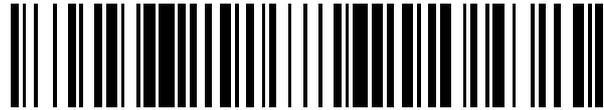


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 356**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2011 E 11714562 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 2558579**

54 Título: **Enzimas de ARN polimerasa propensas a la formación de caperuza y sus aplicaciones**

30 Prioridad:

16.04.2010 EP 10305400

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

30.12.2013

73 Titular/es:

**EUKARYS (100.0%)
5, rue Maidstone Centre d'Affaires le Coryphée
Bâtiment Alto -BP 455
60004 Beauvais Cedex, FR**

72 Inventor/es:

JAIS, PHILIPPE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 436 356 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

Enzimas de ARN polimerasa propensas a la formación de caperuza y sus aplicaciones.

5 La presente invención se refiere al campo de la transgenia, especialmente en las células eucariotas.

En especial, la invención se refiere a una enzima híbrida útil para la producción de moléculas de ARN con estructuras con caperuza (en inglés "cap") m⁷GpppN en el terminal 5'.

10 La expresión eucariótica se utiliza ampliamente en las ciencias biológicas, la biotecnología y la medicina. Por lo tanto, se han desarrollado muchos métodos para la transgenia eficiente en las células eucariotas. Fuentes de ADN comunes y mecanismos para administración son los virus (por ejemplo, baculovirus, retrovirus, o adenovirus) o vectores no víricos, incluyendo plásmidos y cromosomas artificiales.

15 Debido a su sencillez, los plásmidos no víricos se utilizan generalmente como vectores de expresión para la transferencia génica en células eucariotas, tanto en aplicaciones *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, los niveles de expresión transgénica conseguida por procedimientos no víricos suelen ser modestos y disminuyen rápidamente. Una explicación frecuente de esta modesta eficacia es el hecho de que las moléculas de ADN, que son de más de aproximadamente 40.000 daltons, son demasiado grandes para atravesar los poros nucleares y entrar en el núcleo, donde son transcritos por la ARN polimerasa II nuclear (Lang, Scholz *et al.* 1986; Zabner, Fasbender *et al.* 1995). De hecho, sólo una cantidad muy pequeña (<0,1-0,001%) de grandes moléculas de ADN se transfiere activamente desde el citoplasma al núcleo de las células eucariotas. Los mecanismos por los cuales la expresión disminuye rápidamente son también posiblemente nucleares específicos y relacionados con el silenciamiento de la expresión transgénica por diversos mecanismos epigenéticos (Loser, Jennings *et al.* 1998; Gill, Smyth *et al.* 2001; Miao, Thompson *et al.* 2001; Nicol, Wong *et al.* 2002; Miao, Ye *et al.* 2003).

20 Otros inconvenientes de los métodos de transgenia que utilizan el sistema de transcripción de ARN endógeno de las células eucariotas también restringen su uso. En primer lugar, la poca capacidad de procesamiento de las ARN polimerasas eucariotas nucleares (por ejemplo, 10-20 nucleótidos/segundo para la ARN polimerasa II) (Fire, Samuels *et al.*, 1984; Ucker y Yamamoto, 1984; Bengal, Flores *et al.* 1991; Izban y Luse 1992). En segundo lugar, la competencia entre la transcripción de genes endógenos y la transcripción de transgenes. En tercer lugar, la extrema complejidad de las ARN polimerasas eucariotas, que están formadas por varias subunidades (por ejemplo, 12 subunidades de ARN polimerasa II y reguladas por múltiples factores de transcripción (Lodish, Berk *et al.* 2008).

35 En vista de estos inconvenientes, se han desarrollado algunos métodos de transgenia basados en ARN polimerasas dependientes de ADN bacteriofágico. Estos métodos tienen en especial la ventaja de no utilizar el sistema de transcripción de ARN endógeno de las células eucariotas, excepto algunas ARN polimerasas dependientes de ADN bacteriofágico, que tienen una capacidad de procesamiento mayor que las ARN polimerasas eucariotas.

40 El sistema de expresión de pET es un método popular para la expresión génica en procariontes (Studier, Rosenberg *et al.* 1990). Se basa en la expresión de la ARN polimerasa dependiente de la única subunidad T7 ADN de bacteriófago (T7 ARN polimerasa, T7ARNP), el producto del gen 1 de T7, para transcribir los genes de interés modificados genéticamente para ser expresados bajo el control de un activador T7. El sistema de expresión pET se ha adaptado a las células eucariotas y por lo general se denomina ARN polimerasa híbrida. Sin embargo, en un medio eucariótico, la alta actividad enzimática de la ARN polimerasa dependiente de T7 ADN contrasta notablemente con rendimientos muy débiles de traducción de los transcritos de T7 (Fuerst, Niles *et al.* 1986). La ausencia de maduración de los transcritos en células eucariotas, que no son ni modificados por la adición de estructuras con caperuza en su extremo 5' (Benton, Eng *et al.* 1990; Dower y Rosbash 2002), ni muy poliadenilados en su extremo 3' (Mifflin y Kellems 1991; Dower y Rosbash 2002), proporciona una explicación de esta discrepancia.

50 Se han desarrollado por lo tanto procedimientos para mejorar la capacidad de traducción de transcritos sin caperuza producidos por el sistema híbrido, como el sistema de expresión híbrido virus vacunal/ARNP de bacteriófago. Este sistema de expresión eucariota se basa en un virus vacunal recombinante que sintetiza la ARN polimerasa dependiente de T7 ADN bacteriofágico en el citoplasma de células de mamíferos infectadas (Fuerst, Niles *et al.* 1986; Fuerst, Earl *et al.* 1987; Elroy-Stein, Fuerst *et al.* 1989; Fuerst, Fernández *et al.* 1989; Fuerst y Moss 1989; Elroy-Stein y Moss 1990). El gen diana para la ARN polimerasa bacteriofágica, flanqueado por el activador T7 y secuencias de terminación, se introduce en las células infectadas, ya sea por transfección de un plásmido recombinante o por infección con un segundo virus vacunal recombinante (Fuerst, Niles *et al.* 1986; Elroy-Stein, Fuerst *et al.* 1989; Elroy-Stein y Moss 1990). Era de esperar que las enzimas citoplásmicas codificadas por el virus vacunal para la caperuza (en inglés "capping") del ARNm actuarían en los transcritos de T7 para mejorar su capacidad de traducción. Sin embargo, la caperuza de transcritos de T7 permanece por debajo de la óptima (Fuerst y Moss 1989). Por ejemplo, utilizando este sistema de expresión, se descubrió que los transcritos de T7 pueden comprender hasta el 30% de todo el ARN citoplásmico tras un período de 24 horas, pero sólo el 5% -10% de las estructuras con caperuza en el terminal 5' contenidas en transcritos de T7 (Fuerst y Moss 1989). Aunque bastante eficaz, los inconvenientes técnicos del sistema de expresión híbrido virus vacunal/ARNP bacteriofágico restringen claramente su generalización y utilización a gran escala. En primer lugar, este sistema se basa en los virus de las

vacunas recombinantes, que son infecciosos para los seres humanos. Por lo tanto, la manipulación de estos virus recombinantes requiere instalaciones y prácticas de laboratorio específicas. Una cepa aviar atenuada anfitriona de espectro restringido, es decir, la Ankara de la vacuna modificada (MVA), que interrumpe su ciclo de replicación en una etapa de envasado en fase tardía en las células humanas, se puede utilizar para controlar mejor este riesgo (Wyatt, Moss *et al.* 1995; Engleka, Lewis *et al.* 1998). En segundo lugar, la vacuna recombinante o los virus MVA son citotóxicos. Por lo tanto, el sistema de expresión híbrido virus de la vacuna/ARNP de bacteriófago sólo se puede utilizar para la transgenia transitoria (Elroy-Stein, Fuerst *et al.* 1989; Elroy-Stein y Moss 1990). En tercer lugar, el sistema de expresión híbrido virus de la vacuna/ARNP de bacteriófago puede utilizarse fácilmente en algunos modelos celulares que son permisivos a la infección por la vacuna (por ejemplo, BSC-1), mientras que algunos no lo son (por ejemplo, CHO). La inserción del gen CP77 del virus de la viruela en el genoma del virus vacunal recombinante puede superar la restricción del espectro del anfitrión del sistema de expresión híbrido virus de la vacuna/ARNP bacteriofágico de las células de ovario de hámster chino (CHO) al permitir que el virus de la vacuna infecte de manera productiva estas células (Spehner, Gillard *et al.* 1988; Ramsey-Ewing y Moss 1996). En cuarto lugar, debido a la complejidad del sistema, cabe esperar una variabilidad significativa en su eficacia, incluso en el mismo modelo celular. En quinto lugar, el sistema de expresión híbrido virus de la vacunal/ARNP bacteriofágico es una tecnología costosa y laboriosa que por lo tanto es poco apropiada para ensayos a gran escala y producción de proteínas.

En un intento de acoplar la caperuza a la transcripción y por lo tanto para mejorar la capacidad de traducción de transcritos sin caperuza producidos por la T7 ARN polimerasa, esta enzima se ha fusionado con el dominio del terminal carboxilo (DTC) de la subunidad mayor de la ARN polimerasa II (POLR2A), (Natalizio, Robson-Dixon *et al.* 2009). El DTC comprende 25 a 52 repeticiones de heptapéptido de la secuencia consenso ¹YSPTSPS⁷, que está muy conservada en toda la evolución y está sometida a la fosforilación reversible durante el ciclo de la transcripción (Palancade y Bensaude 2003). Cuando está fosforilada, se cree que el DTC actúa como mediador en el acoplamiento de la transcripción y caperuza de las transcripciones nacientes, por unión a una o más subunidades de las enzimas de caperuza del ARNm en levaduras (Cho, Takagi *et al.* 1997; McCracken, Fong *et al.* 1997) y mamíferos (McCracken, Fong *et al.* 1997; Yue, Maldonado *et al.* 1997). Perceptiblemente, la ARN polimerasa II con repeticiones de DTC con Ser⁵-fosforilada se somete a descanso del activador proximal que es coincidente con la caperuza conjunta de la transcripción de los transcritos nacientes (Komarnitsky, Cho *et al.* 2000; Schroeder, Schwer *et al.* 2000). Sin embargo, a diferencia de lo que se podría esperar intuitivamente, la fusión del DTC a la T7 ARN polimerasa unitaria no es suficiente para mejorar la caperuza de sustratos cortados y empalmados tanto constitutiva como alternativamente, *in vivo* (Natalizio, Robson-Dixon *et al.* 2009).

