terminal de APOBEC4 puede modificarse por delección o modificación por mutación.

40 Un primer aspecto de la invención es una proteína APOBEC4 humana modificada caracterizada porque el extremo N está modificado para estabilizar la proteína APOBEC4 o está modificado el extremo C. La modificación del extremo N comprende la adición de al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el marcador V5, el marcador c-myc y el marcador HA o una secuencia de aminoácidos homóloga a la misma. Dicha al menos una secuencia de aminoácidos puede ser HA o una secuencia al menos un 90% idéntica a la misma. La modificación del extremo C comprende la adición de al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el marcador V5, el marcador c-myc y el marcador HA o una secuencia de 45 aminoácidos homóloga a la misma. Más preferentemente, dicha al menos una secuencia de aminoácidos es HA, 3 HA o una secuencia al menos un 90% idéntica a la misma.

50 Un aspecto adicional de la invención es una célula que expresa la proteína APOBEC4 modificada en el extremo C o N de la presente invención. Preferentemente, la célula produce además un retrovirus. Más preferentemente, el retrovirus o lentivirus se selecciona del grupo que consiste en VIH, VIH-1, VIH-2, VIS, VISagm, VISmac, VIF, VAIE, espumavirus (virus espumoso) y VLM. Incluso más preferentemente, dicho retrovirus o lentivirus es un virus deficiente en la replicación. En una realización preferida adicional, la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula humana, una célula HeLa, una célula 293T, una célula madre, un linfocito T auxiliar, un macrófago o progenitores o líneas celulares de los mismos.

55 Otro aspecto de la presente invención es un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína APOBEC4 modificada de la presente invención o el complemento de la misma. En una realización preferida, el ácido nucleico comprende un ácido nucleico que codifica la proteína APOBEC4 de la presente invención o un complemento del mismo, unido operativamente a un promotor. En una realización más

preferida, el ácido nucleico es un vector para terapia génica. En una realización adicional más preferida, el promotor es el promotor de CMV.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de la secuencia de ácido nucleico o célula de la presente invención para la producción de un medicamento. En una realización preferida, el ácido nucleico es un vector para terapia génica y/o un ácido nucleico que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína APOBEC4 modificada de la presente invención unido operativamente a un promotor, preferentemente el promotor de CMV. En una realización preferida adicional, la célula expresa la proteína APOBEC4 modificada de la presente invención. En otra realización preferida, la célula expresa la proteína APOBEC4 modificada de la presente invención y además produce un retrovirus o partículas de virus del mismo, preferentemente un retrovirus deficiente en la replicación, más preferentemente un virus deficiente en la replicación seleccionado del grupo que consiste en VIH, VIS, VLM, VIF, VAIE, VIH-1, VIH-2, VISagm, VISmac, espumavirus o partículas de virus de los mismos. En un aspecto adicional, el medicamento se dirige al tratamiento o vacunación contra VIH, VIS, VLM, VIF, VAIE, VIH-1, VIH-2, espumavirus, VISagm y VISmac.

Otro aspecto de la invención es el uso de una partícula viral de la invención para la preparación de un medicamento, preferentemente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de infecciones virales. En una realización preferida, las partículas virales comprenden una proteína APOBEC4 modificada en el extremo C de la invención, preferentemente la proteína APOBEC4-HA o APOBEC4-3xHA. En otra realización preferida, las partículas virales se basan en un virus seleccionado del grupo que consiste en VIH, VIS, VLM, VIF, VAIE, VIH-1, VIH-2, VISagm, VISmac, espumavirus, preferentemente VIH-1. En una realización preferida adicional, las partículas virales son partículas virales pseudotipificadas. En otra realización de la presente invención, la partícula viral codifica ARNhc/ip que se dirige a la APOBEC4 endógena y codifica adicionalmente una APOBEC4 terapéutica de codones optimizados, por ejemplo, APOBEC-3xHA o APOBEC-HA, que no se ve afectada por las moléculas de ARNhc/ip.

Otro aspecto de la presente invención es una vacuna que comprende la célula de la presente invención y un vehículo farmacéutico aceptable. En una realización preferida, la célula expresa la proteína APOBEC4 modificada de la presente invención, estando la proteína APOBEC4 modificada en el extremo N para estabilizar la proteína APOBEC4 y produciendo además un retrovirus o partículas de virus del mismo, preferentemente un retrovirus o lentivirus deficiente en la replicación. En una realización preferida adicional, la célula es una célula madre o una célula autóloga, una célula T auxiliar o un macrófago.

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para reducir la producción de retrovirus o partículas virales de los mismos en una célula que produce un retrovirus o partículas virales del mismo, comprendiendo el procedimiento a expresar una proteína APOBEC4 modificada de la presente invención en dicha célula, en el que el extremo C de la proteína APOBEC4 está modificado para reducir o inhibir la unión a la cola de polilisina C terminal de APOBEC4. En una realización preferida, la producción de retrovirus o partículas virales de los mismos se reduce al menos en un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99%.

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para producir partículas retrovirales, comprendiendo el procedimiento cultivar una célula de acuerdo con la presente invención, en el que la célula produce un retrovirus deficiente en la replicación o partículas virales de un retrovirus y además expresa una proteína APOBEC4 modificada de la presente invención, en el que el extremo N de la proteína APOBEC4 se modifica para estabilizar la proteína APOBEC4. En una realización preferida, el extremo N de la proteína APOBEC4 se modifica por adición de un marcador HA. En una realización preferida adicional, la célula es una célula 293T o una célula HeLa cotransfectada con una construcción de fusión HA-APOBEC4 y un plásmido de expresión de VIH-1.

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para seleccionar compuestos antivirales, comprendiendo el procedimiento las etapas de poner en contacto una célula que expresa una proteína APOBEC4 humana con un compuesto de ensayo, y determinar si el compuesto de ensayo afecta a la transcripción y/o expresión de APOBEC4 en dicha célula. En una realización preferida, la transcripción y/o expresión de APOBEC4 de una primera célula en presencia del compuesto de ensayo se compara con la transcripción y/o expresión de APOBEC4 de una segunda célula que no ha estado en contacto con el compuesto de ensayo, indicando una reducción en la transcripción y/o expresión de APOBEC4 de la primera célula que el compuesto de ensayo es un compuesto antiviral potencial.

En una realización preferida, se usan células HeLa o 293T en el procedimiento de selección. En otra realización preferida, la cantidad de transcrito de APOBEC4 y/o proteína APOBEC4 se determina por RT-PCR, transferencia de Northern y transferencia de western, respectivamente.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para seleccionar compuestos antivirales, comprendiendo el procedimiento las etapas de poner en contacto una célula que expresa un retrovirus y APOBEC4 humana con un compuesto de ensayo y determinar el título del retrovirus en presencia y ausencia del compuesto de ensayo, en el que una reducción en el título indica que el compuesto candidato interfiere con el montaje del retrovirus por interacción con la proteína APOBEC4 y, por lo tanto, es un posible fármaco antirretroviral.

También se desvelan moléculas – y agentes farmacéuticos basados en dichas moléculas – dirigidas y que interfieren con el ARNm de APOBEC4. Preferentemente, dichas moléculas son moléculas de ARNip o ARNhc dirigidas contra

el ARNm de APOBEC4. Preferentemente, dichas moléculas se usan para la fabricación de un medicamento. Incluso más preferentemente, dichas moléculas se usan para la preparación de un medicamento para el tratamiento de infecciones virales.

5 En las reivindicaciones y descripción detallada de la invención se describen otras realizaciones de la presente invención.

Breve Descripción de las Figuras en los Dibujos

La Figura 1 es una vista general estructural esquemática de la proteína APOBEC4 humana y las consecuencias de la modificación del extremo C, demostrada de forma ejemplar por un marcador HA.

10 La Figura 2 representa los mapas de vectores de plásmidos phA4-3xHA (Fig. 2A), phHA-A4cDNA3.1Zeo(+) (Fig 2B) y phA4cDNA3.1Zeo(+) (Fig. 2C), respectivamente.

La Figura 3 muestra los resultados de la transferencia de western de células 293T cotransfectadas con NL4-3 de VIH-1 y un plásmido de expresión que codifica una APOBEC4 no modificada, HA-APOBEC4 y APOBEC4-3xHA, respectivamente.

15 La Figura 4 muestra los resultados de la transferencia de western de células T293 cotransfectadas con un plásmido de expresión que codifica el virus indicador VIH-1 NL-luc R-E- y el plásmido de expresión que codifica la APOBEC4 no modificada, HA-APOBEC4 y APOBEC4-3xHA, respectivamente.

La Figura 5 muestra los resultados de los ensayos del virus indicador, en los que se muestra la cotransfección de las células con el virus indicador VIH-1 NL-luc R-E y el plásmido de expresión que codifica la APOBEC4 no modificada, HA-APOBEC4 y APOBEC4-3HA.

Descripción Detallada

Definiciones

25 “**APOBEC4**”, como se usa en la presente invención, se refiere a la proteína del polipéptido catalítico de tipo 4 de la enzima de edición del ARNm de la apolipoproteína B o al gen que codifica dicha proteína. Las proteínas APOBEC4 modificadas de la presente invención que contienen secuencias de aminoácidos adicionales, por ejemplo, un marcador tal como el marcador HA, se denominan HA-APOBEC4 si el marcador está unido al extremo N de la proteína APOBEC4 y APOBEC4-HA si el marcador está unido al extremo C de la proteína APOBEC4. De esta manera, V5-APOBEC4 y APOBEC4-V5 designan una proteína de fusión, en la que el marcador V5 está fusionado al extremo N y C de la proteína APOBEC4, respectivamente. Como ejemplo adicional, APOBEC4-3xHA designa una proteína de fusión de APOBEC4 y tres marcadores HA fusionados secuencialmente al extremo C de APOBEC4. Los ácidos nucleicos o plásmidos se designan de la misma manera.

30 Los “**virus**” de la presente invención incluyen todos los retrovirus, preferentemente lentivirus, más preferentemente VIH, VIS, VIF, VAIE, VLM, espumavirus, incluso más preferentemente VIH-1, VIH-2, VISagm, VISmac, y aún más preferentemente VIH-1. Además, la presente invención incluye virus mutados y/o truncados derivados de los retrovirus anteriores. Una subserie de dichos retrovirus mutados/truncados son las denominadas “**partículas de vector**” o “**partículas virales**”, que se refieren a retrovirus deficientes en la replicación. De esta manera, las partículas de vector retroviral de la presente invención son vectores retrovirales que pueden contener un ARN que, tras la infección de una célula huésped o diana, se transcribe de forma inversa y se inserta en el genoma de dicha célula. Este ARN puede contener un gen heterólogo, por ejemplo, el gen indicador de luciferasa de *Photinus pyralis* como en el virus indicador NL-luc R-E- descrito más adelante. Sin embargo, estas partículas de vector sólo contienen un genoma incompleto del lentivirus del que proceden. En general, la molécula de ARN de la partícula del vector no comprende la información genética de los propios genes *gag*, *env* y/o *pol*, lo cual es un requisito mínimo conocido para la replicación satisfactoria de un retrovirus. Como resultado, las partículas de vector son deficientes en la replicación, es decir, no pueden transducir una célula huésped o diana con la información genética requerida para su propia replicación.

45 De esta manera, una partícula de vector comprende un mínimo de las proteínas Gag, Pol y Env y una molécula de ARN (que puede ser un vector de expresión). La molécula de ARN procede del genoma del retrovirus, pero no comprende al menos uno de los genes *gag*, *env* o *pol* por sí mismos. Sin embargo, para producir una partícula de vector segura y eficaz, en general están ausentes dichos tres genes, así como cualquier otro gen no esencial. En el caso de VIH-1, dichos genes innecesarios del genoma de VIH-1 que pueden deleccionarse de la molécula de ARN incluyen *tat*, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*.

55 La molécula de ARN también puede comprender todos los elementos, por ejemplo, el elemento psi y RTL del genoma retroviral que se requieren para un empaquetamiento eficaz del ARN en las partículas de vector resultantes. En el caso de un vector de expresión, la molécula de ARN preferentemente comprende un gen adicional (normalmente heterólogo) que está bajo el control de un promotor adecuado, por ejemplo, el promotor de CMV, y por lo tanto se expresa tras la integración del gen en el genoma de la célula huésped o diana.

Por lo tanto, un ejemplo de una molécula de ARN que puede usarse para generar una partícula de vector retroviral se basa en el genoma de VIH-1 y comprende las RTL, el elemento psi y el promotor de CMV seguido del gen a trasducir, por ejemplo, un gen indicador tal como el gen de una proteína GFP o el gen indicador de luciferasa de *Photinus pyralis*. Tras la expresión de dichos genes indicadores, los títulos o la cantidad de las partículas de vector generadas pueden determinarse convenientemente por ensayos convencionales. Los genes *gag*, *env*, *pol*, *tat*, *vif*, *vpr*, *vpu* y/o *nef* de VIH-1 se retiran o se impide la expresión de sus productos génicos, por ejemplo, por una o más mutaciones de cambio de fase.

Otro ejemplo de un gen heterólogo comprendido por la molécula de ARN es el gen que codifica la proteína APOBEC4 (modificada) de la presente invención. De esta manera, la presente invención proporciona partículas de vector que se basan y presentan el tropismo de un retrovirus específico, por ejemplo VIH-1, y para las que se busca tratamiento, y comprende además un gen que codifica una proteína APOBEC4 modificada de la presente invención que reduce la producción del retrovirus. Dichas partículas de vector transfectarán las mismas células, posiblemente infectadas por VIH-1, y posteriormente reducirán la producción de VIH-1 por dichas células.

Los requisitos mínimos de un vector de lentivirus basado en VIH-1 se han descrito por KIM, VN, y col. Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. J Virol. 1998, vol.72, no.1, p.811-6.

La molécula de ARN descrita anteriormente junto con las proteínas *gag*, *pol* y *env*, que pueden proporcionarse en *trans* por la línea celular de empaquetamiento, después se ensamblan en las partículas de vector o partículas vectoriales, que podrán infectar eficazmente a su célula diana o huésped, transcribir de forma inversa la molécula de ARN que puede comprender un gen heterólogo bajo el control de un promotor, por ejemplo el promotor de CMV, e integrar dicha información genética en el genoma de las células diana/huésped. Sin embargo, como la información genética de las proteínas *gag*, *pol* y/o *env* no está presente en la molécula de ARN transducida, las partículas del vector o partículas vectoriales serán deficientes en la replicación, es decir, no se producirá en la célula transducida ninguna nueva generación de dichas partículas de vector.

El término “**estabilización**”, como se usa en la presente invención, se refiere a una inhibición o reducción de la degradación de proteínas o una inhibición o reducción del transporte de la proteína desde, por ejemplo, el citosol a otro compartimento celular o al exterior de la célula, conduciendo de esta manera a una mayor disponibilidad de la proteína dentro de la célula, por ejemplo, en el citosol. El experto en la materia conoce diversas formas para conseguir la estabilización de una proteína, entre otras, por modificación de la proteína mediante sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos. Una modificación preferida para conseguir la estabilización es la adición N-terminal de una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en el marcador V5, el marcador c-myc y el marcador HA o una secuencia de aminoácidos homóloga a la misma.

El experto en la materia podrá introducir fácilmente mutaciones tales como, por ejemplo, adiciones y deleciones, en una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos dada. Dichas metodologías conocidas se desvelan, por ejemplo, en Sambrook y col. (1989).

La invención incluye particularmente secuencias de ácido nucleico u homólogos de las mismas, o fragmentos únicos de las mismas. En la presente invención, la secuencia de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína resultante se considera homóloga a una segunda molécula de ácido nucleico si la secuencia de nucleótidos de la primera molécula de ácido nucleico es al menos aproximadamente un 70% idéntica, preferentemente al menos aproximadamente un 80% idéntica y más preferentemente al menos aproximadamente un 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a la secuencia de la segunda molécula de ácido nucleico. Como alternativa, la homología entre dos secuencias de ácido nucleico puede determinarse fácilmente usando el algoritmo conocido BLASTN (ALTSCHUL, SF, y col. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990, vol.215, nº 3, págs. 403-10) con parámetros por defecto. Como ejemplo adicional, otro ensayo conocido para averiguar la homología de dos secuencias de ácido nucleico es si hibridan en condiciones de hibridación normales, preferentemente en condiciones de hibridación rigurosas.

Usando las secuencias de ácido nucleico desveladas en el presente documento, el experto en la materia puede diseñar adicionalmente estructuras de ácido nucleico que tengan funciones deseadas particularmente en diversos tipos de aplicaciones. Por ejemplo, el experto en la materia puede construir oligonucleótidos o polinucleótidos para uso como cebadores en los procedimientos de amplificación de ácido nucleico, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), Reacción en Cadena de Reparación (RCR), PCR-ensayo de ligación de oligonucleótidos (PCR-OLA) y similares. También pueden construirse oligonucleótidos útiles como sondas en estudios de hibridación, tales como hibridación *in situ*. Se conocen numerosos procedimientos para marcar dichas sondas con radioisótopos, marcadores fluorescentes, enzimas y restos de unión (por ejemplo, biotina), por lo tanto, las sondas de la presente invención pueden adaptarse para la detectabilidad de una manera sencilla.

La proteína de la presente invención además incluye homólogos funcionales. Una proteína se considera un homólogo funcional de otra proteína para una función particular, si el homólogo tiene una función similar a la de la proteína original. El homólogo puede ser, por ejemplo, un fragmento de la proteína o un mutante de sustitución,

adición o delección de la proteína.

La determinación de si dos secuencias de aminoácidos son sustancialmente homólogas típicamente se basa en búsquedas FASTA de acuerdo con Pearson y col. PERASON, WR, y col. Improved tools for biological sequence comparison. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988, vol. 85, nº 8, págs. 2444-8. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una primera proteína se considera homóloga a la de una segunda proteína si la secuencia de aminoácidos de la primera proteína comparte al menos aproximadamente un 70% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente al menos aproximadamente un 80% de identidad y más preferentemente al menos aproximadamente un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 99,5%, aún más preferentemente al menos un 99% de identidad, con la secuencia de la segunda proteína.

5 El término “**seudotipificado**”, como se usa en la presente invención, se refiere a una partícula de vector que lleva glicoproteínas de la envuelta procedentes de otros virus que tienen envueltas. La serie de huéspedes de los retrovirus o lentivirus de la presente invención, por lo tanto, puede expandirse o alterarse dependiendo del tipo de receptor de la superficie celular usado por la glicoproteína.

15 Las proteínas *gag*, *pol* y *env* necesarias para ensamblar la partícula del vector se proporcionan en *trans* por medio de una línea celular de empaquetamiento, por ejemplo HEK-293T. Esto se consigue normalmente por transfección de la línea celular de empaquetamiento con uno o más plásmidos que contienen los genes *gag*, *pol* y *env*. Para la generación de vectores seudotipificados, el gen *env*, originalmente derivado del mismo retrovirus que los genes *gag* y *pol* y que la molécula de ARN o vector de expresión, se cambia por la proteína o proteínas de la envuelta de un virus de envuelta diferente. Como ejemplo, se usa la proteína G de VSV.

20 De esta manera, una partícula de vector seudotipificado ejemplar basada en el retrovirus VIH-1 comprende (1) las proteínas Gag y Pol de VIH-1, (2) una molécula de ARN derivada del genoma de VIH-1 que puede usarse para generar una partícula de vector retroviral basada en el genoma de VIH-1 que carece de los genes *gag*, *env*, *pol*, *tat*, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*, pero que comprende las RTL, el elemento psi y un promotor de CMV seguido del gen a transducir, por ejemplo, un gen para la proteína GFP, y (3) la proteína G de VSV. De esta manera, la partícula del vector seudotipificado resultante presentará el tropismo de VSV.

Otro ejemplo es el virus indicador NL-luc R-E- que procede de la variante NL4-3 de VIH-1 y se caracteriza por una delección de los genes *vpr*, *env* y *nef*. Además, NL-luc R-E- lleva el gen indicador de luciferasa de *Photinus pyralis* y está seudotipificado con la proteína VSV-G.

30 Una partícula de virus o vector “**derivada de**”, por ejemplo, VIH-1, como se usa en la presente invención, se refiere a una partícula de virus o vector en la que la información genética del ARN y/o las proteínas Gag y Pol comprendidas por la partícula de virus o vector proceden originalmente del virus original, en el caso anterior VIH-1. Como se ha descrito anteriormente, el genoma retroviral original puede comprender mutaciones tales como delecciones, mutaciones de cambio de fase e inserciones.

35 El término “**marcador**”, como se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia de aminoácidos corta que sirve como epítipo para la detección inmunológica de la proteína de interés. Los marcadores usados en la presente invención son HA, V5 y c-myc.

Taxonomía

40 Los virus de la familia taxonómica *Retroviridae* comparten, como característica de unificación, un genoma de ARNmc de cadena positiva (en el presente documento “ARN(+)*mc*”). Durante la infección, dicho ARN(+)*mc* no puede usarse directamente como molde (ARNm) y, por lo tanto, la información genética de este virus primero se transcribe de forma inversa desde ARN en ADN por una transcriptasa inversa proporcionada por el virus y posteriormente se integra en el genoma del huésped. De esta manera, el término “retro” se refiere a la actividad de la transcriptasa inversa y la transferencia de información genética desde el ARN al ADN. Actualmente se han identificado más de 570 virus individuales de la familia.

45 Una subfamilia de *Retroviridae* comprende los virus *Orthoretroviridae*, que incluyen los géneros de alfa-retrovirus, por ejemplo, con especies del virus de la leucosis aviar (VLA) los gamma-retrovirus, por ejemplo, con especies del virus de la leucemia murina (VLM) o el virus de la leucemia felina (VLF) o los delta-retrovirus, por ejemplo, con especies del virus de la leucemia bovina (VLB) o el virus linfotrópico T humano (VLTH).

50 Un género adicional de *Orthoretroviridae*, conocido como lentivirus, ha atraído recientemente mucho interés principalmente debido a un miembro bien conocido, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Sin embargo, el género de lentivirus comprende muchos otros virus. Además de las especies de VIH-1 o VIH-2, el virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB), el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) y el virus de la inmunodeficiencia de simio (VIS) son ejemplos de esfuerzos investigación frecuentes y extensos. Puede encontrarse una visión general de los retrovirus y lentivirus, respectivamente, por ejemplo en Vigna y col. y Palu y col. (VIGNA, E, y col. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. J Gene Med. 2000, vol.2, nº 5, págs. 308-16. PALU, G, y col. Progress with retroviral gene vectors. Rev Med Virol. 2000, vol.10, nº 3, págs. 185-202).

Características Estructurales y Genéticas de Genomas Retrovirales

Los genomas de retrovirus competentes para la replicación conocidos típicamente comprenden los cuatro dominios codificantes (*gag*, *pro*, *pol*, *env*), en los que *gag* codifica un polipéptido (en el presente documento "Gag") en el que los productos de escisión comprenden las proteínas estructurales principales del núcleo del virus incluyendo las de la matriz (MA), la cápsida (CA) y la nucleocápsida (NC). *Pro* codifica parte de la poliproteína (Gag-Pro o Gag-Pro-Pol) en la que los productos de escisión típicamente incluyen proteasa (PR) y ocasionalmente dUTPasa (DU). *Pol* codifica parte de la poliproteína (Gag-Pro-Pol), en la que los productos de escisión típicamente incluyen transcriptasa inversa (TR) e integrasa (IN) y, en algunos lentivirus, dUTPasa (DU). En los espumavirus, *pol* se expresa a través de un ARNm con cortes y empalmes como una poliproteína Pol-Pol. *Env* codifica una poliproteína (Env) cuya escisión produce SU (superficie) y TM (transmembrana) que constituyen las proteínas estructurales de la envuelta viral.

Además, los retrovirus típicamente contienen dos repeticiones terminales largas (RTL) y una región de varios cientos (~300-1800) pares de bases compuestas de U3-R-U5 (5 a 3) que están localizadas en los dos extremos del genoma no integrado e integrado (proviral). Además, generalmente está presente dentro del genoma retroviral un elemento psi. El elemento psi es una señal de actuación cis, localizada cerca del extremo 5' del genoma y designa una señal de empaquetamiento, que tiene importancia durante el ensamblaje del virus y conduce a la incorporación del ARN viral en el núcleo viral. Los retrovirus más complejos típicamente comprenden otros genes reguladores. En el caso de VIH-2, estos genes reguladores incluyen *ref*, *tat*, *vif*, *nef*, *vpr* y *vpx*.

Visión General de la Función de APOBEC4 en la Producción de Virus

APOBEC4 es una proteína eucariota y se expresa principalmente en testículos de mamífero, lo que sugiere que es una enzima de edición para ARNm implicados en la espermatogénesis. Como hipótesis de trabajo no limitante (véase la Figura 1a), durante la replicación viral se recluta un complejo que comprende APOBEC4 y al menos dos factores adicionales y aún desconocidos (factor X y factor Y) y se usan por la maquinaria de replicación del virus. Como se representa en la Figura 1a, APOBEC4 comprende un dominio de dedo de cinc (hpesmlfemngyldsaiynndsirhiilysnspncneanhcc, aa 93-134) y una cola de polilisina C terminal (kkkkkgkk, aa 360-367), en el que la cola de polilisina permite la unión del factor Y, mientras que el factor X supuestamente se une al dominio de dedo de cinc. Además, se supone un exceso dentro de la célula de los dos factores, X e Y, en comparación con APOBEC4 endógena.

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento experimental de que la expresión de la proteína APOBEC4 en una célula que produce un retrovirus conduce a una mayor o menor producción de retrovirus a partir de dicha célula. Además, este efecto proviral se correlaciona directamente con la cantidad de ADN plasmídico que codifica la proteína APOBEC4 usada para la cotransfección y, por lo tanto, con la proteína APOBEC4 expresada. Este efecto proviral de correlación de la expresión de APOBEC4 puede explicarse con una mayor formación del complejo APOBEC4 reclutado por el virus: como hay un exceso de factor X e Y, la cantidad de APOBEC4 complejada con factor X y factor Y sólo dependerá de la cantidad de APOBEC4 expresada por la célula (y, por lo tanto, depende de la cantidad de ADN plasmídico usado durante la transformación). Se consiguió un aumento en la producción de virus de hasta 10 veces usando HA-APOBEC4 en comparación con el control negativo (293T transfectadas sólo con provirus).

Las proteínas se degradan de forma constante y se resintetizan por la célula (un proceso conocido como renovación de proteínas) o se transportan o translocan a diversos compartimentos celulares, por ejemplo, desde el citosol a las mitocondrias. Por consiguiente, si se cambia la renovación de proteínas, es decir, se impide o se ralentiza la degradación de proteínas, o se inhibe o ralentiza el transporte de la proteína desde el citosol a otro compartimento celular, la proteína se acumulará en el citosol de la célula.

Sorprendentemente, los inventores descubrieron que la estabilización/modificación de la proteína APOBEC4 por modificación del extremo N, entre otras cosas, por adición de una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, el marcador V5, el marcador c-myc o el marcador HA, y la expresión de dicha proteína en una célula que produce un retrovirus o partículas virales del mismo, conduce a un aumento de la producción de retrovirus o partículas virales por dicha célula en comparación con la expresión de APOBEC4 no modificada dentro de esa célula. La cantidad de virus que se detectaron por ensayos de transcriptasa inversa o transferencia de western aproximadamente en los 2 días posteriores a la cotransfección en el sobrenadante de las células mostró un aumento de 5-10 veces.

Otro aspecto de la presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que la modificación del extremo C de la proteína APOBEC4, entre otras cosas, por adición de al menos un marcador V5, marcador c-myc o marcador HA, y la posterior expresión de dicha proteína APOBEC4 modificada conduce a una producción reducida drásticamente (hasta un 95% o más) de retrovirus o partículas virales del mismo por dicha célula. Además, este efecto antiviral-viral se correlaciona directamente con la cantidad de ADN plasmídico que codifica la proteína APOBEC4 modificada usada para la cotransfección y, por lo tanto, con la proteína APOBEC4 modificada expresada por la célula. Este efecto antiviral de correlación de la presente invención puede explicarse por la competición de la APOBEC4 modificada expresada con la APOBEC4 endógena por el factor X. La proteína APOBEC4 modificada en el extremo C se unirá al factor X, pero no podrá unirse al factor Y para formar una APOBEC4 funcional complejada

con factor X y factor Y que se necesita por el virus para la replicación. Por consiguiente, como la APOBEC4 modificada compite por el factor X, estará disponible menos de dicho factor X para la APOBEC4 endógena y, por lo tanto, se formará menos complejo de APOBEC4 funcional, conduciendo a la reducción observada de la producción de virus por la célula, es decir, el efecto antiviral.

5 Proteínas APOBEC4 y Construcciones

Se desvela que existen proteínas APOBEC4 de diversas especies, mamíferos y seres humanos. La presente invención hace uso de APOBEC4 humana. Las proteínas APOBEC4 preferidas incluidas por la invención son proteínas APOBEC4 modificadas de acuerdo con las enseñanzas desveladas en la presente memoria.

10 En general, la presente invención incluye proteínas APOBEC4 modificadas que están estabilizadas, preferentemente, por modificación de, por ejemplo, el extremo N, entre otras cosas, por adición de una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, el marcador V5, el marcador c-myc o, preferentemente, el marcador HA. Además, también se mencionan explícitamente como secuencias de aminoácidos que pueden usarse para modificar la proteína APOBEC4 de acuerdo con la presente invención secuencias de aminoácidos que son homólogas al
 15 marcador V5, el marcador c-myc o, preferentemente, el marcador HA, preferentemente al menos un 90% idénticas a las mismas. Además, se desvelan proteínas APOBEC4 que están modificadas para inhibir o reducir la unión de al menos un factor necesario para formar el complejo de APOBEC4 que se recluta durante la replicación viral. El experto en la materia conoce una multitud de medios para modificar una proteína para inhibir o reducir la unión de factores a la misma. Las proteínas APOBEC4 preferidas de la invención incluyen proteínas APOBEC4 modificadas en el extremo C por la adición de al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el
 20 marcador V5, el marcador c-myc y el marcador HA o una secuencia de aminoácidos homóloga a los mismos. Además, también se mencionan explícitamente como secuencias de aminoácidos que pueden usarse para modificar la proteína APOBEC4 de acuerdo con la presente invención, secuencias de aminoácidos que son homólogas al marcador V5, al marcador c-myc o, preferentemente, al marcador HA, preferentemente al menos un 90% idénticas a los mismos. También se desvelan proteínas APOBEC4 que están mutadas dentro del dominio de dedo de cinc,
 25 preferentemente por sustituciones de aminoácidos E95A, C127A y C134A. Las proteínas APOBEC4 modificadas más preferidas de la presente invención son HA-APOBEC4, APOBEC4-HA, APOBEC-3xHA. También se desvela APOBEC4 completa que carece de la cola de polilisina.

30 También se incluyen ácidos nucleicos que codifican las proteínas APOBEC4 de la presente invención, por ejemplo plásmidos construidos para la expresión de dichas proteínas. Además, también se incluyen todas las proteínas y ácidos nucleicos homólogos a la proteína APOBEC4 o a los ácidos nucleicos de la presente invención. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de la proteína homóloga o la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico homólogo es al menos un 90%, 95%, 97%, 99% o 99,5% idéntica a las proteínas APOBEC4 o los ácidos nucleicos de la presente invención.

35 Dada la hipótesis de trabajo indicada anteriormente, evidentemente el experto en la materia puede obtener una multitud de proteínas APOBEC4 modificadas adicionales y homólogos funcionales de las mismas. También se desvela KRR1 (número de acceso del GeneBank NP_008974), la proteína 2 de unión a rev de VIH-1 humano que comprende de forma similar una cola de polilisina. De esta manera, también se desvela KRR1-HA, HA-KRR1, KRR1-3xHA y KRR1 con una cola de polilisina truncada o mutada. Además, se desvela que la cola de polilisina de la propia APOBEC4, en forma no modificada o que comprende sustituciones de aminoácidos, puede competir por al
 40 menos uno de los factores necesarios para formar un complejo de APOBEC4 funcional reclutado durante la reproducción viral.

Células

Aunque la presente invención se ha descrito de forma ejemplar y estudiado en células 293T y células HeLa, se contempla que pueden usarse otras células de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.
 45 Preferentemente, las células usadas de acuerdo con la presente invención son células humanas, macrófagos, linfocitos T, células madre, células antólogas, así como células progenitoras o líneas celulares de las mismas. Más preferentemente, las células son células 293T o células HeLa.

Usos Médicos y Composiciones Farmacéuticas

50 Las construcciones de la presente invención pueden usarse directamente en una diversidad de aplicaciones médicas o para la fabricación de medicamentos.

En un aspecto de la invención, las proteínas APOBEC4 estabilizadas/modificadas en el extremo N de la invención pueden expresarse en una célula que produce un retrovirus o partículas virales del mismo y usarse para aumentar la producción de retrovirus o partículas virales por dicha célula. Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para aumentar la producción de retrovirus, entre otros, VIH, VIS, VIF, VAIE, VLM, VIH-1, VIH-2,
 55 VISagm, VISmac, espumavirus o partículas virales de los mismos en una célula que posteriormente puede aislarse y usarse para la vacunación contra dicha retrovirus.