La caperuza es una estructura especializada encontrada en el extremo 5' de casi todos los ARN mensajeros eucariotas. La estructura de caperuza más sencilla, cap0, proviene de la adición de un nucleósido de guanina metilado en N⁷ que está unido por 5'-5' trifosfato unido al extremo del ARN primario (es decir, m⁷GpppN, donde N es cualquier base, p indica un fosfato y m un grupo metilo). La formación del cap0 conlleva una serie de tres reacciones enzimáticas: ARN trifosfatasa (RTPasa) elimina el resto y fosfato del extremo 5' trifosfato de pre-ARNm naciente a difosfato, la ARN guaniltransferasa (GTasa) transfiere GMP desde GTP al terminal de ARN naciente del difosfato, y la ARN N7-guanina-metiltransferasa (N7-MTasa) añade un resto metilo en el nitrógeno 7 de la guanina en la caperuza de GpppN (Furuichi y Shatkin 2000). En los eucariotas superiores y algunos virus, el grupo 2'-hidroxilo de la ribosa del primer (es decir, estructuras cap1; m⁷GpppNm^{2'-O}pN) y segundo (es decir, estructuras cap2; m⁷GpppNm^{2'-O}pNm^{2'-O}) nucleótidos transcritos pueden ser metilados por dos ribosa-2'-O MTasas independientes, denominadas respectivamente MTasas específicas para cap1 y cap2 (Langberg y Moss 1981). Sin embargo, a diferencia de la actividad celular de N7-MTasa que es exclusivamente nuclear, se ha detectado la actividad de cap-1 ribosa-2'-O MTasa tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células HeLa, mientras que la actividad de cap2 MTasa se encuentra exclusivamente en su citoplasma (Langberg y Moss 1981).

La formación de la caperuza m⁷GpppN en el terminal 5' es el primer paso del tratamiento de pre-ARNm. La caperuza m⁷GpppN desempeña funciones importantes en la estabilidad del ARNm y su transporte desde el núcleo al citoplasma (Huang y Steitz 2005; Kohler y Hurt 2007). Además, la caperuza m⁷GpppN en el terminal 5' es importante para la traducción de ARNm a la proteína mediante el anclaje del complejo 4F (eIF4F) del factor de iniciación de la traducción eucariótica, que actúa como mediador en la recuperación del fragmento 16S de la pequeña subunidad ribosómica al ARNm (Furuichi, Lafiandra *et al.* 1977; Gingras, Raught *et al.* 1999; Rhoads 1999). La caperuza m⁷GpppN en el terminal 5' por lo tanto mejora drásticamente la traducción de ARNm tanto *in vitro* (Lo, Huang *et al.* 1998), como *in vivo* (Malone, Felgner *et al.* 1989; Gallie 1991; Lo, Huang *et al.* 1998; Kozak 2005). Por el contrario, los efectos de la 2'-O-metilación sobre la traducción del ARNm parecen depender del tipo de células y de las condiciones de la experimentación (página web Epicentre Biotechnologies; Drummond, Armstrong *et al.* 1985; Kuge, Brownlee *et al.* 1998).

Por tanto, continúa habiendo una necesidad significativa en la técnica para sistemas nuevos y mejorados para la transgenia eficiente en las células eucarióticas, que son apropiadas para la terapia génica y la producción de proteínas a gran escala sin citotoxicidad o citotoxicidad inducida. El presente inventor ha dado un paso importante hacia adelante con la invención dada a conocer en el presente documento.

El propósito de la invención es satisfacer esta necesidad al proporcionar nuevas enzimas híbridas, que hacen que

sea posible resolver en su totalidad o en parte los problemas mencionados anteriormente.

Inesperadamente, el inventor ha demostrado que las enzimas híbridas que comprenden un dominio catalítico de una ARN trifosfatasa, un dominio catalítico de una guanililtransferasa, un dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa, y un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN pueden sintetizar moléculas de ARN con caperuzas m⁷GpppN en el terminal 5', que son muy traducibles por el equipo informático de traducción eucariótico, sin citotoxicidad y mientras que no provoque apoptosis.

Estos resultados son sorprendentes ya que la caperuza de los transcritos T7 continúa por debajo del óptimo con el sistema de expresión híbrido virus vacunal/ARNP de bacteriófago, y no pueden conseguirse por la enzima de fusión DTC-T7 ARN polimerasa.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere a una enzima híbrida que comprende:

- por lo menos un dominio catalítico de una ARN trifosfatasa,
- por lo menos un dominio catalítico de una guanililtransferasa,
- por lo menos un dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa, y,
- por lo menos un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN.

En especial, la enzima híbrida según la invención puede sintetizar moléculas de ARN con caperuzas m⁷GpppN en el terminal 5'.

La enzima híbrida según la invención tiene en especial las siguientes ventajas:

- No hay competencia entre la transcripción de genes endógenos y la transcripción de transgenes;
- No es costosa, es rápida y fácil de realizar y por lo tanto adecuada para ensayos a gran escala y la producción de proteínas;
- A diferencia del sistema de expresión del híbrido virus vacunal/ARNP bacteriofágico, no tiene citotoxicidad obvia o actividades pro-apoptósicas;
- Permite la producción de transcritos de ARN en cualquiera de las especies eucariotas (por ejemplo, levaduras, plantas, roedores, rumiantes lecheros, primates y seres humanos).

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos empleados en la presente memoria tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto en la técnica en cuestión.

Para mayor comodidad, se proporciona el significado de algunos términos y expresiones empleados en la memoria, ejemplos y reivindicaciones.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "enzima híbrida" comprende a la enzima que no es una enzima natural que se encuentra en la naturaleza. Por consiguiente, una enzima híbrida puede comprender dominios catalíticos que provienen de diferentes fuentes (por ejemplo, de diferentes enzimas) o dominios catalíticos provenientes de la misma fuente (por ejemplo, de la misma enzima), pero dispuestos de diferente manera que la encontrada en la naturaleza.

La expresión "enzima híbrida" comprende enzimas monoméricas (es decir, de una sola unidad), pero también enzimas oligoméricas (es decir, de varias unidades), en especial enzimas hetero-oligoméricas.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "enzima monomérica" se refiere a una enzima de una sola unidad que consta de una sola cadena de polipéptido.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "enzima oligomérica" se refiere a una enzima de varias unidades que consta de por lo menos dos cadenas de polipéptidos, unidos entre sí por enlace covalente o no covalente. La expresión "enzima oligomérica" comprende una enzima de varias unidades, en el que por lo menos dos unidades de dicha enzima están unidos entre sí por enlace covalente o no covalente. La expresión "enzima oligomérica" comprende enzima homo-oligomérica que es una enzima de varias unidades que consta solo de un tipo de monómeros (subunidad) y enzima hetero-oligomérica que consta de diferentes tipos de monómeros (subunidades).

En especial, dichos dominios catalíticos de ARN trifosfatasa, de una guanililtransferasa, de una N⁷-guanina-metiltransferasa y de una ARN polimerasa dependiente de ADN están unidas entre sí por enlace covalente y/o no covalente.

En especial, dichos dominios catalíticos de ARN trifosfatasa, de una guanililtransferasa, de una N⁷-guanina-

metiltransferasa y de una ARN polimerasa dependiente de ADN están funcionalmente unidos entre sí para sintetizar moléculas de ARN con caperuzas m⁷GpppN en el terminal 5'.

En especial, la enzima híbrida según la invención que comprende:

- 5
- por lo menos un dominio catalítico de una ARN trifosfatasa,
 - por lo menos un dominio catalítico de una guanililtransferasa,
 - por lo menos un dominio catalítico de una N⁷ guanina-metiltransferasa, y
 - por lo menos un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN;

10 en el que por lo menos dos de dichos dominios catalíticos están unidos entre sí, preferentemente en su extremo (extremo terminal C o N), por enlace covalente o no covalente, más especialmente en el que por lo menos uno de los dominios catalíticos se selecciona en el grupo constituido por:

- 15
- por lo menos dicho dominio catalítico de una ARN trifosfatasa,
 - por lo menos dicho dominio catalítico de una guanililtransferasa, y
 - por lo menos dicho dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa está unido, preferentemente en su extremo (extremo terminal N o C), por enlace covalente o no covalente con
- 20
- por lo menos dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN, preferentemente en su extremo (extremo terminal N o C).

25 En especial, la invención se refiere a la enzima híbrida según la invención que comprende:

- por lo menos un dominio catalítico de una ARN trifosfatasa,
 - por lo menos un dominio catalítico de una guanililtransferasa,
 - por lo menos un dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa, y
 - por lo menos un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN;
- 30

con la excepción de la enzima híbrida que comprende:

- 35
- un dominio catalítico de una ARN trifosfatasa,
 - un dominio catalítico de una guanililtransferasa,
 - un dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa, y
- 40
- sólo dominios catalíticos de ARN polimerasa I, II y/o III dependiente de ADN eucariótico nuclear, y más específicamente, sólo dominio(s) catalítico(s) de la ARN polimerasa II dependiente de ADN.

En especial, la invención se refiere a la enzima híbrida según la invención que comprende:

- 45
- por lo menos un dominio catalítico de una ARN trifosfatasa,
 - por lo menos un dominio catalítico de una guanililtransferasa,
 - por lo menos un dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa, y
 - por lo menos un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN;

50 con la excepción de la enzima híbrida que comprende:

- un dominio catalítico de una ARN trifosfatasa,
 - un dominio catalítico de una guanililtransferasa,
 - un dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa, y
 - dominios catalíticos de ARN polimerasa I, II y/o III dependientes de ADN eucariótico nuclear, más específicamente, por lo menos un dominio catalítico de la ARN polimerasa II dependiente de ADN.
- 55
- 60

En especial, tras la expresión en una célula anfitriona eucariota, dicha enzima híbrida según la invención puede sintetizar moléculas de ARN con caperuzas m⁷GpppN en el terminal 5', que son preferentemente traducibles por el equipo informático de traducción eucariótica.