En otra realización, la presente invención puede usarse para terapia génica, entre otras cosa, para tratar, inhibir o

- reducir la producción de un retrovirus en un mamífero. En una realización, los virus o partículas virales de la presente invención, o preparaciones farmacéuticas de los mismos, pueden administrarse a un mamífero, preferentemente un ser humano o un caballo. Si los virus o partículas virales presentan el mismo tropismo que el retrovirus que se va a tratar, entonces se producirá la infección selectiva de las células del mamífero que son células diana del retrovirus a tratar por los virus o partículas virales de la presente invención. Tras la entrada en la célula, los virus o partículas virales de la invención expresan la proteína APOBEC4 modificada en el extremo C, lo cual posteriormente conduce a una reducción en la producción viral a partir de dicha célula. Como ejemplo, si se va a tratar VIH-1, al mamífero se le administran virus derivados de VIH-1 y que comprenden la información genética de una proteína APOBEC4 modificada en el extremo C, preferentemente APOBEC4-3xHA. Cuando los virus administrados proceden de VIH-1, presentan el mismo tropismo que un virus VIH-1 y, por consiguiente, infectarán a los mismos tipos celulares, por ejemplo, linfocitos T. Las células infectadas ahora expresarán la proteína APOBEC4 modificada en el extremo C, lo cual reducirá la producción de VIH-1. Es evidente para el experto en la materia que de esta manera pueden tratarse infecciones con cualquier otro retrovirus, incluyendo VIH, VIS, VIF, VAIE, VLM, VIH-1, VIH-2, espumavirus, VISagm y VISmac.
- Se desvela que los virus o partículas virales de la presente invención que llevan la información genética de la proteína APOBEC4 modificada en el extremo C de acuerdo con la presente invención pueden usarse para transducir células diana retrovirales *ex vivo* y después se puede reintroducir estas células en el mamífero a tratar. En el caso del VIH, las células diana preferentemente son linfocitos T auxiliares y/o macrófagos o sus células progenitoras.
- Se desvela que la construcción de transferencia que puede transducirse al interior de las células diana del retrovirus por medio de los virus o partículas virales de la presente invención codifica ARNhc/ip que se dirige a la APOBEC4 endógena y codifica adicionalmente una APOBEC4 terapéutica de codones optimizados, por ejemplo, APOBEC-3xHA o APOBEC-HA, que no se ve afectada por las moléculas de ARNhc/ip. La construcción de transferencia codifica un anticuerpo que se dirige a la APOBEC4 endógena y puede codificar o no una proteína APOBEC4 terapéutica modificada, que no se ve afectada por los anticuerpos.
- Pueden formularse composiciones farmacéuticas basadas en las construcciones de la presente invención de cualquier manera convencional usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. De esta manera, los virus o partículas virales, ácidos nucleicos, proteína y compuestos que inhiben la transcripción y/o expresión de APOBEC4 o el funcionamiento apropiado de APOBEC4 de la presente invención pueden formularse por administración, por ejemplo, por inyección, inhalación o aislamiento (a través de la boca o la nariz) o por administración oral, bucal, parenteral o rectal.
- Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse para una diversidad de modos de administración, incluyendo la administración sistémica, tópica o localizada. Pueden encontrarse técnicas y formulaciones, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, Pa. Para la administración sistémica, se prefiere la inyección, incluyendo la inyección intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Para la inyección, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse en soluciones líquidas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank o solución de Ringer. Además, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma sólida y redisolverse o suspenderse inmediatamente antes del uso. También son adecuadas formas liofilizadas de la composición farmacéutica.
- Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato ácido cálcico); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón glicolato sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico). Los comprimidos también pueden revestirse por procedimientos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para reconstituirse con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, agentes saporíferos, colorantes y edulcorantes cuando sea apropiado.
- Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o recipientes multidosis, con un conservante añadido opcionalmente. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse adicionalmente como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener otros agentes que incluyen agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Además, las composiciones farmacéuticas pueden formularse también como una preparación de depósito. Estas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. De esta manera, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble. Otros sistemas de liberación adecuados incluyen microesferas, que ofrecen la posibilidad de una liberación local no invasiva de fármacos durante un periodo de tiempo prolongado. Esta tecnología puede incluir microesferas que tienen un tamaño precapilar, que pueden inyectarse a través de un catéter coronario en cualquier parte seleccionada de un órgano sin producir inflamación o isquemia. El agente terapéutico administrado después se libera lentamente desde las microesferas y se absorbe por las células circundantes presentes en el tejido seleccionado.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a atravesar. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la técnica e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, sales biliares y derivados de ácido fusídico. Además, pueden usarse detergentes para facilitar la infiltración. La administración transmucosa puede realizarse usando pulverizaciones nasales o supositorios.

Ensayos de Selección de Compuestos Antivirales

El papel clave que juega APOBEC4 en la reproducción retroviral hace que sea una diana importante para los fármacos antirretrovirales. De esta manera, APOBEC4 puede usarse en un ensayo para seleccionar compuestos que inhiban la transcripción y/o expresión de APOBEC4, y/o la función de APOBEC4 en la reproducción retroviral.

Como se descubrió que APOBEC4 endógena se expresa en, entre otras, células 293T o células HeLa, dichas células podrían usarse en un ensayo de alto rendimiento para seleccionar compuestos que inhiban la transcripción y/o expresión de APOBEC4. Es evidente para el experto en la materia que también podrían usarse en dicho ensayo células o líneas celulares que expresen APOBEC4 endógena.

En una realización de la invención, el procedimiento para seleccionar compuestos antivirales comprende las etapas de poner en contacto una célula que expresa una proteína APOBEC4 humana con un compuesto de ensayo y determinar si el compuesto de ensayo afecta a la transcripción y/o expresión de APOBEC4 en dicha célula, en el que una reducción en la transcripción y/o expresión de APOBEC4 indica que el compuesto de ensayo es un compuesto antiviral. En una realización preferida, la transcripción y/o expresión de APOBEC4 de una primera célula en presencia del compuesto de ensayo se compara con la transcripción y/o expresión de APOBEC4 de una segunda célula que no ha estado en contacto con el compuesto de ensayo, en el que una reducción en la transcripción y/o expresión de APOBEC4 en la primera célula indica que el compuesto de ensayo es un posible compuesto antiviral. Preferentemente, las células usadas en el procedimiento de selección son células humanas, macrófagos, células T, células madre, células autólogas así como células progenitoras o líneas celulares de las mismas. Más preferentemente las células son células 293T o células HeLa. Preferentemente, la transcripción y/o expresión de APOBEC4 se determina por RT-PCR, transferencia de Northern y transferencia de Western, respectivamente.

En una realización adicional, la invención se refiere a un procedimiento de selección para seleccionar compuestos antivirales. Inicialmente pueden seleccionarse compuestos candidatos o diseñarse químicamente basándose en su unión predicha o determinada a la proteína APOBEC4. La unión predicha de un compuesto, por ejemplo, una proteína, a APOBEC4, puede calcularse usando algoritmos de acoplamiento conocidos por el experto en la materia que producen muchas estructuras posibles de un complejo proteína-proteína proteína-compuesto y, en la mayoría de los casos, alguno de ellos imitan la estructura correcta dentro de un valor de r.m.s.d. (desviación cuadrática media) de <3Å. Puede usarse el análisis de unión BIOCOR para medir la unión de un compuesto dado a APOBEC4. Después se infectan células 293T con un retrovirus y se determina el título del retrovirus en presencia y ausencia de uno o más de los compuestos candidatos seleccionados. Una reducción en el título indica que el compuesto candidato interfiere con el ensamblaje del retrovirus por interacción con la proteína APOBEC4 y, por lo tanto, es un posible fármaco antirretroviral.

Como ejemplo adicional, se usan moléculas de ARNip o ARNhc dirigidas contra el ARNm de APOBEC4 como compuestos de ensayo antirretrovirales. Es de esperar que el silenciamiento (knock-down) de APOBEC4 por dichas moléculas de ARNip o ARNhc reduzca en gran medida la liberación de virus por la célula infectada. Por lo tanto, pueden usarse moléculas de ARNip o ARNhc como fármacos antirretrovirales.

Ejemplos

Generación de Plásmidos

Para la expresión de APOBEC4 y APOBEC4 modificada se generaron plásmidos por PCR, partiendo del ADNc de APOBEC4 (número de acceso del GeneBank NM_203454) de células germinales humanas. La proteína APOBEC4 no modificada y la proteína de fusión de APOBEC4 modificada que comprendía una adición N-terminal de un marcador se expresaron a partir del plásmido pcDNA3.1/Zeo(+) (Invitrogen). La proteína de fusión de APOBEC4 modificada que comprendía una adición C-terminal de un marcador se expresó a partir del plásmido pMHC3xHA.

Para ilustrar con un ejemplo, se usaron los siguientes cebadores para la generación de pH4-3xHA (SEC ID N°: 1 y 2), un plásmido de expresión basado en el plásmido pMHC3xHA y que expresaba la proteína APOBEC4 humana modificada con tres marcadores HA fusionados al extremo C: cebador 5': cag gcg gta cca gcc tgg aga caa att gat gg (SEC ID N°: 7), cebador 3': gac ttg gat ccc ctt tct tcc ctt tct tct tct ttt cat ctg cct cct tgc tac (SEC ID N°: 8).

- 5 Para la generación del plásmido de expresión pH4-hA4_cDNA3.1Zeo(+) (SEC ID N°:3 y 4), basado en el plásmido pcDNA3.1/Zeo(+) y que expresa la proteína APOBEC4 modificada con un marcador HA fusionado al extremo N, se usaron los siguientes cebadores: cebador 5': cgg atc cct agc aat ggg ata tcc ata cga tgt tcc aga tta cgc tga gcc cat ata tga gga gta cc (SEC ID N°: 9), cebador 3': gaa ttc ttt att tct tcc ctt tct tct tct tc (SEC ID N°: 10).

- 10 Para la generación del plásmido de expresión pH4_cDNA3.1Zeo(+) (SEC ID N°: 5 y 6), de forma similar basado en el plásmido pcDNA3.1/Zeo(+) y que expresa la proteína APOBEC4 humana, se usaron los siguientes cebadores: cebador 5' cgg atc cct agc aat gga gcc cat ata tg (SEC ID N°: 11), cebador 3' gaa ttc ttt att tct tcc ctt tct tct tct tc (SEC ID N°: 12).

- 15 Los amplicones generados se clonaron en los vectores plasmídicos respectivos usando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. Las **Figuras 2A-C** muestran mapas plasmídicos de los tres vectores de expresión ilustrados en los ejemplos pH4-3xHA, pHAhA4_cDNA3.1Zeo(+) y pH4_cDNA3.1Zeo(+), respectivamente.

El experto en la materia sabrá cómo generar diferentes vectores de expresión que comprenden, entre otras cosas, diferentes marcadores, por ejemplo, el marcador V5 o c-myc, un número diferente de marcadores o cómo introducir un número diferente de marcadores o cómo introducir mutaciones en el gen APOBEC4 para, por ejemplo, truncar o delecionar completamente la cola de poli-lisina C-terminal, o insertar mutaciones al dominio de dedo de cinc.

20 Cultivo Celular

A continuación se ilustra un ejemplo de un cultivo celular de células 293T. Las enseñanzas de la presente invención, consideran e incluyen el uso de diferentes células.

- 25 Se cultivaron células 293T adherentes en DMEM (GIBCO/BRL). Para el pase de las células, las células se separaron usando una solución de EDTA 1 mM/PBS y se transfirieron a medio limpio (1:10) dos veces por semana. Las células se lavaron usando PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 4,3 mM, K H₂PO₄ 1,4 mM). Todos los medios de cultivo se complementaron con suero bovino fetal al 10% (FCS, Biochrom KG), L-glutamina 2 mM (Biochrom KG) y antibióticos (100 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomycin [Biochrom KG]). El FCS se incubó durante 30 minutos a 46 °C para la inactivación de los componentes del sistema de complemento. El cultivo de las células se realizó en un incubador de células (BBD 6220, Heraeus) a 37 °C y con CO₂ al 5%.

30 Transfección y Producción de Sobrenadante de Cultivo de Células Virales

Un día antes de la transfección, se sembraron 0,8 x 10⁶ células 293T por pocillo de la placa de cultivo celular. Para la transfección, se usó LipofectamineLTX (Invitrogen) en una relación 2:1 (µl de LipofectamineLTX : µg ADN plasmídico) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

- 35 Para la producción del sobrenadante de cultivo de células virales, las células se co-transfectaron con 1 µg ADN plasmídico de un genoma proviral, si era necesario 0,5 µg de vector de expresión pMD.G (que expresa la proteína VSV-G) y 0-3 µg del plásmido de APOBEC4 respectivo. Si era necesario, se añadía plásmido pcDNA3.1 para mantener la cantidad total de ADN añadida en 45 µg. La recogida del sobrenadante viral se realizó 48 después de la transfección. Los residuos celulares contenidos en los sobrenadantes se retiraron por filtración usando filtros con un tamaño de poro de 45 µm (Sartorius). El filtrado se almacenó a -80 °C.

40 Ensayo de Virus Indicador de Luciferasa

- Los virus indicadores permiten un análisis rápido y cuantitativo de las interacciones de los componentes celulares y virales así como de los factores antivirales. Para estudiar la influencia de APOBEC4 sobre la interacción virus-huésped, se empleó el virus indicador seudotipificado de VSV-G NC-luc R-E. NC-luc R-E procede de la variante de VIH-1 NL4-3 y se caracteriza por una delección de los genes *env* y *net*. Además, NL-luc R-E lleva el gen indicador de luciferasa de *Photinus pyralis*.

- 45 Se transfectaron células 293T con una cantidad igual de los diferentes plásmidos. 48 horas después de la transfección y la producción de virus/partículas virales con o sin la APOBEC4 (modificada) de la presente invención, se recogieron virus/partículas virales y se analizaron los lisados celulares (de aproximadamente 2 x 10⁴ células) con respecto a la expresión de luciferasa usando el Kit StadyLite HTS (Perkin Elmer) y de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Desnaturalizante (SDS-PAGE) y Transferencia de Western

Para la lisis celular se lavaron células 293T en 1 ml de PBS después de recoger los virus/partículas virales, se separaron usando PBS/EDTA, se sedimentaron (250 rpm, 5 min a TA) y se realizó la lisis durante una incubación de

5 minutos en hielo después de la adición de tampón de lisis RIPA (TRIS 25 mM, pH 8, NaCl 137 mM, glicerina al 1%, SDS al 0,1 %, Na-desoxicolato al 0,5% y NaPO₄ al 1 %). Después de una etapa de centrifugación de 10 minutos a 14.000 rpm y 4 °C, se realizó la concentración de la proteína del sobrenadante de acuerdo con Bradford: se añadieron 5 µl del sobrenadante a 1.000 µl de reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, USA) y se midió la absorción a 595 nm usando un espectrómetro (Gene Quant II, RNA/DNA-Calculator, Pharmacia Biotech).

Para la SDS-PAGE y transferencia de Western el lisado celular correspondiente a 30 µg de proteína total se cargó en geles con gradiente de NuPAGE (4-12%; Invitrogen) y se realizó una electroforesis de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La membrana de PVDF (Invitrogen) se incubó con solución de bloqueo (PBS, leche en polvo al 5%, Tween 20 al 0,5% [Roth]) durante 1 hora o durante una noche a 4 °C para prevenir una unión inespecífica del anticuerpo primario. Como anticuerpos primarios, se usaron anti-HA de ratón (1:5.000 en solución de bloqueo MMS-101 P, Covance), anti-αTubulina de ratón (1:10000, B5-1-2, Sigma) o antip24 de ratón (1:800, 183-H12-5C). El siguiente reactivo se obtuvo a través de NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: HIV-1 p24 Monoclonal Antibody (183-H12-5C) del Dr. Bruce Chesebro and Kathy Wehrly). Como anticuerpo secundario, se usó un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:7500 GE Healthcare). Antes y después de cada periodo de incubación, la membrana se lavó primero con solución de lavado 1 (PBS, Tween20 al 0,5%) dos veces y posteriormente se incubó en solución de lavado 2 (PBS, Tween20 al 0,1%) durante 25 minutos. Como sustrato se usó Lumigen PS-3 Acridan (ECL plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare), cuya conversión enzimática conduce a emisión de luz. La detección de la emisión de luz se realizó usando Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) en solución de desarrollo (Curix 60, Agfa).

20 Ejemplo 1: Modulación de la Producción de Virus VIH-1 NL4-3 por la Expresión de APOBEC4

A continuación se usan células 293T como tipo celular ejemplar y se usa VIH-1 como virus ejemplar.