- 5 En especial, tras la expresión en una célula anfitriona eucariota dichos dominios catalíticos de una ARN trifosfatasa, de una guanililtransferasa y de una N⁷-guanina metiltransferasa pueden añadir una caperuza m⁷GpppN en el extremo del terminal 5' de las moléculas de ARN sintetizadas por dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN y preferentemente dichas moléculas de ARN con caperuza m⁷GpppN en el terminal 5' son traducibles por el equipo informático de traducción eucariótica.
- 10 En especial, tras la expresión en una célula anfitriona eucariota, cuando dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN es un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN de bacteriófago, dichos dominios catalíticos de una ARN trifosfatasa, de una guanililtransferasa y de una N⁷-guanina-metiltransferasa pueden añadir una caperuza m⁷GpppN en el extremo terminal 5' de moléculas de ARN que tienen un ribonucleótido de guanosina en su extremo terminal 5'.
- 15 En especial, tras la expresión en una célula anfitriona eucariota, cuando dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN es un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriano, dichos dominios catalíticos de una ARN trifosfatasa, de una guanililtransferasa y de una N⁷-guanina-metiltransferasa pueden añadir una caperuza m⁷GpppN en el extremo terminal 5' de moléculas de ARN que tienen un de guanosina o adenosina en su extremo terminal 5'.
- 20 En especial, tras la expresión en una célula anfitriona eucariota, cuando dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN es un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN mitocondrial humano o de ratón, dichos dominios catalíticos de una ARN trifosfatasa, de una guanililtransferasa y de una N⁷-guanina-metiltransferasa pueden añadir una caperuza m⁷GpppN en el extremo terminal 5' de moléculas de ARN que tienen un ribonucleótido de adenosina o timidina en sus extremo terminal 5'.
- 25 Como se emplea en la presente memoria la expresión "dominio catalítico" de una enzima se refiere al dominio, que es necesario y suficiente, en especial en su estructura tridimensional, para asegurar la función enzimática. Por ejemplo, un dominio catalítico de una ARN trifosfatasa es el dominio, que es necesario y suficiente para asegurar la función de ARN trifosfatasa. El término "dominio catalítico" abarca el dominio catalítico de la enzima natural o mutante.
- 30 La enzima híbrida según la invención comprende por lo menos dichos dominios catalíticos, pero puede comprender, además, la totalidad o parte de las enzimas que contienen dichos dominios catalíticos. De hecho, según una forma de realización de la enzima híbrida según la invención, dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN puede estar incluido en la totalidad o parte de una ARN polimerasa dependiente de ADN, preferentemente de una ARN polimerasa dependiente de ADN monomérico. Dicho dominio catalítico de una ARN trifosfatasa, dicho dominio catalítico de una guanililtransferasa y dicho dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa también pueden estar incluidos en la totalidad o parte de una enzima de formación de caperuza, preferentemente de una enzima monomérica de formación de caperuza.
- 35 La enzima híbrida según la invención puede ser una enzima nuclear, una enzima con compartimento subcelular o una enzima citoplásmica. Por lo tanto, la enzima híbrida según la invención puede comprender un péptido señal o una señal de marcador bien conocida por un experto en la técnica, que dirige el transporte de la enzima en las células. Por ejemplo, la enzima híbrida según la invención puede comprender una señal de localización nuclear (SLN), que dirige la enzima al núcleo. Dicha SLN es a menudo una unidad que consta de cinco aminoácidos básicos, más cargadas. La SLN se pueden localizar en cualquier parte de la cadena peptídica.
- 40 Preferentemente, la enzima híbrida según la invención es una enzima híbrida citoplásmica. En especial, no comprende el péptido señal o señal del marcador que dirige el transporte de la enzima, excepto al citoplasma.
- 45 La localización citoplásmica de la enzima híbrida según la invención tiene la ventaja de que optimiza los niveles de expresión del transgén, evitando la transferencia activa de grandes moléculas de ADN (es decir, transgenes) desde el citoplasma al núcleo de las células eucariotas y la exportación de moléculas de ARN desde el núcleo al citoplasma.
- 50 Estas enzimas híbridas citoplásmicas según la invención pueden por lo tanto ser útiles para generar un sistema de expresión génica eucariótica independiente del anfitrión, gen que puede actuar en el citoplasma en el que se encuentran por lo general cantidades significativamente mayores de ADN transfectedo en comparación con el núcleo.
- 55 Estas enzimas citoplásmicas híbridas según la invención pueden sintetizar moléculas de ARN con caperuzas m⁷GpppN en el terminal 5', que son muy traducibles por el equipo informático de traducción citoplásmica eucariótica, sin citotoxicidad y mientras que no se produzca apoptosis.
- 60 No hay tampoco competencia entre la transcripción de genes endógenos y la transcripción de transgenes, ya que la transcripción de genes endógenos se produce en el núcleo de las células eucariotas, a diferencia de la transcripción de transgenes, que se produce en el citoplasma.
- 65

La enzima híbrida citoplásmica según la invención es por lo tanto notablemente apropiada para los ensayos a gran escala y la producción de proteínas.

5 En una forma de realización de la enzima híbrida según la invención, dicho dominio catalítico de una ARN trifosfatasa, dicho dominio catalítico de una guanililtransferasa, dicho dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa, están incluidos en un monómero, es decir, en un polipéptido. Por ejemplo, dicho monómero puede ser una enzima monomérica de formación de caperuza o una enzima híbrida monomérica según la invención.

10 En especial, dicho dominio catalítico de una ARN trifosfatasa, dicho dominio catalítico de una guanililtransferasa, y dicho dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa están incluidos en una enzima monomérica de formación de caperuza. En este caso, las enzimas híbridas según la invención comprenden una enzima monomérica de formación de caperuza, que incluye dicho dominio catalítico de una ARN trifosfatasa, dicho dominio catalítico de una guanililtransferasa, y dicho dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa. Dicha enzima monomérica de formación de caperuza puede ser una enzima monomérica de que forma caperuza para virus, en especial, seleccionada en el grupo constituido por la enzima natural que forma caperuza para el virus de la fiebre catarral ovina, la enzima natural que forma caperuza para el virus del mosaico del bambú, la enzima natural que forma caperuza para el virus de la peste porcina africana, la enzima natural que forma caperuza para el mimivirus *Acanthamoeba polyphaga* y mutantes y derivados de las mismas que pueden añadir una caperuza m⁷GpppN en el extremo del terminal 5' de las moléculas de ARN y, más especialmente de la enzima natural que forma caperuza para el virus de la peste porcina africana y mutantes y derivados de la misma que pueden añadir una caperuza m⁷GpppN en el extremo del terminal 5' de las moléculas de ARN, y aún más especialmente de la enzima natural que forma caperuza para el virus de la peste porcina africana.

25 En especial, dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN también puede estar incluido en un monómero, es decir, en un polipéptido. Por ejemplo, dicho monómero puede ser una ARN polimerasa dependiente de ADN monomérico o una enzima híbrida monomérica según la invención.

30 En especial, dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN está incluido en una ARN polimerasa dependiente de ADN monomérico. En este caso, la enzima híbrida según la invención comprende una ARN polimerasa dependiente de ADN monomérico, que incluye dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN. Dicha ARN polimerasa dependiente de ADN monomérico puede ser una ARN polimerasa dependiente de ADN monomérico bacteriofágico, en especial seleccionado del grupo constituido por T7 ARN polimerasa, T3 ARN polimerasa y SP6 ARN polimerasa y mutantes o derivados de las mismas, que pueden sintetizar ARN complementario monocatenario en la secuencia al ADN con plantilla bicatenaria en la dirección 5' → 3', sobre todo de la T7 ARN polimerasa y mutantes o derivadas de los mismas, que pueden sintetizar ARN complementario monocatenario en la secuencia a la plantilla de ADN bicatenario en la dirección 5' → 3'.

40 Dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN y por lo menos uno, preferentemente por lo menos dos y más preferentemente todo el dominio catalítico se selecciona en el grupo constituido por:

- dicho dominio catalítico de una ARN trifosfatasa;
- dicho dominio catalítico de una guanililtransferasa; y
- dicho dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa;

45 pueden estar incluidos en un monómero.

50 La enzima híbrida según la invención puede ser monomérica u oligomérica. De hecho, dichos dominios catalíticos de una ARN trifosfatasa, de una guanililtransferasa, de una N⁷-guanina-metiltransferasa y de una ARN polimerasa dependiente de ADN puede estar incluidos en uno o varios polipéptidos.

Preferentemente, la enzima híbrida según la invención es monomérica.

55 De hecho, el inventor ha demostrado que una enzima híbrida monomérica que comprende un dominio catalítico de una ARN trifosfatasa, un dominio catalítico de una guanililtransferasa, un dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa y un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN pueden sintetizar moléculas de ARN con caperuzas m⁷GpppN en el terminal 5', que son muy traducibles por el equipo informático de traducción eucariótica, sin citotoxicidad y mientras que no provocan apoptosis.

60 No era obvio que la caperuza de los transcritos sucediera bien con una enzima monomérica, debido al impedimento estérico y a los componentes y la enzima, que tienen que permanecer en su configuración natural. De hecho, la enzima de fusión DTC-T7 ARN polimerasa no puede conseguir la caperuza de los transcritos T7, aunque se suponía que desencadenaría caperuza con m⁷GpppN en el extremo terminal 5' de las moléculas de ARN naciente.

65 La enzima híbrida monomérica según la invención tiene, en especial, las ventajas de que no es costosa, es rápida y fácil de elaborar y por lo tanto apropiada en especial para los ensayos a gran escala y la producción de proteínas.

De hecho, la producción de una enzima monomérica es más fácil que la de una enzima oligomérica. También hay ningún problema de montaje de la unidad, ya que sólo hay una sola unidad. La enzima monomérica también es más fácil de manipular que la enzima polimérica.

5 Como se emplea en la presente memoria, la expresión "ARN polimerasa dependiente de ADN" (ARNP) se refiere a nucleotidil transferasas que sintetizan ARN complementario monocatenario en la secuencia a la plantilla de ADN bicatenario en la dirección 5' → 3'.

10 Preferentemente, dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN es un dominio catalítico de una enzima, que tiene una estructura relativamente sencilla y más preferentemente, que tiene elementos genómicos caracterizados de regulación enzimática (es decir, activador, señal de terminación de la transcripción y unión al concatémero). Por lo tanto, en especial, dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN puede ser un dominio catalítico de un ARN polimerasa dependiente de ADN de bacteriófago, de una ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriano o de una ARN polimerasa dependiente de ADN de diversos orgánulos eucariotas (por ejemplo, mitocondrias, cloroplastos y proplástidos).

En una forma de realización, dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN es un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN de bacteriófago.