Se co-transfectaron células 293T como se han descrito anteriormente con un vector de expresión que comprendía la secuencia de ácido nucleico proviral de la variante de VIH-1 NL4-3 y vectores de expresión que codifican la proteína APOBEC4 humana no modificada, así como proteínas APOBEC4 humanas modificadas HA-APOBEC4, APOBEC-HA and APOBEC4-3xHA, respectivamente. Posteriormente, se determinó la producción de virus en el sobrenadante viral (V) y lisados celulares (C), respectivamente, en un ensayo de transcriptasa inversa (RT-PCR; no mostrado) y transferencia de western. Específicamente, se evaluó la expresión del antígeno p24 de VIH, el marcador HA y la tubulina.

La Figura 3 muestra los resultados de la transferencia de western. La co-transfección de las células con VIH-1 NL4-3 y el plásmido de expresión que codifica la proteína APOBEC4 no modificada conducen a un aumento en la producción viral tanto en el sobrenadante viral (V) como en los lisados celulares (C) que está correlacionado de forma directa y lineal con la cantidad de plásmido de APOBEC4 usado durante la co-transfección (Fig. 3, panel central).

La co-transfección con el plásmido de expresión que codificaba la proteína HA-APOBEC4 conduce a un mayor aumento en la producción viral tanto en el sobrenadante viral como en los lisados celulares en comparación con la co-transfección con la proteína APOBEC4 no modificada. La producción viral que dio como resultado la co-transfección con el plásmido de expresión HA-APOBEC4 aumentó de 5 a 10 veces en comparación con la de la co-transfección con el plásmido de expresión APOBEC4. De forma similar, la cantidad de virus producidos se correlacionaba directa y linealmente con la cantidad de plásmido HA-APOBEC4 usado durante la co-transfección (Fig. 3, panel inferior).

La co-transfección con el plásmido de expresión que codificaba la proteína APOBEC4-3xHA condujo a una drástica reducción (hasta el 95%) en la producción viral tanto en el sobrenadante viral como los lisados celulares en comparación con la co-transfección con la proteína APOBEC4 no modificada. De forma similar, el grado de inhibición de la producción de virus se correlacionaba directa y linealmente con la cantidad de plásmido de APOBEC4-3xHA usado durante la co-transfección (Fig. 3, panel superior). Se obtuvieron resultados similares usando un plásmido de expresión que codificaba APOBEC4-HA (no mostrado).

Conjuntamente, los resultados indican que se recluta un complejo de APOBEC4 por la célula infectada con virus durante la producción de virus. Si está presente proteína APOBEC4 adicional, se aumenta la producción de virus. La expresión de una proteína APOBEC4 modificada que se estabiliza por modificación del extremo N, entre otros, por adición de una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, el marcador HA, conduce a una mayor cantidad de complejos de APOBEC4 en la célula y por lo tanto a una mayor producción del virus por dicha célula. La expresión de una proteína APOBEC4 modificada cuya unión a la cola de poli-lisina C-terminal se reduce o se inhibe, entre otras cosas, por modificación del extremo C, por ejemplo, por adición de una secuencia de aminoácidos como marcador HA o tres marcadores HA, conduce a una menor cantidad de complejo de APOBEC4 en la célula y por lo tanto a una menor producción del virus por dicha célula.

Además, como es evidente por los resultados, por ejemplo, de la transferencia de western, los efectos pro- y antivirales, respectivamente de acuerdo con la presente invención se correlacionan directamente con la cantidad de vector de expresión de APOBEC4 usado para la transfección. En otras palabras, la relación entre el vector de

expresión que codifica el genoma proviral y el vector plasmídico que codifica la proteína APOBEC4 (modificada) determina el nivel de aumento o reducción de virus por la célula transfectada. Como la cantidad de ADN que puede transfectarse a una célula está limitada debido a la citotoxicidad del reactivo de transfección, se generaron líneas celulares que expresaban de forma estable la proteína APOBEC4 (modificada) y posteriormente se transfectaron con vectores de expresión que codificaban diversos genomas provirales. En dichas líneas celulares, claramente se aumentaron los efectos pro- y antivirales de la presente invención.

Ejemplo 2: Modulación de la Producción de Virus VIH-1 NL-luc R-E por la Expresión de APOBEC4

Se repitieron los experimentos del Ejemplo 1 usando el derivado de VIH-1 NL4-3 NL-luc R-E-, seudotipificado con la proteína VSV-G.

La Figura 4 muestra los resultados de la transferencia de western que confirman los descubrimientos del Ejemplo 1. La co-transfección de las células con un plásmido de expresión que codifica el virus indicado y el plásmido de expresión que codifica la proteína APOBEC4 no modificada conduce a un aumento en la producción viral tanto en el sobrenadante viral como en la célula (Fig. 4, panel central); la co-transfección con el plásmido de expresión que codifica la proteína HA-APOBEC4 conduce a un aumento mayor en la producción viral (Fig. 4, panel inferior) y la co-transfección con el plásmido de expresión que codifica la proteína APOBEC4-3xHA conduce a una reducción drástica de la producción viral (Fig. 4, panel superior). De forma similar, el grado de aumento o reducción en la producción de virus se correlaciona directa y linealmente con la cantidad de plásmido de expresión de APOBEC4 usado durante la co-transfección. Se obtuvieron resultados similares usando un plásmido de expresión que codificaba APOBEC4-HA (no mostrado).

Conjuntamente, los resultados indican que los efectos pro- y antivirales desvelados por la presente invención no se restringen al genoma proviral de tipo silvestre sino que también son aplicables, por ejemplo, a virus seudotipificados.

Ejemplo 3: Ensayos con Virus Indicador

El virus indicador seudotipificado VSV-G NL-luc R-E- se empleó para verificar los resultados determinados por transferencia de western. Se transfectaron células 293T como se ha descrito anteriormente, se recogieron los virus y los lisados celulares de aproximadamente 2×10^4 células se analizaron con respecto a la expresión de luciferasa.

La Figura 5 muestra los resultados de los ensayos con virus indicador y demuestra que la expresión del gen indicador de luciferasa (en lugar del gen *nef* viral) depende de la expresión de APOBEC4 de la misma manera que la producción de virus depende de la expresión de APOBEC4. La co-transfección de las células con NL-luc R-E- y el plásmido de expresión que codifica la proteína APOBEC4 no modificada conduce a un aumento en la actividad luciferasa que se correlaciona directa y linealmente con la cantidad de plásmido APOBEC4 usado durante la co-transfección.

La co-transfección con el plásmido de expresión que codifica la proteína HA-APOBEC4 conduce a un mayor aumento en la actividad de luciferasa en comparación con la co-transfección con la proteína APOBEC4 no modificada. De forma similar, el aumento en la actividad luciferasa se correlaciona de forma directa y lineal con la cantidad de plásmido de HA-APOBEC4 usado durante la co-transfección.

La co-transfección con el plásmido de expresión que codifica la proteína APOBEC4-3xHA conduce a una reducción drástica en la actividad luciferasa en comparación con la co-transfección con la proteína APOBEC4 no modificada. De nuevo, el grado de reducción en la actividad luciferasa se correlaciona de forma directa y lineal con la cantidad de plásmido de APOBEC4-3HA usado durante la co-transfección. Se obtuvieron resultados similares usando un plásmido de expresión que codificaba APOBEC4-HA no mostrado.

Conjuntamente estos resultados demuestran que los ensayos de virus indicador de la presente invención permiten una lisis rápida y cuantitativa de interacciones de los componentes celulares y virales así como de factores antivirales. Además, los resultados demuestran que los efectos pro- y antivirales de la presente invención también son aplicables para virus que están modificados genéticamente, por ejemplo, para llevar un gen heterólogo.

Ejemplo 4: Modulación de la Producción de Diferentes Cepas de Virus por la Expresión de APOBEC4

Se repitieron los experimentos de los Ejemplos anteriores usando un genoma de virus truncado que codificaba sólo las proteínas y enzimas estructurales (Gag, Pol). Además, se ensayaron VISagm, VISmac y VLM como cepas de virus diferentes adicionales.

Para todos los virus ensayados, pudieron verificarse los resultados de los Ejemplos anteriores. En cada caso, la co-transfección de las células con un plásmido de expresión que codifica el genoma proviral y el plásmido de expresión que codifica la proteína APOBEC4 no modificada conduce a un aumento en la producción viral tanto en el sobrenadante viral como en la célula; la co-transfección con el plásmido de expresión que codifica la proteína HA-APOBEC4 conduce a un mayor aumento en la producción viral y la co-transfección con el plásmido de expresión que codifica la proteína APOBEC4-3xHA o APOBEC3-HA conduce a una reducción drástica en la producción viral. En cada caso, el grado de aumento o reducción en la producción de virus se correlaciona de forma directa y lineal

con la cantidad de plásmido de expresión de APOBEC4 usado durante la co-transfección.

Conjuntamente los resultados indican que los efectos pro- y antivirales que desvela la presente invención no se restringen al virus VIH-1, sino que también son aplicables, por ejemplo, a virus VIH truncados y/o a diversos retrovirus o lentivirus distintos. Por lo tanto, la presente invención proporciona medios para aumentar o reducir, es decir, modular la producción de retrovirus y lentivirus o partículas de los mismos.

5

Ejemplo 5: APOBEC4 como Diana de Fármacos Antirretrovirales

Se ponen en contacto células 293T o HeLa con un compuesto candidato y la cantidad de transcrito de APOBEC4 y/o de proteína APOBEC4 se determina por RT-PCR, transferencia de Northern y transferencia de western respectivamente. Una reducción del transcrito de APOBEC4 y/o de proteína APOBEC4 en presencia del compuesto candidato en comparación con la ausencia del compuesto candidato indica que el compuesto candidato es un posible inhibidor de la transcripción y/o expresión de APOBEC4 y por lo tanto un posible fármaco antirretroviral.

10

En otro ensayo, se ponen en contacto células 293T o HeLa infectadas con un retrovirus con uno o más compuestos de ensayo, por ejemplo, moléculas de ARNip o ARNhc dirigidas contra el ARNm de APOBEC4, y se determina el título del retrovirus en presencia y ausencia de un compuesto de ensayo. Una reducción en el título indica que el compuesto de ensayo interfiere con el ensamblaje del retrovirus por interacción con la proteína APOBEC4 y, por lo tanto, es un posible fármaco antirretroviral.

15

Referencias

- ROGOZIN, IB, y col. APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. Cell Cycle. 2005, vol. 4, nº 9, págs. 1281-5.
- 20 • CONTICELLO, SG, y col. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. Mol Biol Evol. 2005, vol. 22, nº 367, págs. 77.
- HOLMES, RK, y col. APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? Trends Biochem Sci. 2005, vol. 32, nº 3. págs. 118-128
- WO 2005/117947
- 25 • WO 2006/065377
- KIM, VN, y col. Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. J Virol. 1998, vol. 72, nº 1, págs. 811-6.
- ALTSCHUL, SF, y col. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990, vol. 215, nº 3, págs. 403-10.
- PERASON, WR, y col. Improved tools for biological sequence comparison. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988, vol. 85, nº 8, págs. 2444-8.
- 30 • VIGNA, E, y col. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. J Gene Med. 2000, vol. 2, nº 5, págs. 308-16.
- PALU, G, y col. Progress with retroviral gene vectors. Rev Med Virol. 2000, vol.10, nº 3, págs. 185-202.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten durch den Präsidenten des Paul-Ehrlich-Instituts Prof. Dr. Johannes Löwer
 <120> Modulación de la producción de retrovirus por APOBEC4
 <130> 141-003
 <160> 12
 <170> PatentIn versión 3.4
 10 <210> 1
 <211> 5255
 <212> ADN
 <213> Plásmido pH A-3xHA
 <220>
 15 <221> promotor
 <222> (3)..(591)
 <223> CMV
 <220>
 <221> CDS
 20 <222> (702)..(1919)
 <223> hAPOBEC4-3xHA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1827)..(1853)
 25 <223> HA1
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1857)..(1883)
 <223> HA2
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1887)..(1913)
 <223> HA3
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (1917)..(1919)
 <223> STOP
 <220>
 <221> polyA_signal
 40 <222> (2076)..(2126)
 <223> poli A de SV40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3153)..(3947)
 45 <223> Kan/Neo r
 <400> 1

ES 2 370 888 T3

attagttatt aatagtaate aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc	60
cgcgttacat aacttacggt aatggccccg cctggctgac cgcccaacga cccccgcca	120
ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt	180
caatgggtgg agtattttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg	240
ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc cgcctggca ttatgcccag	300
tacatgacct tatgggactt tctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgtctatt	360
accatggtga tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcgggt tgactcacgg	420
ggatttcaa gtctccacc cttgacgtc aatgggagtt tgttttgga ccaaaatcaa	480
cgggactttc caaaatgtcg taacaactcc gcccattga cgcaaattgg cggttagcgt	540
gtacgggtgg aggtctatat aagcagagct ggtttagtga accgtcagat ccgctagcgc	600
taccggactc agatctcgag ctcaagcttc gaattcgccc ttcaggcgggt acagcctgga	660
gacaattgat ggtttgcagc tagaagacag taaatctagc a atg gag ccc ata tat	716
	Met Glu Pro Ile Tyr
	1 5
gag gag tac cta gca aat cat gga aca ata gta aaa cca tat tac tgg	764
Glu Glu Tyr Leu Ala Asn His Gly Thr Ile Val Lys Pro Tyr Tyr Trp	
	10 15 20
cta agc ttc tct ctc gat tgc tct aat tgt cct tac cat att cga aca	812
Leu Ser Phe Ser Leu Asp Cys Ser Asn Cys Pro Tyr His Ile Arg Thr	
	25 30 35
ggg gaa gaa gca aga gtt tcc ctc aca gaa ttt tgt cag att ttt gga	860
Gly Glu Glu Ala Arg Val Ser Leu Thr Glu Phe Cys Gln Ile Phe Gly	
	40 45 50
ttc cct tat ggg aca aca ttt cct caa aca aaa cac ctc aca ttt tat	908
Phe Pro Tyr Gly Thr Thr Phe Pro Gln Thr Lys His Leu Thr Phe Tyr	
	55 60 65
gaa cta aaa act tct tct ggt agc ctg gtg caa aag ggc cat gct agc	956
Glu Leu Lys Thr Ser Ser Gly Ser Leu Val Gln Lys Gly His Ala Ser	
	70 75 80 85
agt tgc act ggg aat tat atc cat cca gaa tca atg ctc ttt gaa atg	1004
Ser Cys Thr Gly Asn Tyr Ile His Pro Glu Ser Met Leu Phe Glu Met	
	90 95 100
aat ggt tat ctt gac tca gcc ata tac aat aat gac agc atc agg cat	1052
Asn Gly Tyr Leu Asp Ser Ala Ile Tyr Asn Asn Asp Ser Ile Arg His	
	105 110 115
atc att ctg tat tcc aac aac tcc cct tgt aat gaa gct aac cac tgc	1100
Ile Ile Leu Tyr Ser Asn Asn Ser Pro Cys Asn Glu Ala Asn His Cys	

ES 2 370 888 T3

120	125	130	
tgc atc agc aaa atg tat aat ttc ctg att acg tat cca ggc atc act			1148
Cys Ile Ser Lys Met Tyr Asn Phe Leu Ile Thr Tyr Pro Gly Ile Thr			
135	140	145	
ctt agt att tat ttt tct cag ctc tat cat act gag atg gac ttt cct			1196
Leu Ser Ile Tyr Phe Ser Gln Leu Tyr His Thr Glu Met Asp Phe Pro			
150	155	160	165
gcc tca gca tgg aac cgc gaa gct ctc cgg agc ctg gcc agc tta tgg			1244
Ala Ser Ala Trp Asn Arg Glu Ala Leu Arg Ser Leu Ala Ser Leu Trp			
170	175	180	
ccg cgg gtt gtt ttg agt cca ata agt ggt ggg atc tgg cat tct gtt			1292
Pro Arg Val Val Leu Ser Pro Ile Ser Gly Gly Ile Trp His Ser Val			
185	190	195	
ctc cac agc ttt ata agt ggt gtc tca gga tca cat gtt ttt cag ccc			1340
Leu His Ser Phe Ile Ser Gly Val Ser Gly Ser His Val Phe Gln Pro			
200	205	210	
att tta act ggg aga gca ctg gct gac agg cac aac gca tat gaa atc			1388
Ile Leu Thr Gly Arg Ala Leu Ala Asp Arg His Asn Ala Tyr Glu Ile			
215	220	225	
aat gcc ata aca ggc gta aaa cct tac ttc act gat gtt ctt ctc cag			1436
Asn Ala Ile Thr Gly Val Lys Pro Tyr Phe Thr Asp Val Leu Leu Gln			
230	235	240	245
aca aaa agg aat cca aac aca aaa gct cag gag gct tta gag agc tac			1484
Thr Lys Arg Asn Pro Asn Thr Lys Ala Gln Glu Ala Leu Glu Ser Tyr			
250	255	260	
ccc tta aac aat gcc ttt cct gga cag ttt ttt caa atg ccg agt gga			1532
Pro Leu Asn Asn Ala Phe Pro Gly Gln Phe Phe Gln Met Pro Ser Gly			
265	270	275	
caa ctc caa ccc aac cta cct cca gac ctc agg gct cct gtt gtt ttt			1580
Gln Leu Gln Pro Asn Leu Pro Pro Asp Leu Arg Ala Pro Val Val Phe			
280	285	290	
gtg cta gtg cct ctc agg gac tta cca cca atg cat atg ggc caa aac			1628
Val Leu Val Pro Leu Arg Asp Leu Pro Pro Met His Met Gly Gln Asn			
295	300	305	
cca aat aaa ccc agg aat atc gta agg cac tta aat atg cct caa atg			1676
Pro Asn Lys Pro Arg Asn Ile Val Arg His Leu Asn Met Pro Gln Met			
310	315	320	325
tca ttc cag gaa acc aag gac ctt gga agg ctt ccc act gga agg tca			1724
Ser Phe Gln Glu Thr Lys Asp Leu Gly Arg Leu Pro Thr Gly Arg Ser			
330	335	340	
gtg gag ata gtg gaa atc aca gaa cag ttt gca agt agc aag gag gca			1772
Val Glu Ile Val Glu Ile Thr Glu Gln Phe Ala Ser Ser Lys Glu Ala			
345	350	355	

ES 2 370 888 T3

gat gaa aag aag aag aag aaa ggg aag aaa ggg gat cca ccg gtc gcc	1820
Asp Glu Lys Lys Lys Lys Lys Gly Lys Lys Gly Asp Pro Pro Val Ala	
360 365 370	
acc atg tac ccc tac gac gtg ccc gac tac gcc ggc tac ccc tac gac	1868
Thr Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp	
375 380 385	
gtg ccc gac tac gcc ggc tac ccc tac gac gtg ccc gac tac gcc ggc	1916
Val Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly	
390 395 400 405	
taa ctgagcggcc ggcactctag atcataatca gccataccac atttgtagag	1969
gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat	2029
gcaattggtg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc	2089
atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagttgtgg tttgtccaaa	2149
ctcatcaatg tatcttaagg cgtaaattgt aagcgtaat attttgtaa aattegcggt	2209
aaatttttgt taaatcagct cattttttaa ccaataggcc gaaatcggca aaatccctta	2269
taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt gagtgttgtt ccagtttgga acaagagtcc	2329
actattaag aacgtggact ccaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg	2389
cccactacgt gaaccatcac cctaatcaag ttttttgggg tcgaggtgcc gtaaagcact	2449
aaatcggaac cctaaaggga gccccgatt tagagcttga cggggaaagc cggcgaacgt	2509
ggcgagaaaag gaagggaaga aagcgaaggg agcgggcgct agggcgctgg caagtgtagc	2569
ggtcacgctg cgcgtaacca ccacaccgac cgcgcttaat gcgcccgtac agggcgcgtc	2629
aggtggcact tttcggggaa atgtgcgagg aaccctatt tgtttatttt tctaaataca	2689
ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa	2749
aaggaagagt cctgaggcgg aaagaaccag ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga	2809
aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca tgcattcaa ttagtcagca	2869
accaggtgtg gaaagtcccc aggtccccca gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc	2929
aattagtcag caaccatagt cccgccccta actccgcca tcccgcacct aactccgccc	2989
agttccgccc attctccgcc ccatggetga ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag	3049
gccgcctcgg cctctgagct attccagaag tagtgaggag gcttttttgg aggcctagge	3109
ttttgcaaag atcgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcattgattg aacaagatgg	3169
attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca	3229
acagacaatc ggetgctctg atgccgcccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccgg	3289

ES 2 370 888 T3

tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaagacg aggcagcgcg 3349
 gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga 3409
 agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca 3469
 ccttgctcct gccgagaaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgtc 3529
 tgatccggct acctgcccac tegaccacca agcgaaacat cgcacgcgac gagcacgtac 3589
 tcggatggaa gccggtcttg tegatcagga tgatctggac gaagagcacc aggggctcgc 3649
 gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gagcatgccc gacggcgagg atctcgtcgt 3709
 gacctatggc gatgcctgct tgccgaatat catgggggaa aatggccgct tttctggatt 3769
 catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggetacccg 3829
 tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat 3889
 cgcgcctccc gattcgcagc gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgagc 3949
 gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgccc acctgccatc acgagatttc 4009
 gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg ggcttcggaa tegttttccg ggacgccggc 4069
 tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tgcgccacce tagggggagg 4129
 ctaactgaaa cacggaagga gacaataccg gaaggaaccc gcgctatgac ggcaataaaa 4189
 agacagaata aaacgcacgg tgttgggtcg tttgttcata aacgcggggg tcgggtcccag 4249
 ggctggcact ctgtcgatac cccaccgaga ccccatggg gccaatagc ccgcgtttct 4309
 tccttttccc caccaccacc cccaagtctg ggtgaaggcc cagggctcgc agccaacgtc 4369
 ggggcggcag gcctgccat agcctcaggt tactcatata tactttagat tgatttaaaa 4429
 cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgacccaa 4489
 atccctaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaaagga 4549
 tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 4609
 ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 4669
 ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 4729
 cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgtc tgetaatcct gttaccagtg 4789
 gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 4849
 gataaggcgc agcggctcgg ctgaacgggg ggctcgtgca cacagcccag cttggagcga 4909
 acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc 4969
 gaagggagaa aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 5029

ES 2 370 888 T3

agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc ctgtcggggt tcgccacctc 5089
 tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 5149
 agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgetca catgttcttt 5209
 cctgcggtat ccctgattc tgtggataac cgtattaccg ccatgc 5255

<210> 2
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Plásmido pH A-3xHA
 <400> 2

5

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

Lys Pro Tyr Tyr Trp Leu Ser Phe Ser Leu Asp Cys Ser Asn Cys Pro
 20 25 30

Tyr His Ile Arg Thr Gly Glu Glu Ala Arg Val Ser Leu Thr Glu Phe
 35 40 45

Cys Gln Ile Phe Gly Phe Pro Tyr Gly Thr Thr Phe Pro Gln Thr Lys
 50 55 60

His Leu Thr Phe Tyr Glu Leu Lys Thr Ser Ser Gly Ser Leu Val Gln
 65 70 75 80

Lys Gly His Ala Ser Ser Cys Thr Gly Asn Tyr Ile His Pro Glu Ser
 85 90 95

Met Leu Phe Glu Met Asn Gly Tyr Leu Asp Ser Ala Ile Tyr Asn Asn
 100 105 110

Asp Ser Ile Arg His Ile Ile Leu Tyr Ser Asn Asn Ser Pro Cys Asn
 115 120 125

Glu Ala Asn His Cys Cys Ile Ser Lys Met Tyr Asn Phe Leu Ile Thr
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ile Thr Leu Ser Ile Tyr Phe Ser Gln Leu Tyr His Thr
 145 150 155 160

Glu Met Asp Phe Pro Ala Ser Ala Trp Asn Arg Glu Ala Leu Arg Ser
 165 170 175

ES 2 370 888 T3

Leu Ala Ser Leu Trp Pro Arg Val Val Leu Ser Pro Ile Ser Gly Gly
 180 185 190

Ile Trp His Ser Val Leu His Ser Phe Ile Ser Gly Val Ser Gly Ser
 195 200 205

His Val Phe Gln Pro Ile Leu Thr Gly Arg Ala Leu Ala Asp Arg His
 210 215 220

Asn Ala Tyr Glu Ile Asn Ala Ile Thr Gly Val Lys Pro Tyr Phe Thr
 225 230 235 240

Asp Val Leu Leu Gln Thr Lys Arg Asn Pro Asn Thr Lys Ala Gln Glu
 245 250 255

Ala Leu Glu Ser Tyr Pro Leu Asn Asn Ala Phe Pro Gly Gln Phe Phe
 260 265 270

Gln Met Pro Ser Gly Gln Leu Gln Pro Asn Leu Pro Pro Asp Leu Arg
 275 280 285

Ala Pro Val Val Phe Val Leu Val Pro Leu Arg Asp Leu Pro Pro Met
 290 295 300

His Met Gly Gln Asn Pro Asn Lys Pro Arg Asn Ile Val Arg His Leu
 305 310 315 320

Asn Met Pro Gln Met Ser Phe Gln Glu Thr Lys Asp Leu Gly Arg Leu
 325 330 335

Pro Thr Gly Arg Ser Val Glu Ile Val Glu Ile Thr Glu Gln Phe Ala
 340 345 350

Ser Ser Lys Glu Ala Asp Glu Lys Lys Lys Lys Lys Gly Lys Lys Gly
 355 360 365

Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 370 375 380

Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp Val
 385 390 395 400

Pro Asp Tyr Ala Gly
 405

<210> 3
 <211> 6138
 <212> ADN
 <213> Plásmido pHA-hA4-cDNA3.1Zeo(+)
 5 <220>
 <221> promotor
 <222> (232)..(819)
 <223> promotor de CMV
 <220>
 10 <221> primer_bind
 <222> (769)..(789)
 <223> cebador directo de CMV
 <220>
 15 <221> primer_bind
 <222> (863)..(882)
 <223> cebador de T7
 <220>
 20 <221> promotor
 <222> (863)..(879)
 <223> promotor de T7
 <220>
 25 <221> CDS
 <222> (941)..(2074)
 <223> HA-hA4
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (947)..(973)
 <223> marcador HA
 <220>
 30 <221> primer_bind
 <222> (2145)..(2162)
 <223> Cebador inverso de BGH
 <220>
 35 <221> polyA_signal
 <222> (2151)..(2375)
 <223> pA de BGH
 <220>
 40 <221> rep_origin
 <222> (2421)..(2849)
 <223> origen de f1
 <220>
 45 <221> promotor
 <222> (2854)..(3224)
 <223> promotor temprano de SV40
 <220>
 <221> promotor
 <222> (3239)..(3306)
 <223> promotor de EM7
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (3307)..(3681)
 <223> Zeo(R)
 <220>
 55 <221> rep_origin
 <222> (4324)..(4997)
 <223> origen de pUC
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (5142)..(6002)
 <223> Amp(R)
 <220>
 <221> promotor
 <222> (6003)..(6101)
 <223> promotor de bla
 65 <400> 3

ES 2 370 888 T3

gacggatcgg gagatctccc gatccccctat ggtcgcactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata	300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgc tggtgaccg cccaacgacc	360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca	600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtogta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc	900

ES 2 370 888 T3

gtttaaactt aagcttggtta ccgagctcgg atccctagca atg gga tat cca tac	955
Met Gly Tyr Pro Tyr	
1 5	
gat gtt cca gat tac gct gag ccc ata tat gag gag tac cta gca aat	1003
Asp Val Pro Asp Tyr Ala Glu Pro Ile Tyr Glu Glu Tyr Leu Ala Asn	
10 15 20	
cat gga aca ata gta aaa cca tat tac tgg cta agc ttc tct ctc gat	1051
His Gly Thr Ile Val Lys Pro Tyr Tyr Trp Leu Ser Phe Ser Leu Asp	
25 30 35	
tgc tct aat tgt cct tac cat att cga aca ggt gaa gaa gca aga gtt	1099
Cys Ser Asn Cys Pro Tyr His Ile Arg Thr Gly Glu Glu Ala Arg Val	
40 45 50	
tcc ctc aca gaa ttt tgt cag att ttt gga ttc cct tat ggg aca aca	1147
Ser Leu Thr Glu Phe Cys Gln Ile Phe Gly Phe Pro Tyr Gly Thr Thr	
55 60 65	
ttt cct caa aca aaa cac ctc aca ttt tat gaa cta aaa act tct tct	1195
Phe Pro Gln Thr Lys His Leu Thr Phe Tyr Glu Leu Lys Thr Ser Ser	
70 75 80 85	
ggg agc ctg gtg caa aag ggc cat gct agc agt tgc act ggg aat tat	1243
Gly Ser Leu Val Gln Lys Gly His Ala Ser Ser Cys Thr Gly Asn Tyr	
90 95 100	
atc cat cca gaa tca atg ctc ttt gaa atg aat ggt tat ctt gac tca	1291
Ile His Pro Glu Ser Met Leu Phe Glu Met Asn Gly Tyr Leu Asp Ser	
105 110 115	
gcc ata tac aat aat gac agc atc agg cat atc att ctg tat tcc aac	1339
Ala Ile Tyr Asn Asn Asp Ser Ile Arg His Ile Ile Leu Tyr Ser Asn	
120 125 130	
aac tcc cct tgt aat gaa gct aac cac tgc tgc atc agc aaa atg tat	1387
Asn Ser Pro Cys Asn Glu Ala Asn His Cys Cys Ile Ser Lys Met Tyr	
135 140 145	
aat ttc ctg att acg tat cca ggc atc act ctt agt att tat ttt tct	1435
Asn Phe Leu Ile Thr Tyr Pro Gly Ile Thr Leu Ser Ile Tyr Phe Ser	
150 155 160 165	
cag ctc tat cat act gag atg gac ttt cct gcc tca gca tgg aac cgc	1483
Gln Leu Tyr His Thr Glu Met Asp Phe Pro Ala Ser Ala Trp Asn Arg	
170 175 180	
gaa gct ctc cgg agc ctg gcc agc tta tgg ccg cgg gtt gtt ttg agt	1531
Glu Ala Leu Arg Ser Leu Ala Ser Leu Trp Pro Arg Val Val Leu Ser	
185 190 195	
cca ata agt ggt ggg atc tgg cat tct gtt ctc cac agc ttt ata agt	1579
Pro Ile Ser Gly Gly Ile Trp His Ser Val Leu His Ser Phe Ile Ser	
200 205 210	
ggg gtc tca gga tca cat gtt ttt cag ccc att tta act ggg aga gca	1627
Gly Val Ser Gly Ser His Val Phe Gln Pro Ile Leu Thr Gly Arg Ala	

ES 2 370 888 T3

215	220	225	
ctg gct gac agg cac aac gca tat gaa atc aat gcc ata aca ggc gta			1675
Leu Ala Asp Arg His Asn Ala Tyr Glu Ile Asn Ala Ile Thr Gly Val			
230	235	240	245
aaa cct tac ttc act gat gtt ctt ctc cag aca aaa agg aat cca aac			1723
Lys Pro Tyr Phe Thr Asp Val Leu Leu Gln Thr Lys Arg Asn Pro Asn			
	250	255	260
aca aaa gct cag gag gct tta gag agc tac ccc tta aac aat gcc ttt			1771
Thr Lys Ala Gln Glu Ala Leu Glu Ser Tyr Pro Leu Asn Asn Ala Phe			
	265	270	275
cct gga cag ttt ttt caa atg ccg agt gga caa ctc caa ccc aac cta			1819
Pro Gly Gln Phe Phe Gln Met Pro Ser Gly Gln Leu Gln Pro Asn Leu			
	280	285	290
cct cca gac ctc agg gct cct gtt gtt ttt gtg cta gtg cct ctc agg			1867
Pro Pro Asp Leu Arg Ala Pro Val Val Phe Val Leu Val Pro Leu Arg			
	295	300	305
gac tta cca cca atg cat atg ggc caa aac cca aat aaa ccc agg aat			1915
Asp Leu Pro Pro Met His Met Gly Gln Asn Pro Asn Lys Pro Arg Asn			
310	315	320	325
atc gta agg cac tta aat atg cct caa atg tca ttc cag gaa acc aag			1963
Ile Val Arg His Leu Asn Met Pro Gln Met Ser Phe Gln Glu Thr Lys			
	330	335	340
gac ctt gga agg ctt ccc act gga agg tca gtg gag ata gtg gaa atc			2011
Asp Leu Gly Arg Leu Pro Thr Gly Arg Ser Val Glu Ile Val Glu Ile			
	345	350	355
aca gaa cag ttt gca agt agc aag gag gca gat gaa aag aag aag aag			2059
Thr Glu Gln Phe Ala Ser Ser Lys Lys Glu Ala Asp Glu Lys Lys Lys Lys			
	360	365	370
aaa ggg aag aaa taa gaattctgca gatatccagc acagtggcgg ccgctcgagt			2114
Lys Gly Lys Lys			
375			
ctagagggcc cgtttaaacc cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat			2174
ctgttggttg cccctcccc gtgccttctc tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc			2234
tttcctaata aaatgaggaa attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg			2294
gggggtggggg ggggcaggac agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcattgctg			2354
gggatgcggt gggctctatg gcttctgagg cgaaaagaac cagctggggc tctagggggg			2414
atccccacgc gcctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtgggtggt acgcgcagcg			2474
tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttcccttc			2534
tgcacagtt cgcggcttt ccccgtaag ctctaaatcg gggcaccct ttaggggtcc			2594