20 Las ARN polimerasas dependientes de ADN bacteriofágico tienen sobre todo la ventaja de que optimizan los niveles de expresión del transgénico, en especial porque tienen una capacidad mayor de procesamiento que las ARN polimerasas eucariotas. Las ARN polimerasas dependientes de ADN bacteriofágico tienen también una estructura mucho más sencilla que la mayoría de las polimerasas eucariotas nucleares, que tienen estructura compleja con muchas subunidades (por ejemplo, ARN polimerasa II) (Chen y Schneider 2005). La mayoría de las ARN polimerasas dependientes de ADN bacteriofágico caracterizadas hasta ahora son enzimas de una sola subunidad, que no requieren proteínas accesorias para la iniciación, prolongación o terminación de la transcripción (Chen y Schneider 2005). Varias de estas enzimas, que se nombran por los bacteriófagos a partir de los que han sido clonadas, también tienen elementos genómicos de regulación bien caracterizados (es decir, activador, señales de terminación, secuencias que interrumpen la transcripción), que son importantes para la transgenia.

30 Tampoco hay competencia entre la transcripción de genes endógenos y la transcripción de los transgenes. Las enzimas híbridas según la invención, que comprenden restos de ARN-polimerasa dependiente de ADN de bacteriófago permiten la producción de transcritos de ARN en cualquiera de las especies eucariotas (por ejemplo, levadura, roedores y seres humanos). Estos no son costosos, son rápidos y fáciles de elaborar y por lo tanto apropiados para ensayos a gran escala y producciones de proteínas; ello permite la producción de transcritos de ARN en cualquier sistema biológico (por ejemplo, la mezcla de reacción acelular, las células cultivadas y organismos vivos), ya que a diferencia de la ARN polimerasa eucariota tal como la ARN polimerasa II, la mayoría de las ARN polimerasas dependientes de ADN bacteriofágico no requieren factores asociados para la iniciación, prolongación o terminación de la transcripción.

40 Dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico puede ser un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico, en especial, seleccionada en el grupo constituido por la T7 ARN polimerasa natural, la T3 ARN polimerasa natural (secuencia genómica NCBI n° ID. NC_003298; Gen n° ID. 927437; UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. Q778M8), K11 ARN polimerasa natural (NCBI secuencia genómica de K11 ARNP n° ID. NC_004665; Gen n° ID. 1258850; UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. Q859H5), la ϕ A1122 ARN polimerasa natural (secuencia genómica NCBI n° ID. NC_004777; Gen n° ID. 1733944; UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. proteína Q858N4), la ϕ Yeo3-12 ARN polimerasa (genómica secuencia NCBI n° ID. NC_001271; Gen n° ID. 1262422; UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. Q9T145) y la gh-1 ARN polimerasa natural (secuencia genómica NCBI n° ID. NC_004665; Gen n° ID. 1258850; UniProtKB/Swiss-Prot proteína n° ID. Q859H5), la KI-5 ARNP ARN polimerasa natural (secuencia genómica NCBI n° ID. NC_008152; Gen n° ID. 5075932; proteína UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. Q8SCG8) y la SP6 ARN polimerasa natural (secuencia genómica NCBI ID n° NC_004831; Gen n° ID. 1481778; proteína UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. Q7Y5R1) y mutantes o derivados de las mismas, que pueden sintetizar ARN complementario monocatenario en secuencia a la plantilla de ADN bicatenario en la dirección 5' → 3', sobre todo de la T7 ARN polimerasa natural.

55 Como se emplea en la presente memoria, la expresión "T7 ARN polimerasa" se refiere a la T7 ARN dependiente de ADN polimerasa bacteriofágica. Preferentemente, la T7 ARN polimerasa tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. n° 1 (secuencia genómica NCBI n° ID. NC_001604; Gen n° ID. 1261050; UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. P00573) y es una proteína del aminoácido 883 con un peso molecular de 98,8 kDa (Davanloo, Rosenberg *et al.* 1984; Moffatt, Dunn *et al.* 1984).

60 La T7 ARN polimerasa tiene, en especial, la ventaja de que, *in vitro*, la enzima es sumamente procesiva y alarga 240-250 nucleótidos a 37°C en la dirección 5' → 3' (Golomb y Chamberlin 1974; Lyakhov, He *et al.* 1997; Zhang y Studier 1997; Finn, MacLachlan *et al.* 2005). Por otra parte, cuando se expresa en células eucariotas, la T7 ARN polimerasa, sigue estando en gran medida en el citoplasma (Elroy-Stein y Moss 1990; Gao y Huang 1993; Brisson, He *et al.* 1999) y por lo tanto optimiza los niveles de expresión transgénica, evitando la transferencia activa de

grandes moléculas de ADN (es decir transgenes) desde el citoplasma hasta el núcleo de las células eucariotas y la exportación de moléculas de ARN desde el núcleo hasta el citoplasma.

El dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN puede ser el de la T7 ARN polimerasa natural, pero también el de los mutantes de la T7 ARN polimerasa, que pueden sintetizar ARN complementario monocatenario en secuencia a la plantilla de ADN bicatenario en la dirección 5' → 3', incluso con reducida capacidad de procesamiento. Por ejemplo, dichos mutantes pueden seleccionarse en el grupo que comprende R551S, F644A, Q649S, G645A, R627S, I810S, y D812E (Makarova, Makarov *et al.* 1995.), y K631M (Osumi-Davis, de Aguilera *et al.* 1992.; Osumi-Davis, Sreerama *et al.* 1994).

En una forma de realización de la enzima híbrida según la invención, dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN se encuentra extremo en el terminal C con respecto a dicho dominio catalítico de una ARN trifosfatasa, dicho dominio catalítico de una guanililtransferasa, y dicho dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa.

De hecho, cuando el dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN es un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico, en especial, de una ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico seleccionada en el grupo constituido por T7, T3 y SP6-ARN polimerasas, dicho dominio catalítico conserva preferentemente su extremo carboxilo-terminal natural. En especial, el extremo del terminal C de dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN, en especial de una ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico corresponde al extremo del terminal C de dicha enzima híbrida. En especial, cuando la enzima híbrida comprende una ARN polimerasa completa dependiente de ADN de bacteriófago, en especial, de una ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico seleccionada del grupo constituido por T7, T3 y SP6-ARN polimerasas, dicha polimerasa conserva preferentemente su extremo terminal carboxilo natural. En especial, el extremo terminal C de dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN, en especial de una ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico corresponde al extremo terminal C de dicha enzima híbrida. En especial, dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN, en especial, de una ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico seleccionada en el grupo que consiste en T7, T3 y SP6-polimerasas de ARN, está incluida en la totalidad o parte de una ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico y en el que el extremo del terminal C de dicha ARN polimerasa dependiente de ADN de bacteriófago se corresponde con el extremo del terminal C de dicha enzima híbrida.

En una forma de realización de la enzima híbrida según la invención, dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN, especialmente dicho dominio catalítico de un ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico, en concreto, de una ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico seleccionada del grupo constituido por T7, T3 y SP6-ARN polimerasas, se encuentra en el terminal C con respecto a dicho dominio catalítico de una ARN trifosfatasa, dicho dominio catalítico de una guanililtransferasa y dicho dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa.

En otra forma de realización, dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN es un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriano.

Preferentemente dicha ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriano tiene una complejidad moderada de la estructura.

Por ejemplo, dicha ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriano puede ser la ARN polimerasa dependiente de ADN de *E. coli* (secuencia genómica NCBI de la subcepa DH10B de K-12 n° ID. NC_010473), que consta de cuatro subunidades diferentes (subunidad α: rpoA Gen n° ID. 6060938, UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. B1X6E7; subunidad β: rpoB Gen n° ID. 6058462, UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. B1XBY9; subunidad β': rpoC Gen n° ID. 6058956, UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. B1XBZ0; subunidad σ: rpoE Gen n° ID. 6060683, UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. B1XBQ0), que están ensambladas en un complejo de cinco subunidades αββ'σ (Lodish, Berk *et al.* 2008). Los elementos genómicos que participan en la regulación de la actividad enzimática están bien caracterizados, incluyendo activadores de la ARN polimerasa de *E. coli* (Lisser y Margalit, 1993), señales de terminación incluyendo terminadores dependientes e independientes de rho (Platt 1986; Uptain y Chamberlin, 1997), secuencias que detienen la transcripción (Lee, Phung *et al.* 1990).

En otra forma de realización, dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN es un dominio catalítico de una ADN-polimerasa dependiente de ARN de un orgánulo eucariótico, como las mitocondrias, cloroplastos y proplástidos. De hecho, estas polimerasas también pueden tener una estructura relativamente sencilla.

En especial, dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN es un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN mitocondrial.

En especial, dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN puede ser el dominio catalítico de la ARN polimerasa mitocondrial de ratón, que es una proteína unitaria de 120 kDa (n° ID. del gen 216151,

UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. Q8B F1), que comparte homología con las ARN polimerasas bacteriofágicas (Tiranti, Savoia *et al.* 1997). Se necesitan varios factores de transcripción para la iniciación, prolongación o terminación de la transcripción: TFB1M (factor B1 de transcripción mitocondrial, n° ID. 224481 del gen del ratón, UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. Q8JZM0) o TFB2M (factor B2 de transcripción mitocondrial, n° ID. 15278 del gen del ratón, UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. Q3TL26), TFAM (factor A de transcripción mitocondrial; n° ID. 21780 del gen del ratón, UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. P40630) y mTERF (factor de terminación de la transcripción mitocondrial, n° ID. 545725 del gen ratón, UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. Q8CHZ9) para la terminación de la transcripción (Fisher y Clayton 1985; Fisher, Topper *et al.* 1987; Fisher y Clayton 1988; Topper y Clayton 1989; Fernández-Silva, Martínez-Azorín *et al.*, 1997; Prieto-Martin, Montoya *et al.* 2001; McCulloch, Seidel-Rogol *et al.* 2002). Los elementos genómicos involucrados en la regulación de la actividad enzimática de la ARN polimerasa mitocondrial están bien caracterizados, incluyendo dos activadores en las cadenas ligera y pesada del genoma mitocondrial (Ojala, Montoya *et al.*, 1981; Clayton 1991), así como señales de terminación de transcripción (Kruse, Narasimhan *et al.* 1989).

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "ARN trifosfatasa" (RTPasa) se refiere a la enzima, que elimina el resto de fosfato y del extremo 5' del trifosfato del pre-ARNm naciente a difosfato (Furuichi y Shatkin 2000).