ES 2 370 888 T3

gatttagtgc tttacggcac ctcgacccca aaaaacttga ttagggatgat ggttcacgta 2654
gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtec acgttcttta 2714
atagtggact cttgttccaa actggaacaa caetcaaccc tatctcggtc tattcttttg 2774
atttataagg gattttgggg atttcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa 2834
aatttaacgc gaattaatc tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtgtggaa agtccccagg 2894
ctccccaggc aggcagaagt atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accagggtgtg 2954
gaaagtcccc aggcctccca gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag 3014
caaccatagt cccgccccta actecgccc tcccgccct aactccgcc agttccgcc 3074
attctccgcc ccattggctga ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctctg 3134
cctctgagct attccagaag tagtgaggag gcttttttgg aggcctagge ttttgcaaaa 3194
agctcccggg agcttgata tccattttct gatctgatca gcacgtgttg acaattaatc 3254
atcggcatag tatatcggca tagtataata cgacaagggt aggaactaaa ccatggccaa 3314
gttgaccagt gccgttccgg tgetcaccgc gcgcgacgtc gccggagcgg tcgagttctg 3374
gaccgaccgg ctccgggtct cccgggactt cgtggaggac gacttcgccg gtgtgggtccg 3434
ggacgacgtg accctgttca tcagcgcggg ccaggaccag gtggtgccgg acaacaccct 3494
ggcctgggtg tgggtgcgcg gcctggacga gctgtacgcc gagtggtcgg aggtcgtgtc 3554
caegaacttc cgggacgect ccgggcccgc catgaccgag atcggcgagc agccgtgggg 3614
gcgggagttc gccctgcgcg acccggccgg caactgcgtg cacttcgtgg ccgaggagca 3674
ggactgacac gtgtacgag atttcgatc caccgccgce ttctatgaaa ggttgggctt 3734
cggaatcgtt ttccgggacg ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga 3794
gttcttcgcc caccccact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag 3854
catcacaat ttcacaaata aagcattttt ttcaactgcat tctagttgtg gtttgtccaa 3914
actcatcaat gtatcttate atgtctgtat accgtcgacc tctagctaga gcttggcgta 3974
atcatggtea tagctgttte ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat 4034
acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagtgagct aactcacatt 4094
aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta 4154
atgaatcggc caacgcgcg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgtctt ccgcttctc 4214
gctcactgac tcgctgcgct cggctgtctg gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaaa 4274
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 4334

ES 2 370 888 T3

aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcggtg ctggcgtttt tccataggct 4394
 ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagagggtgc gaaaccgcgac 4454
 aggactataa agataccagg egtttcccc tggaagetec ctcggtgect ctccgtttcc 4514
 gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ttttctccct tcgggaagcg tggcgctttc 4574
 tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg 4634
 tgtgcacgaa cccccggtc agccccagcg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga 4694
 gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag 4754
 cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta 4814
 cactagaagg acagtatttg gtatctgogc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag 4874
 agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaaac caccgctggt agcgggtggt tttttgtttg 4934
 caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac 4994
 ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttgggtca tgagattatc 5054
 aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga agtttttaaat caatctaaag 5114
 tatatatgag taaacttggc ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc 5174
 agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgccctgactc cccgtcgtgt agataactac 5234
 gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc 5294
 accggtcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg 5354
 tctgcaact ttatccgct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag 5414
 tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc 5474
 acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac 5534
 atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggc tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag 5594
 aagtaagttg gccgcagtgt taccactcat ggttatggca gcaactgcata attctcttac 5654
 tgcctatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactgggtgag tactcaacca agtcattctg 5714
 agaatagttg atgcccgcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc 5774
 gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact 5834
 ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg 5894
 atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt tcttgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa 5954
 tgccgcaaaa aaggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttctttt 6014
 tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg 6074

tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga 6134

cgtc

6138

ES 2 370 888 T3

<210> 4
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Plásmido pHA-hA4-cDNA3.1Zeo(+)
 <220>
 <223> Plásmido pHA-hA4-cDNA3.1Zeo(+)
 <400> 4

5

```

Met Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Glu Pro Ile Tyr Glu
1           5           10           15

Glu Tyr Leu Ala Asn His Gly Thr Ile Val Lys Pro Tyr Tyr Trp Leu
          20           25           30

Ser Phe Ser Leu Asp Cys Ser Asn Cys Pro Tyr His Ile Arg Thr Gly
          35           40           45

Glu Glu Ala Arg Val Ser Leu Thr Glu Phe Cys Gln Ile Phe Gly Phe
50           55           60

Pro Tyr Gly Thr Thr Phe Pro Gln Thr Lys His Leu Thr Phe Tyr Glu
65           70           75           80

Leu Lys Thr Ser Ser Gly Ser Leu Val Gln Lys Gly His Ala Ser Ser
          85           90           95

Cys Thr Gly Asn Tyr Ile His Pro Glu Ser Met Leu Phe Glu Met Asn
          100          105          110

Gly Tyr Leu Asp Ser Ala Ile Tyr Asn Asn Asp Ser Ile Arg His Ile
          115          120          125

Ile Leu Tyr Ser Asn Asn Ser Pro Cys Asn Glu Ala Asn His Cys Cys
          130          135          140

Ile Ser Lys Met Tyr Asn Phe Leu Ile Thr Tyr Pro Gly Ile Thr Leu
145           150           155           160

Ser Ile Tyr Phe Ser Gln Leu Tyr His Thr Glu Met Asp Phe Pro Ala
          165          170          175
    
```

10

ES 2 370 888 T3

Ser Ala Trp Asn Arg Glu Ala Leu Arg Ser Leu Ala Ser Leu Trp Pro
 180 185 190

Arg Val Val Leu Ser Pro Ile Ser Gly Gly Ile Trp His Ser Val Leu
 195 200 205

His Ser Phe Ile Ser Gly Val Ser Gly Ser His Val Phe Gln Pro Ile
 210 215 220

Leu Thr Gly Arg Ala Leu Ala Asp Arg His Asn Ala Tyr Glu Ile Asn
 225 230 235 240

Ala Ile Thr Gly Val Lys Pro Tyr Phe Thr Asp Val Leu Leu Gln Thr
 245 250 255

Lys Arg Asn Pro Asn Thr Lys Ala Gln Glu Ala Leu Glu Ser Tyr Pro
 260 265 270

Leu Asn Asn Ala Phe Pro Gly Gln Phe Phe Gln Met Pro Ser Gly Gln
 275 280 285

Leu Gln Pro Asn Leu Pro Pro Asp Leu Arg Ala Pro Val Val Phe Val
 290 295 300

Leu Val Pro Leu Arg Asp Leu Pro Pro Met His Met Gly Gln Asn Pro
 305 310 315 320

Asn Lys Pro Arg Asn Ile Val Arg His Leu Asn Met Pro Gln Met Ser
 325 330 335

Phe Gln Glu Thr Lys Asp Leu Gly Arg Leu Pro Thr Gly Arg Ser Val
 340 345 350

Glu Ile Val Glu Ile Thr Glu Gln Phe Ala Ser Ser Lys Glu Ala Asp
 355 360 365

Glu Lys Lys Lys Lys Lys Gly Lys Lys
 370 375

<210> 5
 <211> 6108
 <212> ADN
 <213> Plásmido phA4-cDNA3.1Zeo(+)
 <220>
 <221> promotor

<222> (232)..(819)
 <223> promotor de CMV
 <220>
 <221> primer_bind
 5 <222> (769)..(789)
 <223> cebador directo de CMV
 <220>
 <221> primer_bind
 10 <222> (863)..(882)
 <223> cebador de T7
 <220>
 <221> promotor
 <222> (863)..(879)
 <223> promotor de T7
 15 <220>
 <221> CDS
 <222> (941)..(2044)
 <223> hA4
 <220>
 20 <221> primer_bind
 <222> (2115)..(2132)
 <223> cebador inverso de BGH
 <220>
 <221> polyA_site
 25 <222> (2121)..(2345)
 <223> pA de BGH
 <220>
 <221> rep_origin
 <222> (2391)..(2819)
 <223> origen de f1
 30 <220>
 <221> promotor
 <222> (2824)..(3194)
 <223> promotor temprano de SV40
 35 <220>
 <221> promotor
 <222> (3209)..(3276)
 <223> Promotor de EM7
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (3277)..(3651)
 <223> Zeo(R)
 <220>
 <221> polyA_signal
 45 <222> (3781)..(3911)
 <223> pA de SV40
 <220>
 <221> rep_origin
 <222> (4294)..(4967)
 <223> origen de pUC
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5112)..(5972)
 <223> Amp(R)
 55 <220>
 <221> promotor

 <222> (5973)..(6071)
 <223> promotor de bla
 60 <400> 5

ES 2 370 888 T3

gacggatcgg gagatctccc gatccccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata	300
tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcg tggctgaccg cccaacgacc	360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca	600
tcgctattac catgggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acgggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcactatag ggagacccaa gctggctagc	900
gtttaaactt aagcttggtgta ccgagctcgg atccctagca atg gag ccc ata tat	955
	Met Glu Pro Ile Tyr
	1 5
gag gag tac cta gca aat cat gga aca ata gta aaa cca tat tac tgg	1003
Glu Glu Tyr Leu Ala Asn His Gly Thr Ile Val Lys Pro Tyr Tyr Trp	
	10 15 20
cta agc ttc tct ctc gat tgc tct aat tgt cct tac cat att cga aca	1051

ES 2 370 888 T3

Leu	Ser	Phe	Ser	Leu	Asp	Cys	Ser	Asn	Cys	Pro	Tyr	His	Ile	Arg	Thr		
			25					30					35				
ggg	gaa	gaa	gca	aga	ggt	tcc	ctc	aca	gaa	ttt	tgt	cag	att	ttt	gga		1099
Gly	Glu	Glu	Ala	Arg	Val	Ser	Leu	Thr	Glu	Phe	Cys	Gln	Ile	Phe	Gly		
		40					45					50					
ttc	cct	tat	ggg	aca	aca	ttt	cct	caa	aca	aaa	cac	ctc	aca	ttt	tat		1147
Phe	Pro	Tyr	Gly	Thr	Thr	Phe	Pro	Gln	Thr	Lys	His	Leu	Thr	Phe	Tyr		
	55					60					65						
gaa	cta	aaa	act	tct	tct	ggt	agc	ctg	gtg	caa	aag	ggc	cat	gct	agc		1195
Glu	Leu	Lys	Thr	Ser	Ser	Gly	Ser	Leu	Val	Gln	Lys	Gly	His	Ala	Ser		
70					75					80					85		
agt	tgc	act	ggg	aat	tat	atc	cat	cca	gaa	tca	atg	ctc	ttt	gaa	atg		1243
Ser	Cys	Thr	Gly	Asn	Tyr	Ile	His	Pro	Glu	Ser	Met	Leu	Phe	Glu	Met		
				90					95					100			
aat	ggt	tat	ctt	gac	tca	gcc	ata	tac	aat	aat	gac	agc	atc	agg	cat		1291
Asn	Gly	Tyr	Leu	Asp	Ser	Ala	Ile	Tyr	Asn	Asn	Asp	Ser	Ile	Arg	His		
			105					110					115				
atc	att	ctg	tat	tcc	aac	aac	tcc	cct	tgt	aat	gaa	gct	aac	cac	tgc		1339
Ile	Ile	Leu	Tyr	Ser	Asn	Asn	Ser	Pro	Cys	Asn	Glu	Ala	Asn	His	Cys		
		120					125						130				
tgc	atc	agc	aaa	atg	tat	aat	ttc	ctg	att	acg	tat	cca	ggc	atc	act		1387
Cys	Ile	Ser	Lys	Met	Tyr	Asn	Phe	Leu	Ile	Thr	Tyr	Pro	Gly	Ile	Thr		
	135					140					145						
ctt	agt	att	tat	ttt	tct	cag	ctc	tat	cat	act	gag	atg	gac	ttt	cct		1435
Leu	Ser	Ile	Tyr	Phe	Ser	Gln	Leu	Tyr	His	Thr	Glu	Met	Asp	Phe	Pro		
150					155					160					165		
gcc	tca	gca	tgg	aac	cgc	gaa	gct	ctc	cgg	agc	ctg	gcc	agc	tta	tgg		1483
Ala	Ser	Ala	Trp	Asn	Arg	Glu	Ala	Leu	Arg	Ser	Leu	Ala	Ser	Leu	Trp		
				170					175					180			
ccg	cgg	ggt	ggt	ttg	agt	cca	ata	agt	ggt	ggg	atc	tgg	cat	tct	ggt		1531
Pro	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Pro	Ile	Ser	Gly	Gly	Ile	Trp	His	Ser	Val		
			185					190					195				
ctc	cac	agc	ttt	ata	agt	ggt	gtc	tca	gga	tca	cat	gtt	ttt	cag	ccc		1579
Leu	His	Ser	Phe	Ile	Ser	Gly	Val	Ser	Gly	Ser	His	Val	Phe	Gln	Pro		
		200					205					210					
att	tta	act	ggg	aga	gca	ctg	gct	gac	agg	cac	aac	gca	tat	gaa	atc		1627
Ile	Leu	Thr	Gly	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp	Arg	His	Asn	Ala	Tyr	Glu	Ile		
	215					220					225						
aat	gcc	ata	aca	ggc	gta	aaa	cct	tac	ttc	act	gat	ggt	ctt	ctc	cag		1675
Asn	Ala	Ile	Thr	Gly	Val	Lys	Pro	Tyr	Phe	Thr	Asp	Val	Leu	Leu	Gln		
230					235					240					245		
aca	aaa	agg	aat	cca	aac	aca	aaa	gct	cag	gag	gct	tta	gag	agc	tac		1723
Thr	Lys	Arg	Asn	Pro	Asn	Thr	Lys	Ala	Gln	Glu	Ala	Leu	Glu	Ser	Tyr		
				250					255					260			

ES 2 370 888 T3

ccc tta aac aat gcc ttt cct gga cag ttt ttt caa atg ccg agt gga	1771
Pro Leu Asn Asn Ala Phe Pro Gly Gln Phe Phe Gln Met Pro Ser Gly	
265 270 275	
caa ctc caa ccc aac cta cct cca gac ctc agg gct cct gtt gtt ttt	1819
Gln Leu Gln Pro Asn Leu Pro Pro Asp Leu Arg Ala Pro Val Val Phe	
280 285 290	
gtg cta gtg cct ctc agg gac tta cca cca atg cat atg ggc caa aac	1867
Val Leu Val Pro Leu Arg Asp Leu Pro Pro Met His Met Gly Gln Asn	
295 300 305	
cca aat aaa ccc agg aat atc gta agg cac tta aat atg cct caa atg	1915
Pro Asn Lys Pro Arg Asn Ile Val Arg His Leu Asn Met Pro Gln Met	
310 315 320 325	
tca ttc cag gaa acc aag gac ctt gga agg ctt ccc act gga agg tca	1963
Ser Phe Gln Glu Thr Lys Asp Leu Gly Arg Leu Pro Thr Gly Arg Ser	
330 335 340	
gtg gag ata gtg gaa atc aca gaa cag ttt gca agt agc aag gag gca	2011
Val Glu Ile Val Glu Ile Thr Glu Gln Phe Ala Ser Ser Lys Glu Ala	
345 350 355	
gat gaa aag aag aag aag aaa ggg aag aaa taa gaattctgca gatatccagc	2064
Asp Glu Lys Lys Lys Lys Lys Gly Lys Lys	
360 365	
acagtggcgg ccgctcgagt ctagagggcc cgtttaaacc cgetgatcag cctcgactgt	2124
gccttctagt tgccagccat ctggtggttg cccctcccc gtgccttct tgaccctgga	2184
aggtgccact cccactgtcc tttcctaata aaatgaggaa attgcatcgc attgtctgag	2244
taggtgtcat tctattctgg ggggtgggt ggggcaggac agcaaggggg aggattggga	2304
agacaatagc aggcattctg gggatgcggt gggctctatg gcttctgagg cggaaagaac	2364
cagctggggc tctagggggt atccccacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg	2424
tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctcctt	2484
cgctttcttc ccttcctttc tcgccacgtt cgcggcttt ccccgtaag ctctaaatcg	2544
gggcatccct ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctcgacceca aaaaacttga	2604
ttagggtgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggttttcc gccctttgac	2664
gttgagctcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaacct	2724
tatcteggtc tattcttttg atttataagg gattttgggg atttcggcct attgggtaaa	2784
aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattaatc tgtggaatgt gtgtcagtta	2844
gggtgtggaa agtccccagg ctccccaggc aggcagaagt atgcaaagca tgcattctca	2904
ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccc gcaggcagaa gtatgcaaag	2964

ES 2 370 888 T3

catgcatctc aattagtcag caacatagtc cccgccccta actcgcceca tcccgccect 3024
 aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga ctaatttttt ttatttatgc 3084
 agaggccgag gccgcctctg cctctgagct attccagaag tagtgaggag gcttttttgg 3144
 aggccataggc ttttgcaaaa agctcccggg agcttgtata tccatttttc gatctgatca 3204
 gcacgtggtg acaattaatc atcggcatag tatatcggca tagtataata cgacaagggtg 3264
 aggaactaaa ccatggccaa gttgaccagt gccgttcggg tgctcaccgc gcgcgacgtc 3324
 gccggagcgg tcgagttctg gaccgaccgg ctccgggttct cccgggactt cgtggaggac 3384
 gacttcgccc gtgtggtecg ggacgacgtg accctgttca tcagcgcggg ccaggaccag 3444
 gtggtgccgg acaacaccct ggcctgggtg tgggtgcgcg gccctggacga gctgtacgcc 3504
 gagtggtcgg aggtcgtgtc cacgaacttc cgggacgctt cccggccggc catgaccgag 3564
 atcggcgagc agccgtgggg gcgggagttc gccctgcgcg acccggccgg caactgcgtg 3624
 cacttcgtgg ccgaggagca ggactgacac gtgctacgag atttcgattc caccgcgcgc 3684
 ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcgtt ttccgggacg cccgctggat gatcctccag 3744
 cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc caccocaact tgtttattgc agcttataat 3804
 ggttacaaat aaagcaatag catcacaatc ttacacaata aagcattttt ttcactgcat 3864
 tctagttgtg gtttgtccaa actcatcaat gtatcttata atgtctgtat accgtcgacc 3924
 tctagctaga gcttggcgtc atcatggcca tagctgttct ctgtgtgaaa ttgttatccg 3984
 ctcacaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa 4044
 tgagtgagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac 4104
 ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgccc ggagaggccc tttgcgtatt 4164
 gggcgcctct ccgcttcttc gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttc gctgcggcga 4224
 gcggtatcag ctcaactcaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 4284
 ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggcgcggtg 4344
 ctggcgtttt tccataggct ccccccct gacgagcctc acaaaaatcg acgctcaagt 4404
 cagagggtgg gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaaagctcc 4464
 ctgctgcgct ctccctgttc gaccctgcgg ctaccggat acctgtccgc ctttctccct 4524
 tcgggaagcg tggcgcttct tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc 4584
 gttcgtctca agctgggctg tgtgcaogaa cccccgttc agcccagccg ctgcgcctta 4644
 tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttategce actgpcagca 4704

ES 2 370 888 T3

```

gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggag gtgctacaga gttcttgaag 4764
tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgagc tctgctgaag 4824
ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaaac caccgctggt 4884
agcgggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa 4944
gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg 5004
atthttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa ttaaaaatga 5064
agthtttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggt ctgacagtta ccaatgctta 5124
atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgctgactc 5184
cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg 5244
ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga 5304
agggccgagc gcagaagtgg tctgcaact ttatccgctt ccatccagtc tattaattgt 5364
tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt 5424
gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc 5484
caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgthtgca aaaaagcggg tagctccttc 5544
ggctctccga tcgttgctcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca 5604
gcactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag 5664
tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgccccgac cgagttgctc ttgccccgag 5724
tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgctcat cattggaaaa 5784
cgthcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttgatgtaa 5844
cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga 5904
gcaaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgthga 5964
atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggthta thgtctcatg 6024
agcggataca taththaatg taththagaaa aataaacaaa taggggthcc gcgcacattt 6084
ccccgaaaag tgccacctga cgtc 6108

```

```

<210> 6
<211> 367
<212> PRT
<213> Plásmido phA4-cDNA3.1Zeo(+)
<220>
<223> Plásmido phA4-cDNA3.1Zeo(+)
<400> 6

```

5

10

ES 2 370 888 T3

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

Lys Pro Tyr Tyr Trp Leu Ser Phe Ser Leu Asp Cys Ser Asn Cys Pro
 20 25 30

Tyr His Ile Arg Thr Gly Glu Glu Ala Arg Val Ser Leu Thr Glu Phe
 35 40 45

Cys Gln Ile Phe Gly Phe Pro Tyr Gly Thr Thr Phe Pro Gln Thr Lys
 50 55 60

His Leu Thr Phe Tyr Glu Leu Lys Thr Ser Ser Gly Ser Leu Val Gln
 65 70 75 80

Lys Gly His Ala Ser Ser Cys Thr Gly Asn Tyr Ile His Pro Glu Ser
 85 90 95

Met Leu Phe Glu Met Asn Gly Tyr Leu Asp Ser Ala Ile Tyr Asn Asn
 100 105 110

Asp Ser Ile Arg His Ile Ile Leu Tyr Ser Asn Asn Ser Pro Cys Asn
 115 120 125

Glu Ala Asn His Cys Cys Ile Ser Lys Met Tyr Asn Phe Leu Ile Thr
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ile Thr Leu Ser Ile Tyr Phe Ser Gln Leu Tyr His Thr
 145 150 155 160

Glu Met Asp Phe Pro Ala Ser Ala Trp Asn Arg Glu Ala Leu Arg Ser
 165 170 175

Leu Ala Ser Leu Trp Pro Arg Val Val Leu Ser Pro Ile Ser Gly Gly
 180 185 190

Ile Trp His Ser Val Leu His Ser Phe Ile Ser Gly Val Ser Gly Ser
 195 200 205

His Val Phe Gln Pro Ile Leu Thr Gly Arg Ala Leu Ala Asp Arg His
 210 215 220

ES 2 370 888 T3

Asn Ala Tyr Glu Ile Asn Ala Ile Thr Gly Val Lys Pro Tyr Phe Thr
 225 230 235 240

Asp Val Leu Leu Gln Thr Lys Arg Asn Pro Asn Thr Lys Ala Gln Glu
 245 250 255

Ala Leu Glu Ser Tyr Pro Leu Asn Asn Ala Phe Pro Gly Gln Phe Phe
 260 265 270

Gln Met Pro Ser Gly Gln Leu Gln Pro Asn Leu Pro Pro Asp Leu Arg
 275 280 285

Ala Pro Val Val Phe Val Leu Val Pro Leu Arg Asp Leu Pro Pro Met
 290 295 300

His Met Gly Gln Asn Pro Asn Lys Pro Arg Asn Ile Val Arg His Leu
 305 310 315 320

Asn Met Pro Gln Met Ser Phe Gln Glu Thr Lys Asp Leu Gly Arg Leu
 325 330 335

Pro Thr Gly Arg Ser Val Glu Ile Val Glu Ile Thr Glu Gln Phe Ala
 340 345 350

Ser Ser Lys Glu Ala Asp Glu Lys Lys Lys Lys Lys Gly Lys Lys
 355 360 365

<210> 7

<211> 32

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador directo

<400> 7

10 caggcggtag cagcctggag acaaattgat gg 32

<210> 8

<211> 57

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Cebador inverso

<400> 8

gacttggatc cccctttctc cctttctctc tctcttttc atctgctcc ttgctac 57

<210> 9

20 <211> 68

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador directo

25 <400> 9

ES 2 370 888 T3

cggatcccta gcaatgggat atccatacga tgttccagat tacgctgagc ccatatatga 60
ggagtacc 68

5 <210> 10
<211> 32
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador inverso
<400> 10

10 gaattcttta ttcttccct ttcttctct tc 32
<210> 11
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Cebador directo
<400> 11

20 cggatcccta gcaatggagc ccatatatg 29
<210> 12
<211> 32
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

25 <223> Cebador inverso
<400> 12
gaattcttta ttcttccct ttcttctct tc 32

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína APOBEC4 humana modificada **caracterizada porque** el extremo N está modificado para estabilizar la proteína APOBEC4 o el extremo C está modificado, en la que la modificación del extremo N comprende la adición de al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el marcador V5, el marcador c-myc y el marcador HA o una secuencia de aminoácidos homóloga a la misma, y en la que la modificación del extremo C comprende la adición de al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el marcador V5, el marcador c-myc y el marcador HA o una secuencia de aminoácidos homóloga a la misma.
2. La proteína APOBEC4 modificada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que al menos una secuencia de aminoácidos añadida al extremo N es un marcador HA o una secuencia al menos un 90% idéntica a la misma.
- 10 3. La proteína APOBEC4 modificada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que al menos una secuencia de aminoácidos añadida al extremo C es el marcador HA o 3 marcadores HA o una secuencia al menos un 90% idéntica a la misma.
4. Una célula que expresa la proteína APOBEC4 modificada de acuerdo con las reivindicaciones 1-3.
- 15 5. La célula de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la célula produce además un retrovirus o partículas virales del mismo.
6. La célula de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el retrovirus es un lentivirus y/o es un virus deficiente en la replicación.
7. La célula de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el extremo N de la proteína APOBEC4 está modificado para estabilizar la proteína APOBEC4.
- 20 8. La célula de acuerdo con las reivindicaciones 4-7, en la que la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula 293T, una célula HeLa, una célula T auxiliar y un macrófago.
9. Un ácido nucleico que codifica la proteína APOBEC4 modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o el complemento de la misma.
10. Un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9.
- 25 11. Un ácido nucleico o un vector para terapia génica somática que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el ácido nucleico que codifica APOBEC4 está unido operativamente a un promotor.
12. Una vacuna que comprende la célula de acuerdo con la reivindicación 7 y un vehículo farmacéutico aceptable.
13. Una partícula retroviral deficiente en la replicación que comprende el ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 10-11, en la que el ácido nucleico es un ARN.
- 30 14. La partícula retroviral de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la partícula retroviral procede de VIH, VIH-1, VIH-2, VIS, VISagm, VISmac, espuma virus, VIF, VAIE o VLM.
15. Un procedimiento *in vitro* para reducir la producción de retrovirus o lentivirus o partículas virales de los mismos de una célula que produce un retrovirus, lentivirus o partículas de vector de los mismos, comprendiendo el procedimiento expresar una proteína APOBEC4 modificada de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 3 en dicha célula, en la que el extremo C de la proteína APOBEC4 está modificado.
- 35 16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la producción de retrovirus o partículas virales de los mismos se reduce al menos un 20%.
17. Un procedimiento para producir partículas retrovirales, comprendiendo el procedimiento cultivar una célula de acuerdo con la reivindicación 7.
- 40 18. El uso de una célula de acuerdo con la reivindicación 7, del ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 o de la partícula retroviral de acuerdo con las reivindicaciones 13-14 para la fabricación de un medicamento.
19. El uso de una célula de acuerdo con la reivindicación 7, del ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 o de la partícula retroviral de acuerdo con las reivindicaciones 13-14 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o vacunación contra una infección por un retrovirus.
- 45 20. Un procedimiento para seleccionar compuestos antivirales, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - poner en contacto una célula que expresa una proteína APOBEC4 humana con un compuesto de ensayo; y
 - determinar si el compuesto de ensayo afecta a la transcripción y/o expresión de APOBEC4 de dicha célula, en el que una reducción en la transcripción y/o expresión de APOBEC4 de dicha célula indica que el compuesto de ensayo es un compuesto antiviral.

21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la transcripción y/o expresión de APOBEC4 de una primera célula en presencia de un compuesto de ensayo se compara con la transcripción y/o expresión de APOBEC4 de una segunda célula en ausencia de dicho compuesto de ensayo,

5 en el que una reducción en la transcripción y/o expresión de APOBEC4 de la primera célula en comparación con la segunda célula indica que el compuesto de ensayo es un compuesto antiviral.

22. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 20 ó 21, en el que la transcripción y/o expresión de APOBEC4 se determina por RT-PCR, transferencia de Northern y/o transferencia de western.

23. Un procedimiento para seleccionar compuestos antivirales, comprendiendo el procedimiento las etapas de

10 poner en contacto una célula que expresa un retrovirus y una proteína APOBEC4 con un compuesto de ensayo;
y
determinar el título del retrovirus en presencia y ausencia del compuesto de ensayo,
en el que una reducción en el título indica que el compuesto de ensayo es un compuesto antiviral.

24. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20-23, en el que el compuesto de ensayo es una molécula de ARNip o ARNhc dirigida contra el ARNm de APOBEC4.