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "ARN guanililtransferasa" (GTasa) se refiere a la enzima, que transfiere GMP desde GTP al terminal de ARN naciente del difosfato (Furuichi y Shatkin 2000).

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "N7-guanina-metiltransferasa" (N7-MTasa) se refiere a la enzima, que añade un resto de metilo en el nitrógeno 7 de guanina a la caperuza GpppN (Furuichi y Shatkin 2000).

Dichos dominios catalíticos de una ARN trifosfatasa, de una guanililtransferasa, de una N⁷-guanina-metiltransferasa, puede ser de la misma o de diferentes enzimas que forman caperuza. Si dichos dominios catalíticos son de la misma enzima, dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN es de una enzima diferente.

Preferentemente, dichos dominios catalíticos de ARN trifosfatasa, de una guanililtransferasa, de una N⁷-guanina-metiltransferasa son de una o varias enzimas citoplásmicas, que tienen una estructura relativamente sencilla y ventajosamente actividades enzimáticas bien caracterizados. Por lo tanto, en especial, dichos dominios catalíticos de una ARN trifosfatasa, de una guanililtransferasa, de una N⁷-guanina-metiltransferasa puede ser dominios catalíticos de una o varias enzimas que forma caperuza para virus, o de enzimas que forman caperuza de episomas citoplásmicos.

En una forma de realización, dichos dominios catalíticos de una ARN trifosfatasa, de una guanililtransferasa, de una N⁷-guanina-metiltransferasa son de una o varias enzimas que forman caperuza para virus, en especial, seleccionadas en el grupo constituido por la enzima natural que forma caperuza para el virus de la fiebre catarral ovina, la enzima natural que forma caperuza para el virus del mosaico del bambú, la enzima natural que forma caperuza para el virus de la peste porcina africana, la enzima natural que forma caperuza para el mimivirus *Acanthamoeba polyphaga* y los mutantes o derivados de los mismos que pueden, respectivamente, sacar el resto de fosfato y del extremo 5' trifosfato del pre-ARNm naciente a difosfato o transferir GMP desde GTP al terminal difosfato de ARN naciente o añadir un resto metilo en el nitrógeno 7 de la guanina a la caperuza GpppN, sobre todo de la enzima natural que forma caperuza para el virus de la peste porcina africana.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "enzima que forma caperuza para el virus de la fiebre catarral bovina" se refiere a la enzima que forma caperuza VP4 unitaria del virus de la fiebre catarral bovina (BTV), que es una proteína de 76 kDa (644 aminoácidos; para la secuencia, véase, por ejemplo secuencia genómica n° ID. Y00421 serotipo 10 NCBI BTV; n° ID. del gen 2943157; UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. P07132, D0UZ45, Q5J7C0, Q65751, Q8BA65, P33428, P33429, P33427, C3TUP7, Q8BAD5, C5IWW0, B4E551, Q3KVQ2, Q3KVQ1, Q65732, Q3KVP8, Q3KVP9, Q3KVQ0). Esta enzima que forma caperuza es probable que pueda homodimerizarse mediante la cremallera de leucina se encuentra cerca de su terminal carboxilo (Ramadevi, Rodríguez *et al.* 1998). VP4 catalizan las tres etapas enzimáticas necesarias para síntesis de ARNm de restricción m⁷GpppN: RTPasa (Martínez-Costas, Sutton *et al.* 1998.), GTasa (Martínez-Costas, Sutton *et al.* 1998; Ramadevi, Burroughs *et al.* 1998.) y N7-MTasa (Ramadevi, Burroughs *et al.* 1998).

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "enzima que forma caperuza para el virus del mosaico del bambú" se refiere a ORF1, enzima que protege el ARNm del virus del mosaico del bambú (VMB), que es una proteína de una sola unidad de 155 kDa (1365 aminoácidos; n° ID. NC 001642 de la secuencia genómica cepa BaMV-0 del VMB en NCBI; n° ID. 1497253 del gen; n° ID. Q65005 de UniProtKB/Swiss-Prot). La proteína ORF1 tiene todas las actividades enzimáticas necesarias para generar ARNm con la caperuza m⁷GpppN, es decir RTPasa (Li, Shih *et al.* 2001; Han, Tsai *et al.* 2007), GTasa y N⁷-MTasa (Li, Chen *et al.* 2001; Li, Shih *et al.* 2001). Además, ORF1 tiene actividad de ARN-polimerasa dependiente de ARN, que no es obligatorio para las actividades enzimáticas híbridas según la invención y pueden suprimirse por eliminación de los restos Asp¹²²⁹ Asp¹²¹⁰ de la enzima que protege al ARNm (Li, Cheng *et al.* 1998). Como se emplea en la presente memoria, la expresión "enzima que forma caperuza para el virus de la peste porcina africana" se refiere a la enzima que forma caperuza NP868R (G4R), (ASFV), que es una proteína de una sola unidad de 100 kDa (868 aminoácidos; cepa BA71V con secuencia genómica del ASFV en NCBI n° ID. NC_001659; n° ID. del gen 1488865; n° ID. P32094 de

UniProtKB/Swiss-Prot).

5 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "enzima que forma caperuza para el mimivirus *Acanthamoeba polyphaga*" se refiere a R382, (APMV), que es otra proteína de una sola unidad de 136,5 kDa (1170 aminoácidos; secuencia genómica del APMV en NCBI n° ID. NC_006450; n° ID. del gen 3162607; n° ID. Q5UQX1 de UniProtKB/Swiss-Prot.).

10 En una forma de realización, dichos dominios catalíticos de una ARN trifosfatasa, de una guanililtransferasa, de una N⁷-guanina-metiltransferasa son de una o varias enzimas que forman caperuza para episomas citoplásmicos, como pGKL2. En concreto, dichos dominios catalíticos de una ARN trifosfatasa, de una guanililtransferasa, de una N⁷-guanina-metiltransferasa se incluyen en la totalidad o parte de la enzima que forma caperuza para el episoma pGKL2 extracromosómico de la levadura lineal.

15 Los episomas lineales citoplásmicos son estructuras de ADN bicatenario, que se replican de forma estable en el citoplasma de las varias cepas de levadura (Cong, Yarrow *et al.* 1994). Un prototipo de episoma extracromosómico de levadura lineal, pGKL2 (13457 pb; también denominado pGK12), se ha secuenciado completamente a partir de varias cepas de levadura, incluyendo CB 2359 de *Kluyveromyces lactis* y F102-2 de *Saccharomyces cerevisiae* (Tommasino, Ricci *et al.* 1988.). La enzima que forma caperuza codificada por el gen ORF3 de pGKL2 de *Kluyveromyces lactis* (secuencia genómica pGKL2 de CB 2359 de *Kluyveromyces lactis* n° ID. NC_010187 en NCBI; la UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. P05469) es una proteína de 594 aminoácidos (proteína de 70,6 kDa).

25 En una forma de realización de la enzima híbrida según la invención, por lo menos dos, en especial por lo menos tres y más especialmente un péptido de enlace puede montar, fusionar o unir directa o indirectamente todos los dominios catalíticos.

En especial, por lo menos dos, especialmente por lo menos tres y más especialmente todos los dominios catalíticos se seleccionan en el grupo constituido por:

- 30 - un dominio catalítico de una ARN trifosfatasa,
- un dominio catalítico de una guanililtransferasa,
- un dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa, y
- un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN,

35 están unidos directamente o por un péptido de enlace.

El péptido de enlace tiene la ventaja de generar proteínas de fusión en la que el impedimento estérico está minimizado y se proporciona suficiente espacio para que los componentes de la proteína de fusión permanezcan en su configuración natural.

40 Preferentemente, por lo menos dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN está unido por un péptido de unión a por lo menos uno del dominio catalítico seleccionado en el grupo que consiste en:

- 45 - dicho dominio catalítico de una ARN trifosfatasa;
- dicho dominio catalítico de una guanililtransferasa y
- dicho dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa.

50 Especialmente, el péptido de unión puede estar situado el terminal N con respecto a dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN, en especial, de una ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico seleccionada del en el grupo constituido por T7, T3 y SP6-polimerasas de ARN, y en el terminal C con respecto a dicho dominio catalítico de una ARN trifosfatasa, dicho dominio catalítico de una guanililtransferasa y dicho dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa.

55 En especial, el extremo del terminal N de dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN, en especial, de una ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico seleccionada del grupo constituido por T7, T3 y SP6-polimerasas de ARN, está unido por enlace covalente, en especial, por un péptido de unión, al extremo del terminal C de uno de los dominios catalíticos seleccionados del grupo que consiste en:

- 60 - dicho dominio catalítico de una ARN trifosfatasa,
- dicho dominio catalítico de una guanililtransferasa y
- dicho dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa.

Dicho péptido de unión puede seleccionarse de entre el grupo constituido por:

- 65 - péptidos de fórmula (Gly_mSer_p)_n, en la que:
 - o m representa un número entero de 0 a 12, en especial de 1 a 8, y más especialmente de 3 a 6 y aún más

especialmente 4;

- o p representa un número entero de 0 a 6, en especial, de 0 a 5, más especialmente de 0 a 3 y más especialmente 1; y

5

- o n representa un número entero de 0 a 30, en especial de 0 a 12, más especialmente de 0 a 8 y aún más especialmente entre 1 y 6 inclusive;

10

- péptidos que constan de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEC. ID. n° 2, SEC. ID. n° 3, SEC. ID. n° 4, SEC. ID. n° 5, SEC. ID. n° 6, SEC. ID. n° 7, SEC. ID. n° 8, SEC. ID. n° 9, SEC. ID. n° 10, SEC. ID. n° 11, SEC. ID. n° 12, SEC. ID. n° 13, SEC. ID. n° 14, SEC. ID. n° 15, SEC. ID. n° 16, SEC. ID. n° 17, SEQ ID n° 18.

15

Los péptidos enlazadores flexibles de fórmula $(\text{Gly}_m\text{Ser}_p)_n$ tienen las ventajas de que los restos de glicina confieren flexibilidad peptídica, mientras que la serina proporciona cierta solubilidad (Huston, Levinson *et al.* 1988). Por otra parte, la ausencia de sitios sensibles para quimotripsina I, el factor Xa, papaína, plasmina, trombina y tripsina en las secuencias enlazadoras de $(\text{Gly}_m\text{Ser}_p)_n$ se supone que aumentan la estabilidad general de las proteínas de fusión resultantes (Craeto y Feng 2000) .

20

Para diseñar anticuerpos de fragmentos Fv monocatenarios (sFv) se utilizan frecuentemente enlazadores $(\text{Gly}_m\text{Ser}_p)_n$ de longitudes variables (Huston, Levinson *et al.* 1988). Además, se han utilizado enlazadores $(\text{Gly}_m\text{Ser}_p)_n$ para generar diversas proteínas de fusión, que conservan con frecuencia las actividades biológicas de cada uno de sus componentes (Newton, Xue *et al.* 1996; Lieschke, Rao *et al.* 1997; Shao, Zhang *et al.* 2000; Hu, Li *et al.* 2004).

25

También se pueden considerar otros tipos de enlazadores de péptidos para generar enzimas híbridas según la invención, tales como GGGGIAPSMVGGGG (SEC. ID. n° 2) (Turner, Ritter *et al.* 1997), SPNGASNSGSAPDTSSAPGSQ (SEC. ID. n° 3) (Hennecke, Krebber *et al.* 1998), EGKSSGSGSESKSTE (SEC. ID. n° 4) (Bird, Hardman *et al.* 1988), EGKSSGSGSESKF (SEC. ID. n° 5) (Newton, Xue *et al.* 1996), GGGSGGGSGGTGGGSGGG (SEC. ID. n° 6) (Robinson y Sauer, 1998), GSTSGSGKSSEKKG (SEC. ID. n° 7) (Bedzyk, Weidner *et al.* 1990), YPRSIYIRRRHPSPLTT (SEC. ID. n° 8) (Tang, Jiang *et al.* 1996), GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEC. ID. n° 9) (Whitlow, Bell *et al.* 1993), GSTSGSGKPGSGEGS (SEC. ID. n° 10) (Ting, Kain *et al.* 2001), SSADDAKKDAKKDDAKKDDAKKDA (SEC. ID. n° 11) (Pantoliano, Bird *et al.* 1991), GSADDAXXDAAXKDDAKKDDAKKDG (SEC. ID. n° 12) (Gregoire, Lin *et al.* 1996), LSADDAKKDAKKDDAKKDDAKKDL (SEC. ID. n° 13) (Pavlinkova, Beresford *et al.* 1999), AEAAAKEAAAKEAAKA (SEC. ID. n° 14) (Wickham, Carrion *et al.* 1995), GSHSGSGKP (SEC. ID. n° 15) (Ting, Kain *et al.* 2001), GSTSGSGKPGSGEGSTGAGGAGSTSGSGKPSGEG (SEC. ID. n° 16) (Ting 2003), LSLEVAEEIARLEAEV (SEC. ID. n° 17) (Liu, Jian-Bo *et al.* 2005) y GTPPTPTPTGEGF (SEC. ID. n° 18) (Gustavsson, Lehtio *et al.* 2001).

30

40

Otros tipos de enlace covalente incluyen, pero no se limitan a enlaces disulfuro (Mantile, Fuchs *et al.* 2000), transglutaminación (Paguirigan y Beebe 2007), así como trans-enlaces de proteínas por agentes físicos y/o químicos, por ejemplo, la reticulación por dicloruro de tris(bipiridina)rutenio (II) e iluminación con luz y ultravioleta (Fancy y Kodadek 1999).

45

Dichos dominios catalíticos de una ARN trifosfatasa, de una guaniltransferasa, de una N⁷-guanina-metiltransferasa, y de una ARN polimerasa dependiente de ADN también pueden ser ensamblados por elementos específicos de proteínas, como cremalleras de leucina, como el dominio de biotilación a uno de los dominios catalíticos (por ejemplo, Avi-tag II (Cronan 1990) o PFB-tag (Wu, Yeung *et al.* 2002)) y un dominio de unión de biotina a uno de los demás dominios catalíticos (por ejemplo, Strep-tag II (Schmidt y Skerra 1993) o Nano -tag (Lamia y Erdmann 2004)) en la enzima híbrida según la invención.

50

En una forma de realización de la enzima híbrida según la invención, por lo menos dos de dichos dominios catalíticos se pueden ensamblar, mediante enlace no covalente, en especial mediante cremalleras de leucina.

55

Preferentemente, por lo menos dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN se ensambla mediante un enlace no covalente, en especial mediante cremalleras de leucina, a por lo menos uno de los dominios catalíticos seleccionado del grupo constituido por:

60

- dicho dominio catalítico de una ARN trifosfatasa;
- dicho dominio catalítico de una guaniltransferasa y
- dicho dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa.

65

Las cremalleras de leucina, que son estructuras proteicas dimericas superenrolladas compuestas de dos hélices α anfipáticas que interactúan entre sí, se utilizan comúnmente para homo-o hetero-dimerizar proteínas (O'Shea, Klemm *et al.* 1991). Cada una de las hélices constan de repeticiones de siete aminoácidos, en las que el primer aminoácido (resto a) amino-ácido es hidrófobo, el cuarto (resto d) es por lo general un Leucina, mientras que los demás restos son polares. Las cremalleras de leucina VELCRO ACID-p1 y BASE-p1, que forman estructuras

superenrolladas bicatenarias heterodímeras en paralelo, son muy propensas a formar heterodímeros de proteínas en paralelo (O'Shea, Lumb *et al.* 1993). Ellos se han utilizado para las heterodimerizar proteínas de membrana (Chang, Bao *et al.* 1994; Pashine, Busch *et al.* 2003), así como varias proteínas solubles (Busch, Reich *et al.* 1998; Busch, Pashine *et al.* 2002).

También se pueden considerar otros tipos de dominios de oligomerización de péptidos para generar enzimas híbridas según la invención, para montar por lo menos dos de dichos dominios catalíticos de la enzima híbrida según la invención, especialmente cremalleras de leucina que forman estructuras heteroméricas antiparalelas, tales como las cremalleras de leucina ÁCIDO -a1/BASE-a1 (Oakley y Kim 1998), ÁCIDO-Kg/BASE-Eg (McClain, Woods *et al.* 2001), NZ/CZ (Ghosh, Hamilton *et al.* 2000), ÁCIDO-pLL/BASE-pLL (Lumb y Kim 1995) y EE₁₂₃₄L y RR₁₂₃₄L (Moll, Ruvinov *et al.* 2001). También se pueden utilizar versiones unidas por enlaces disulfuro de cremalleras de leucina para generar enzimas híbridas heterodiméricas superenrolladas unidas por enlaces disulfuro según la invención (O'Shea, Lumb *et al.* 1993), así como puentes disulfuro intercatenarios entre los restos de cisteína en condiciones oxidantes (Wells y Powers 1986).

Por lo menos dos de dichos dominios catalíticos de una ARN trifosfatasa, de una guanililtransferasa, de una N⁷-guanina-metiltransferasa y de una ARN polimerasa dependiente de ADN pueden montarse por lo tanto por cremalleras de leucina, en especial, cremalleras de leucina que forman estructuras heteroméricas antiparalelas, tales como las cremalleras de leucina ÁCIDO-a1/BASE-a1 (Oakley y Kim 1998), ÁCIDO-Kg/BASE-Eg (McClain, Woods *et al.* 2001), NZ/CZ (Ghosh, Hamilton *et al.* 2000), y ÁCIDO-pLL/BASE-PLL, superenrolladas con disulfuro (O'Shea, Lumb *et al.* 1993), así como puentes disulfuro entre restos de cisteína (Wells y Powers 1986).

En una forma de realización, la enzima híbrida según la invención comprende:

- la enzima que forma caperuza para el ARNm del virus de la peste porcina africana o un mutante o un derivado del mismo, que puede añadir una caperuza m⁷GpppN al extremo del terminal 5' de las moléculas de ARN, en especial la enzima natural que forma caperuza para el virus de la peste porcina africana, fusionado a
- el extremo del terminal amino de la T7 ARN polimerasa natural o mutante o derivado de la misma que puede sintetizar ARN complementario monocatenario en la secuencia para la plantilla de ADN bicatenario en la dirección 5' → 3', en especial, la T7 ARN polimerasa natural,

en especial, mediante un enlazador, y más especialmente mediante un enlazador (Gly₃Ser)₄.

En otra forma de realización, la enzima híbrida según la invención comprende:

la enzima natural que forma caperuza para el ARNm del virus de la peste porcina africana o un mutante o un derivado del mismo, que puede añadir una caperuza m⁷GpppN en el extremo del terminal 5' de las moléculas de ARN, en especial la enzima natural que forma caperuza para el virus de la peste porcina africana, fusionada a

el extremo del terminal amino de la T3 ARN polimerasa natural o mutante o derivado de la misma que puede sintetizar ARN complementario monocatenario en secuencia a la plantilla de ADN bicatenario en el 5' → 3' dirección, en especial la T3 ARN polimerasa natural,

en especial, mediante un enlazador, y más especialmente mediante un enlazador (Gly₃Ser)₄.

En otra forma de realización, la enzima híbrida según la invención comprende:

- la enzima natural que forma caperuza para el ARNm del virus de la peste porcina africana o un mutante o un derivado del mismo, que puede añadir una caperuza m⁷GpppN en el extremo del terminal 5' de las moléculas de ARN, en especial de la enzima natural que forma caperuza para el virus de la peste porcina africana fusionado a
- el extremo del terminal amino de la SP6 ARN polimerasa natural o un mutante o un derivado del mismo que puede sintetizar ARN complementario monocatenario en secuencia a la plantilla de ADN bicatenario en la dirección 5' → 3', en especial la SP6 ARN polimerasa natural,

en especial, mediante un enlazador, y más especialmente mediante un enlazador (Gly₃Ser)₄.

En otra forma de realización, la enzima híbrida según la invención comprende

- la enzima natural que forma caperuza para el el ARNm del virus de la peste porcina africana o un mutante o un derivado del mismo, que puede añadir una caperuza m⁷GpppN en el extremo del terminal 5' de las moléculas de ARN, en especial la enzima natural que forma caperuza para el virus de la peste porcina africana, y

- el extremo del terminal amino de la T7 ARN polimerasa natural o mutante o derivado de la misma que puede sintetizar ARN complementario monocatenario en la secuencia para la plantilla de ADN bicatenario en la dirección 5' → 3', en especial la ARN polimerasa T7 natural,

5 montados por cremalleras de leucina.

La enzima híbrida según la invención también puede comprender además un dominio, que aumenta la actividad de por lo menos un dominio catalítico de la enzima híbrida de la invención, en especial, de por lo menos un dominio catalítico seleccionado del grupo constituido por un dominio catalítico de una ARN trifosfatasa, un dominio catalítico de una guanililtransferasa, un dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa y un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN.