15

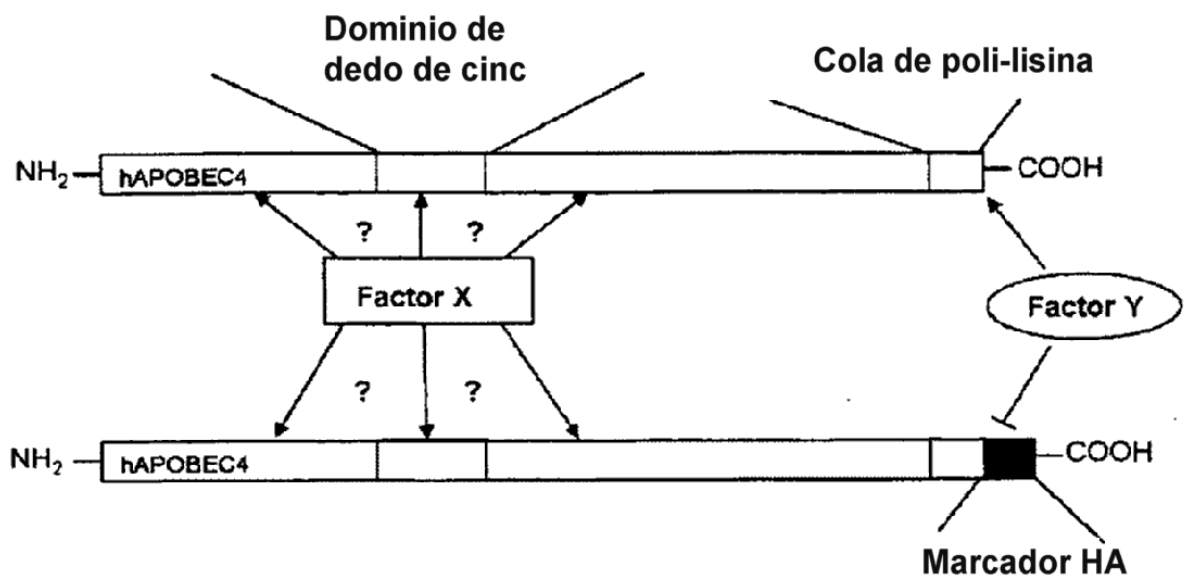


Fig. 1a

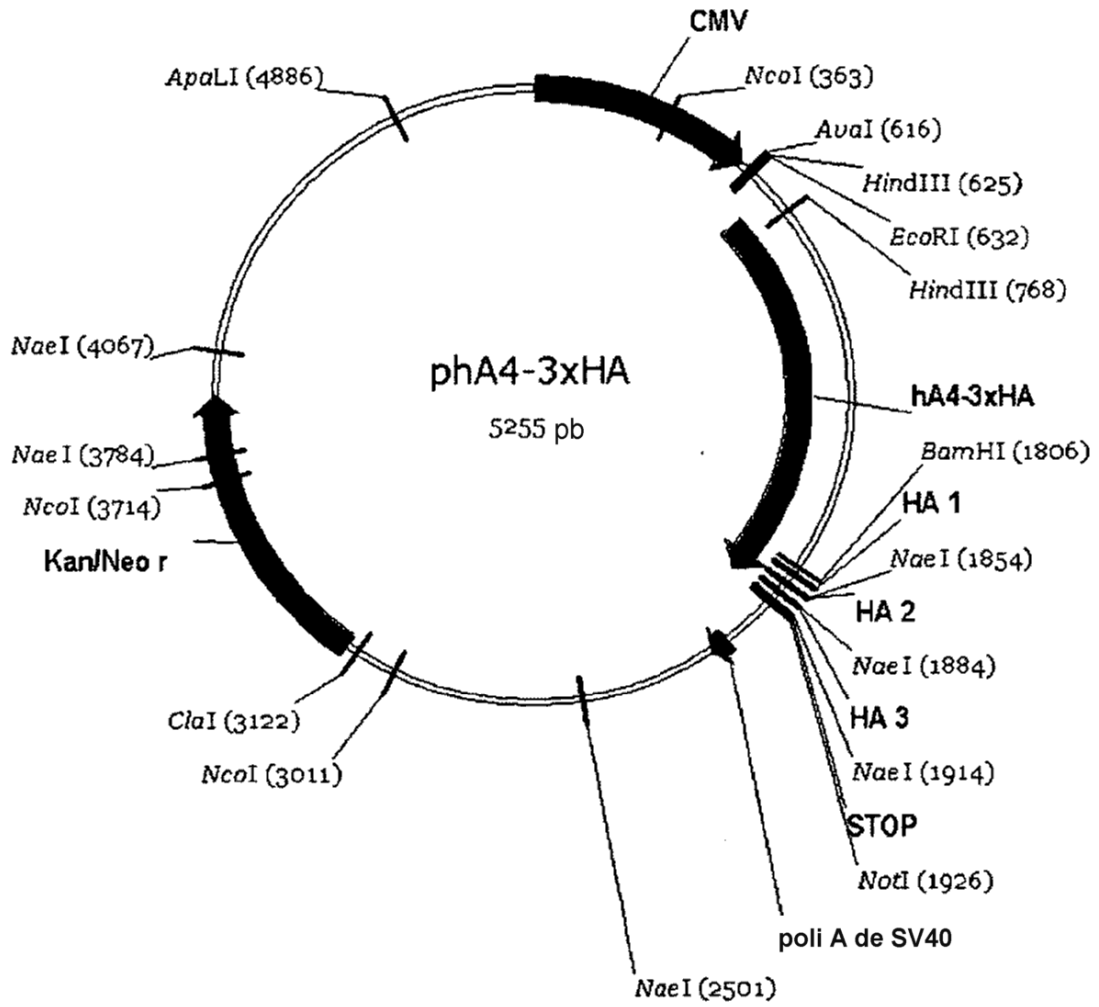


Fig. 2A

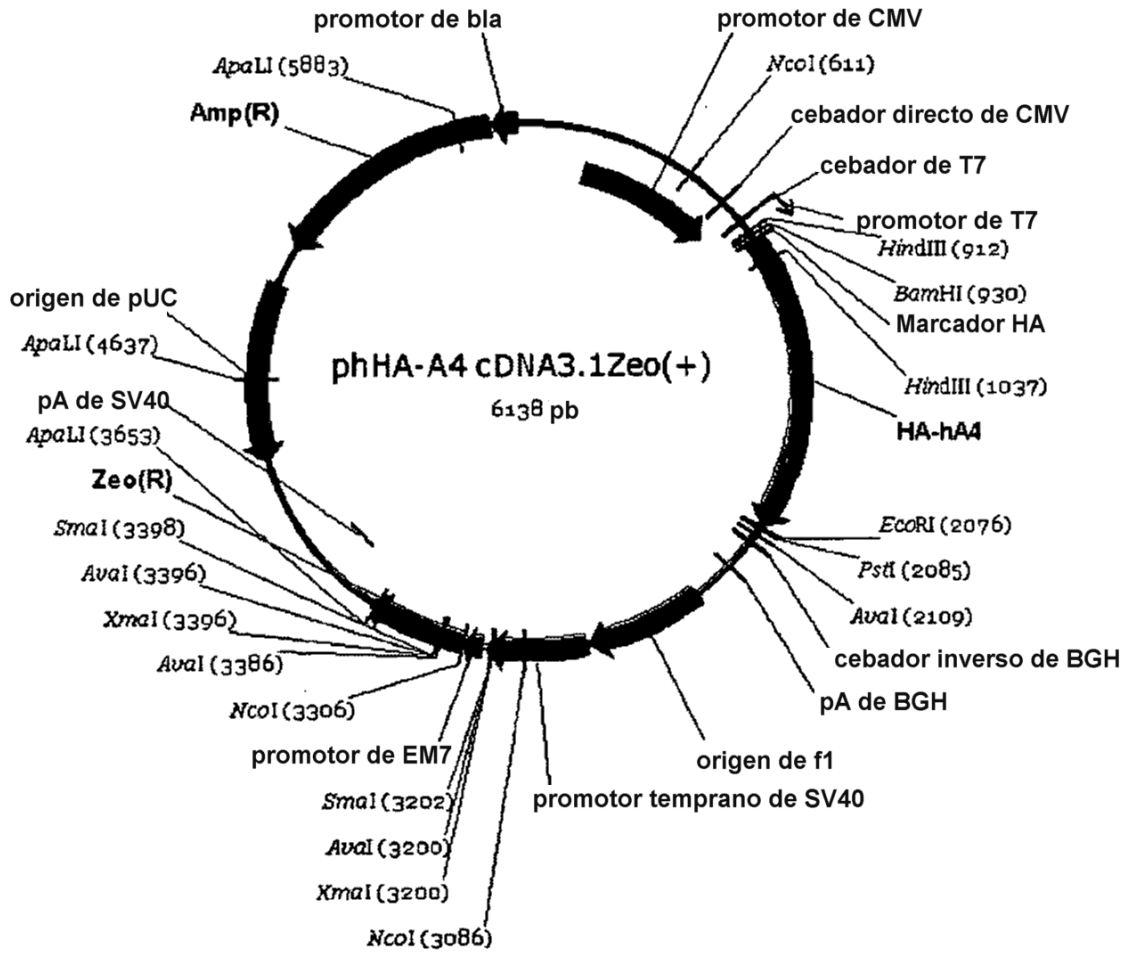


Fig. 2B

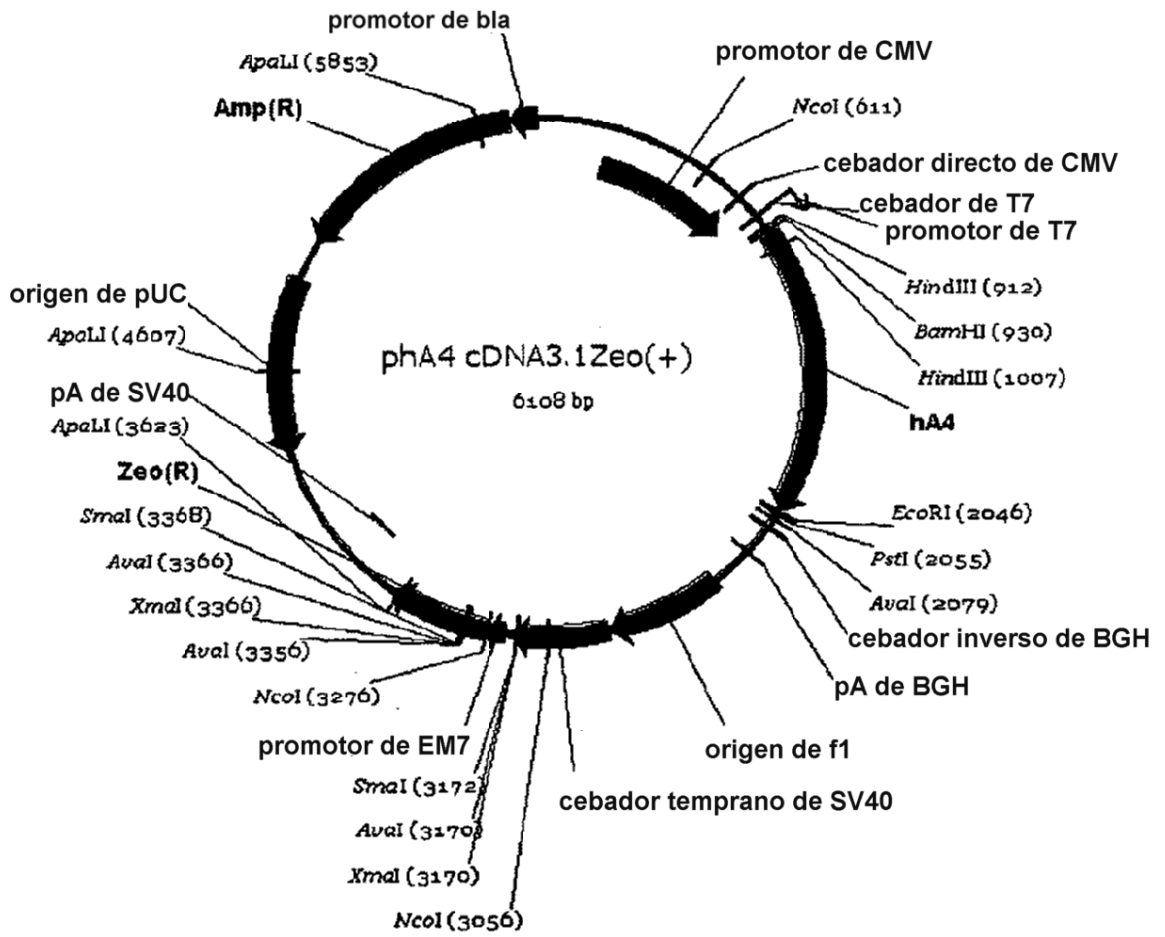


Fig. 2C

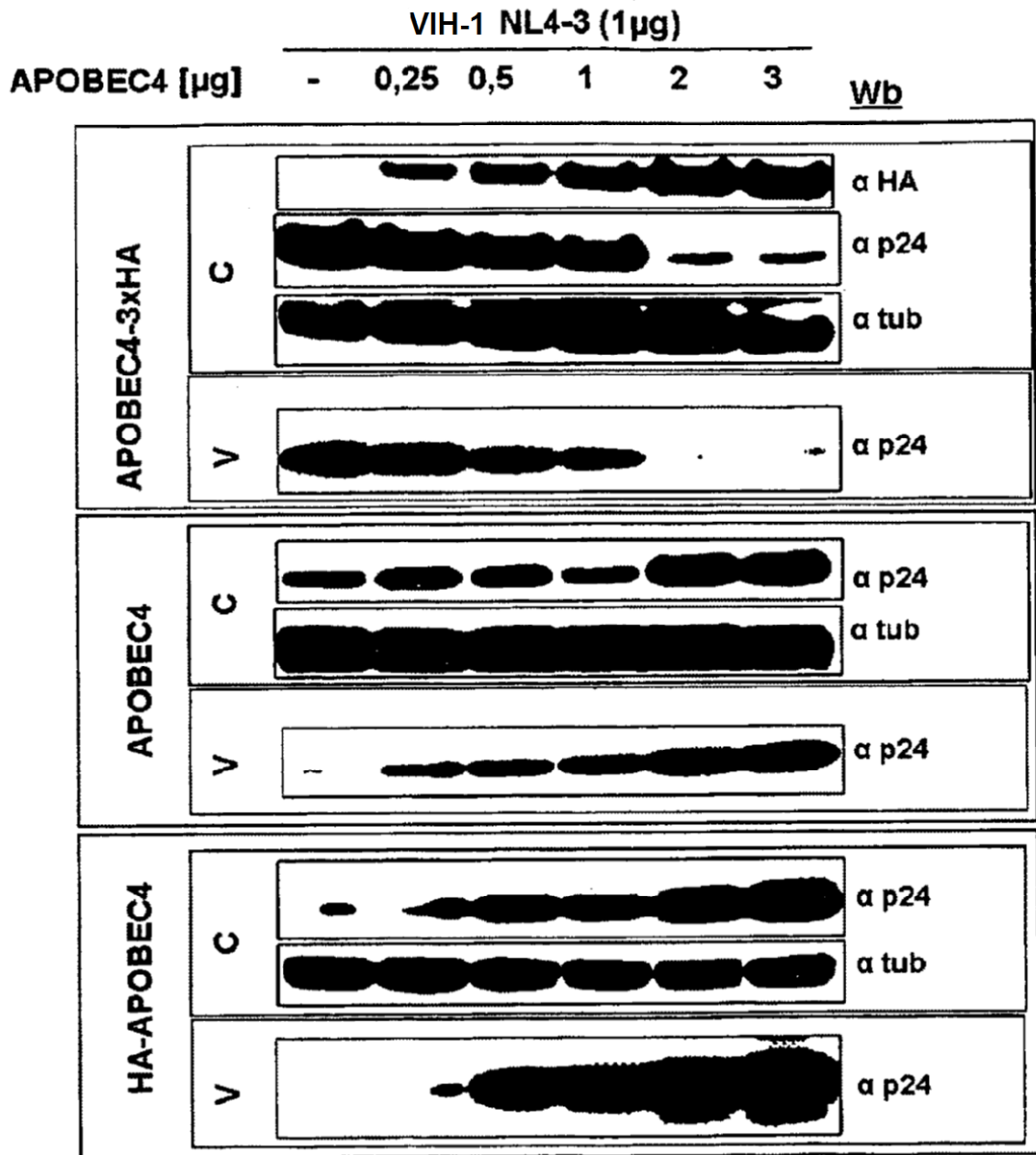


Fig. 3

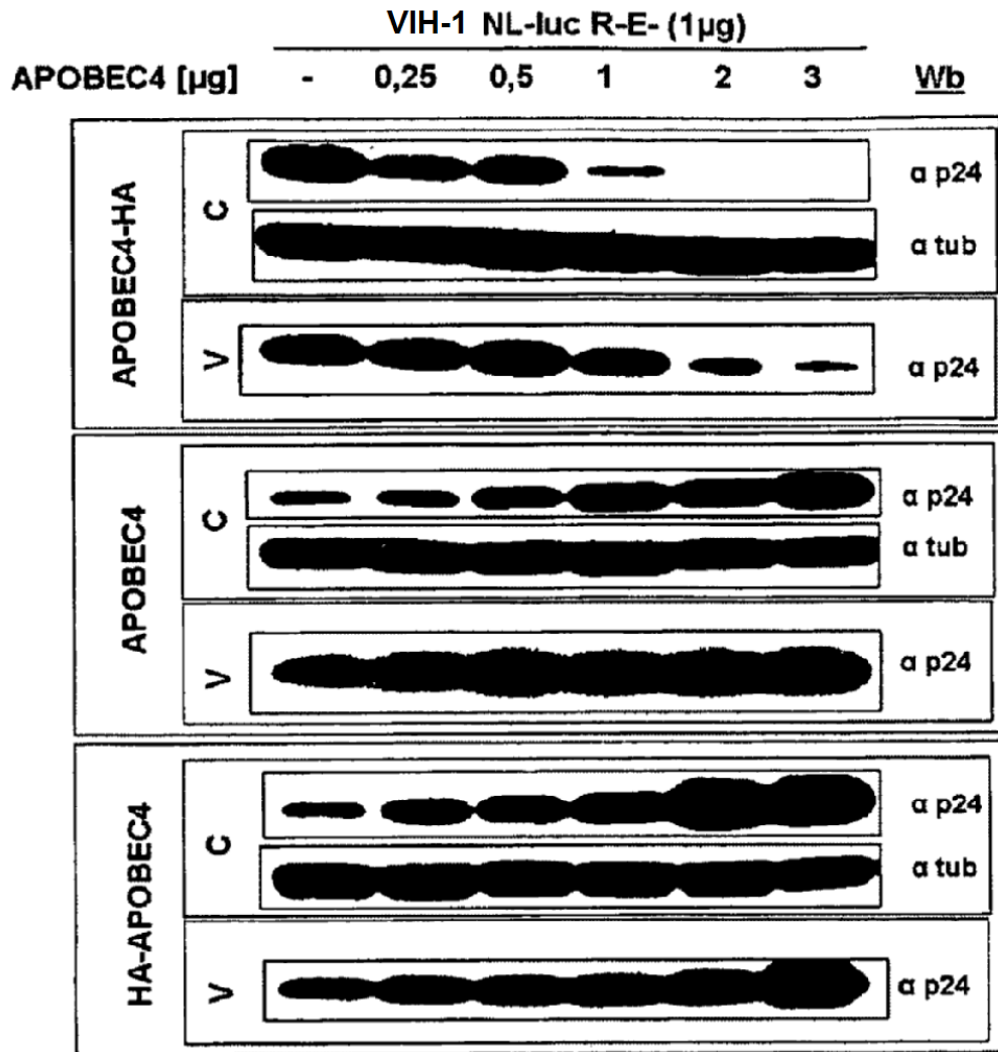


Fig. 4

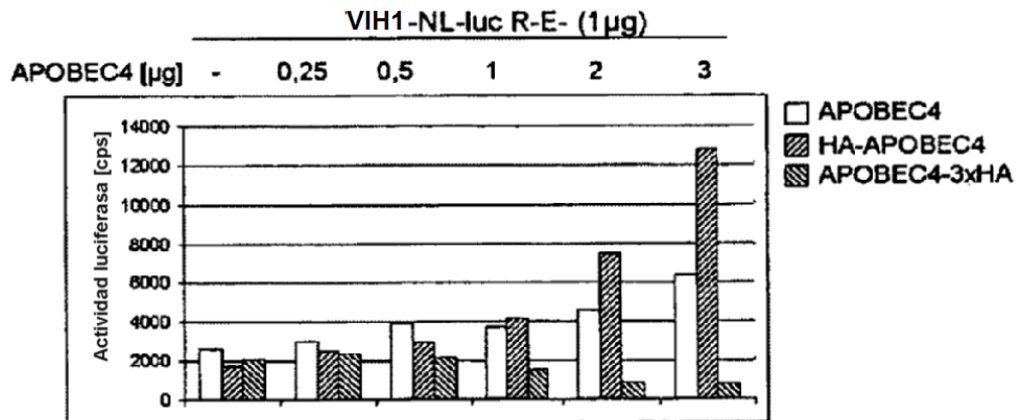


Fig. 5