Por ejemplo dicho dominio, que aumenta la actividad de por lo menos un dominio catalítico de la enzima híbrida de la invención, puede ser una subunidad de 31 kDa codificada por el gen D12L del virus de la vacuna (secuencia genómica n° ID. NC_006998.1; gen n° ID. 3707515; UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. YP_232999.1), que no tiene actividad enzimática intrínseca, pero aumenta drásticamente la actividad de la ARN N⁷-guanina-metiltransferasa de la subunidad D1R de la enzima que forma caperuza para el ARNm de la vacuna (Higman, Bourgeois, *et al.* 1992; Higman, Christen *et al.* 1994; Mao y Shuman 1994).

20 En una forma de realización, la enzima híbrida de la invención comprende:

- por lo menos un dominio catalítico de la enzima que forma caperuza para el ARNm de la vacuna, en especial, la subunidad de 95 kDa codificada por el gen D1R del virus de la vacuna (secuencia genómica n° ID. NC_006/998.1; gen n° ID. 3707562; UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. YP_232988.1), que tiene actividades enzimáticas de ARN-trifosfatasa, ARN guanililtransferasa y ARN N⁷-guanina-metiltransferasa (Cong y Shuman 1993, Niles y Christen 1993, Higman y Niles 1994, Mao y Shuman 1994; Gong y Shuman 2003);
- por lo menos un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN, en especial, seleccionada del grupo constituido por T7, T3 y SP6- ARN polimerasas y más especialmente la T7 ARN polimerasa; y
- una subunidad de 31 kDa codificada por el gen D12L del virus vacunal,

en especial, montado en su totalidad o en parte por un enlazador, y más especialmente por un enlazador (Gly₃Ser)₄ y/o por cremalleras de leucina.

La invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico aislado o un grupo de moléculas de ácido nucleico aisladas, codificando dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico (s) una enzima híbrida según la invención.

Dicho grupo de moléculas nucleico aislado que codifica una enzima híbrida según la invención comprende o consta de todas las moléculas de ácido nucleico que son necesarias y suficientes para obtener una enzima híbrida según la invención por su expresión.

En una forma de realización, dicho grupo de moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una enzima híbrida según la invención comprende o consiste en:

- una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos un dominio catalítico de una ARN trifosfatasa, por lo menos un dominio catalítico de una guanililtransferasa y por lo menos un dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa; y
- una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN.

En otra forma de realización, dicho grupo de moléculas de ácido nucleico aislado que codifica una enzima híbrida según la invención comprende o consta de:

- una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos un dominio catalítico de una ARN trifosfatasa,
- una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos un dominio catalítico de una guanililtransferasa,
- una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos un dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa; y
- una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN.

En especial, la molécula de ácido nucleico según la invención puede unirse funcionalmente a por lo menos uno,

preferentemente todos los activadores) seleccionado(s) de entre el grupo constituido por:

- un activador para una ARN polimerasa dependiente de ADN eucariota, preferentemente para la ARN polimerasa II; y
- un activador para dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN.

El enlace del ácido nucleico a un activador para una ARN dependiente de ADN polimerasa eucariota, preferentemente para la ARN polimerasa II presenta sobre todo la ventaja de que cuando la enzima híbrida de la invención se expresa en una célula anfitriona eucariota, la expresión de las enzimas híbridas es conducida por la ARN polimerasa eucariota, preferentemente la ARN polimerasa II. Estas enzimas híbridas, a su vez, puede iniciar la transcripción del transgén. Si se utilizan activadores de ARN polimerasa II específicos de tejido, la enzima híbrida de la invención se puede expresar de forma selectiva en los tejidos/células diana.

Dicho activador puede ser un activador constitutivo o un activador inducible bien conocido por un experto en la técnica. El activador puede ser regulado por el desarrollo, inducible o específico de tejido.

La invención también se refiere a un vector que comprende una molécula de ácido nucleico según la invención. Dicho vector puede ser apropiado para la expresión semiestable o estable.

La invención también se refiere a un grupo de vectores que comprenden dicho grupo de moléculas de ácido nucleico aisladas según la invención.

En especial, dicho vector según la invención es un un vector de clonación o de expresión. Los vectores pueden ser vectores víricos como bacteriófagos, o no víricos, tales como vectores plasmídicos.

En una forma de realización, dicho vector según la invención es un vector bicistrónico, que comprende en especial una molécula de ácido nucleico según la invención y un activador para dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN y/o por lo menos una secuencia de ADN de interés, en el que dicha secuencia de ADN está funcionalmente unida a un activador para dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN.

Dicho vector según la invención también puede comprender un activador para dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN.

La invención también se refiere a una célula anfitriona que comprende una molécula de ácido nucleico aislada según la invención o un grupo de moléculas de ácido nucleico aisladas según la invención o un vector según la invención o un grupo de vectores según la invención.

La célula anfitriona según la invención puede ser útil para la producción de proteínas a gran escala.

Preferentemente, dichos dominios catalíticos de la enzima híbrida ADN-polimerasa ARN polimerasa según la invención son de diferentes enzimas que las de la célula anfitriona para evitar la competencia entre la transcripción del gen endógeno y la transcripción del transgén.

La invención también se refiere a un organismo eucariota no humano transgénico, que expresa una enzima híbrida según la invención. Dicho organismo eucariota no humano puede ser de cualquier animal no humano o plantas.

La invención también se refiere a la utilización, en especial *in vitro* o *ex vivo*, de una enzima híbrida según la invención o de una molécula de ácido nucleico aislada según la invención o de un grupo de moléculas de ácido nucleico aisladas según la invención, para la producción de moléculas de ARN con caperuza m⁷GpppN en el terminal 5'.

La invención también se refiere a la utilización *in vitro* o *ex vivo* de una enzima híbrida según la invención o de una molécula de ácido nucleico aislada según la invención o un grupo de moléculas de ácido nucleico aisladas según la invención para la producción de proteínas, en especial proteínas de interés terapéutico como anticuerpos, especialmente en sistemas eucariotas, tales como ensayo de proteínas sintetizadas *in vitro* o en células cultivadas.

La invención también se refiere a un procedimiento, en especial *in vitro* o *ex vivo*, para la producción de una molécula de ARN con caperuza m⁷GpppN en el terminal 5' codificada por una secuencia de ADN, en una célula anfitriona, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de expresar en la célula anfitriona una molécula de ácido nucleico o un grupo de moléculas de ácido nucleico según la invención, en el que dicha secuencia de ADN está funcionalmente unida a un activador para dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN, en especial siendo dicho activador eficaz en dicha célula anfitriona.

Preferentemente, dicho dominio catalítico de la ARN dependiente de ADN-polimerasa de la enzima híbrida según la

invención es de diferentes enzimas que las de la célula anfitriona para evitar la competencia entre la transcripción del gen endógeno y dicha transcripción de la secuencia del ADN.

5 En especial, dicho procedimiento según la invención puede comprender además la etapa de introducir en la célula anfitriona dicha secuencia de ADN y/o el ácido nucleico según la invención, utilizando procedimientos bien conocidos por un experto en la técnica como por transfección utilizando el fosfato de calcio, por electroporación o mezclando un lípido catiónico con ADN para producir liposomas.

10 En una forma de realización, dicho procedimiento según la invención comprende además la etapa de inhibir, en especial silenciar (preferentemente por ARNsi) los mecanismos de transcripción y transcripción celulares de dicha célula anfitriona.

15 En una forma de realización, dicho método según la invención comprende además la etapa de inhibir la expresión de por lo menos una de las subunidades de la ARN polimerasa dependiente de ADN endógeno y/o de la enzima endógena que forma caperuza en dicha célula anfitriona.

20 Dichos etapas adicionales (es decir, la inhibición, en especial, el silenciamiento (preferentemente por ARNsi o ARNsh) de los mecanismos de la transcripción celular y tras la transcripción de dicha célula anfitriona y/o la inhibición de la expresión de una o varias subunidades de la ARN polimerasa dependiente de ADN endógeno y/o de la enzima endógena en dicha célula anfitriona) permiten la optimización de moléculas de ARN con síntesis de caperuzas m⁷GpppN en el terminal 5'.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "ARN polimerasa dependiente de ADN endógeno" se refiere a la ARN polimerasa dependiente de ADN endógeno de dicha célula anfitriona. Cuando la célula anfitriona es una célula eucariota, dicha ARN polimerasa dependiente de ADN endógeno es la ARN polimerasa II.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "enzima que forma caperuza" se refiere a la enzima que forma caperuza de dicha célula anfitriona.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "inhibición de la expresión de una proteína" se refiere a una disminución de por lo menos 20%, especialmente por lo menos 35%, por lo menos 50% y más especialmente por lo menos 65%, por lo menos el 80%, por lo menos 90 % de expresión de dicha proteína. La inhibición de la expresión de la proteína puede determinarse por técnicas bien conocidas para un experto en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a la transferencia Northern, la transferencia Western, RT-RCP.

35 La etapa de inhibición de la expresión de la ARN polimerasa dependiente de ADN endógeno y/o la enzima que forma caperuza en dicha célula anfitriona puede realizarse por cualquiera de las técnicas bien conocidas para un experto en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a técnicas con ARNsi (ARN pequeño de interferencia) que se dirigen a dicha ARN polimerasa dependiente de ADN endógeno y/o la enzima que forma caperuza, técnicas con ARNsh (ARN de horquilla corta) que se dirigen dicho ARN polimerasa dependiente de ADN endógeno y/o la enzima que forma caperuza.

45 Además del ARNsi (o ARNsh; ARN de horquilla corta), podrían considerarse también otras secuencias inhibitorias para el mismo propósito, incluyendo ADN o ARN complementario (Liu y Carmichael, 1994; Dias y Stein 2002), ribozima cabeza de martillo (Salehi-Ashtiani y Szostak 2001), ribozima de horquilla (Lian, De Young *et al.* 1999) o secuencia dirigida al híbrido ARNsn complementario-UI (Fortes, Cuevas *et al.* 2003). Además, pueden considerarse otros genes diana celulares para la inhibición, incluyendo otros genes implicados en la transcripción celular (por ejemplo, otras subunidades de la ARN polimerasa II o factores de transcripción), el tratamiento tras la transcripción (por ejemplo, otra subunidad de la enzima que forma caperuza, así como factores poliadenilación o espliceosomas) y vía de exportación nuclear del ARNm.

50 En una forma de realización del procedimiento según la invención, dicha molécula de ARN puede codificar un polipéptido de interés terapéutico.

55 En otra forma de realización, dicha molécula de ARN puede ser una molécula de ARN no codificado seleccionada del grupo que comprende ARNsi, ribozima, ARNsh y ARN complementario. En especial, dicha secuencia de ADN puede codificar una molécula de ARN seleccionada del grupo constituido por ARNm, ARN no codificado, especialmente ARNsi, ribozima, ARNsh y ARN complementario.

60 La invención también se refiere a la utilización de una enzima híbrida según la invención, tal como una enzima de de restricción y ARN polimerasa dependiente de ADN.

65 La invención también se refiere a un kit para la producción de una molécula de ARN de restricción m⁷GpppN en el terminal 5', que comprende por lo menos una enzima híbrida según la invención, y/o una molécula de ácido nucleico aislada y/o un grupo de moléculas de ácido nucleico según la invención y/o un vector según la invención y/o un grupo de vectores según la invención.

En una forma de realización, el kit de la invención comprende un vector según la invención y/o un grupo de vectores según la invención, en el que dicho(s) vector(es) que comprende(n):

- 5
- un activador para dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN, y/o
 - por lo menos una secuencia de ADN de interés, en donde dicha secuencia de ADN está funcionalmente unida a un activador para dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN.

10 El kit según la invención puede comprender además:

- un vector que comprende un activador para dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN; y/o
- 15
- por lo menos una secuencia de ADN de interés, en el que dicha secuencia de ADN está funcionalmente unida a un activador para dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN.

20 La invención también se refiere a una enzima híbrida según la invención, a una molécula de ácido nucleico aislada según la invención, a un grupo de moléculas de ácido nucleico según la invención o un vector según la invención, para su utilización como medicamento, en especial para la prevención y/o tratamiento de enfermedades humanas o animales, preferentemente por medio de terapia génica.

25 La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una enzima híbrida según la invención, y/o a una molécula de ácido nucleico aislada según la invención y/o a un grupo de moléculas de ácido nucleico según la invención, y/o a un vector según la invención. Preferentemente, dicha composición farmacéutica según la invención se formula en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por un experto en la técnica.

30 La composición farmacéutica según la invención puede comprender además:

- por lo menos una secuencia de ADN de interés, en el que dicha secuencia de ADN está unida funcionalmente a un activador para dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN.

35 Dichos componentes (en especial, seleccionados del grupo constituido por una enzima híbrida según la invención, de una molécula de ácido nucleico aislada según la invención, de un grupo de moléculas de ácido nucleico aisladas según la invención, de un vector según la invención, de un grupo del vector(es) según la invención y por lo menos una secuencia de ADN de interés) puede estar presente en la composición farmacéutica o medicamento según la invención en una cantidad terapéuticamente (activa y en cantidad no tóxica).

40 Dicha cantidad terapéuticamente puede ser determinada por un experto en la técnica mediante análisis de rutina, incluyendo la evaluación del efecto de la administración de dichos componentes en las enfermedades y/o trastornos que se buscan para ser prevenidas y/o tratadas mediante la administración de dicha composición farmacéutica o medicamento según la invención.

45 Por ejemplo, dichas pruebas pueden ser realizarse analizando tanto el efecto cuantitativo como cualitativo de la administración de diferentes cantidades de dichos componentes anteriormente mencionados (en especial, seleccionados del grupo constituido por una enzima híbrida según la invención, una molécula de ácido nucleico aislada según la invención, un grupo de moléculas aisladas según la invención, un vector según la invención, un grupo de vectores según la invención y por lo menos una secuencia de ADN de interés) en un conjunto de marcadores (biológicos y/o clínicos) característicos de los dichas enfermedades y/o de dichos trastornos, en especial, a partir de una muestra biológica de un paciente.

50 La invención también se refiere a un método terapéutico que comprende la administración de una enzima híbrida según la invención, y/o una molécula de ácido nucleico aislada según la invención, y/o un grupo de moléculas de ácido nucleico según la invención y/o un vector según la invención y/o un grupo de vectores según la invención en una cantidad terapéuticamente a un paciente en necesidad del mismo. El método terapéutico según la invención puede comprender además la administración de por lo menos una secuencia de ADN de interés, en el que dicha secuencia de ADN está unida funcionalmente a un activador por dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN, en una cantidad terapéuticamente a un paciente en necesidad de la misma.

55 Dicha enzima híbrida, molécula de ácido nucleico y/o dicho vector según la invención puede administrarse simultáneamente, por separado o sucesivamente de dicha secuencia de ADN de interés, en especial, antes de dicha secuencia de ADN de interés.

65 La invención se refiere también a una composición farmacéutica según la invención para su utilización para la

prevención y/o tratamiento de enfermedades humanas o animales, en especial por medio de la terapia génica.

Dichas enfermedades se pueden seleccionar del grupo constituido por enfermedades, que puede mejorada por la administración de por lo menos dicha secuencia de ADN de interés.

La invención también se refiere a la utilización de una enzima híbrida según la invención, y/o de una molécula de ácido nucleico aislada según la invención, y/o de un grupo de moléculas de ácido nucleico según la invención y/o de un vector según la invención, y/o de un grupo de vectores según la invención para la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de enfermedades humanas o animales, en especial por medio de la terapia génica.

La invención también se refiere a un producto de combinación, que comprende:

- por lo menos una enzima según la invención y/o por lo menos una molécula de ácido nucleico según la invención y/o un grupo de moléculas de ácido nucleico según la invención y/o por lo menos un vector que comprende y/o expresa una molécula de ácido nucleico según la invención y/o un grupo de moléculas de ácido nucleico según la invención; y
- por lo menos una secuencia de ADN de interés, en el que dicha secuencia de ADN está funcionalmente unida a un activador por dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN;

para la administración simultánea, por separado o sucesiva.

Dicha secuencia de ADN de interés puede ser un anti-oncogén (un gen supresor de tumores).

Dicha secuencia de ADN de interés puede codificar un polipéptido de interés terapéutico o un ARN no codificado seleccionados en el grupo que comprende ARNsi, ribozima, ARNsh y ARN complementario.

Dicho polipéptido de interés terapéutico se puede seleccionar de entre, una citocina, una célula o receptor nuclear, un ligando, un factor de coagulación, la proteína CFTR, la insulina, la distrofina, una hormona de crecimiento, una enzima, un inhibidor enzimático, un polipéptido que tiene un efecto antineoplásico, un polipéptido que puede inhibir una infección bacteriana, parasitaria o vírica, en especial el VIH, una infección, un anticuerpo, una toxina, una inmunotoxina, una subunidad de ARN polimerasa II (en especial, la subunidad Rpb1 de ARN polimerasa II, que puede ser inhibida por la toxina α -amanitina) y un marcador.

Preferentemente, el producto de combinación según la invención puede formularse en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización del producto de combinación según la invención, dicho vector se administra antes de dicha secuencia de ADN de interés.

La invención también se refiere a un producto de combinación según la invención, para su utilización para la prevención y/o tratamiento de enfermedades humanas o animales, en especial mediante la terapia génica.

Dichas enfermedades se pueden seleccionar del grupo constituido por enfermedades, que pueden mejorarse mediante la administración de por lo menos una secuencia de ADN de interés, como se describió anteriormente.

Por ejemplo, dichas enfermedades, así como sus subtipos clínicos, biológicos o genéticos, se puede seleccionar del grupo que comprende tipos de cáncer y su predisposición (especialmente cánceres de mama y colorrectal, melanoma), hemopatías malignas (en especial leucemias, linfomas de Hodgkin y no hodgkinianos, linfomas, mieloma), trastornos de la coagulación y hemostasia primaria, hemoglobinopatías (anemia deprimada y especialmente talasemias), trastornos autoinmunitarios (incluyendo el lupus eritematoso diseminado y la esclerodermia), las enfermedades cardiovasculares (en especial, trastornos del ritmo cardíaco y de la conducción, y la miocardiopatía hipertrófica), trastornos metabólicos (especialmente diabetes mellitus de tipo I y tipo II y sus complicaciones, dislipidemia, aterosclerosis y sus complicaciones, mucopolisacaridosis, enfermedades de almacenamiento de glucógeno, fenilcetonuria), trastornos infecciosos (incluyendo el SIDA, hepatitis vírica B, hepatitis vírica C, la gripe y otras enfermedades víricas; botulismo, tétanos y otros trastornos bacterianos; el paludismo y otras enfermedades parasitarias), trastornos musculares (incluyendo la distrofia muscular de Duchenne y la distrofia muscular miotónica de Steinert), enfermedades respiratorias (especialmente la fibrosis quística y la carencia de antitripsina α -1), enfermedades renales (especialmente la enfermedad renal poliquística), las enfermedades hepáticas (incluyendo la cirrosis, la enfermedad de Wilson, la hepatotoxicidad debida a la α -amanitina, hepatotoxicidad relacionada con los fármacos), trastornos colorrectales (incluyendo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa), trastornos oculares especialmente enfermedades retinianas (especialmente la amaurosis de Leber, la retinitis pigmentosa, la degeneración macular por la edad), trastornos del sistema nervioso central (especialmente la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Huntington, la neurofibromatosis, la adrenoleucodistrofia, la enfermedad bipolar, la esquizofrenia y el autismo), y trastornos de la

piel y del tejido conjuntivo (especialmente el síndrome de Marfan y la psoriasis).

En una forma de realización, el producto de combinación de la invención comprende:

- 5 – por lo menos un vector que comprende y expresa una molécula de ácido nucleico según la invención y/o un grupo de moléculas de ácido nucleico según la invención, en el que dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN es un dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico, en especial de una de ARN polimerasa dependiente de ADN de bacteriófago T7; y
- 10 – por lo menos una secuencia de ADN de interés, en el que dicha secuencia de ADN está funcionalmente unida a un activador por dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico, en especial de una ARN polimerasa dependiente de ADN de bacteriófago T7, en la que dicha secuencia de ADN de interés codifica la subunidad Rpb de ARN polimerasa II, que puede ser inhibida por la toxina α -amanitina.
- 15 La invención también se refiere a este producto de combinación para su utilización para la prevención y/o tratamiento de la hepatotoxicidad humana o animal debida a la α -amanitina, por medio de terapia génica.

La invención también se refiere a un procedimiento para producir la enzima híbrida según la invención que comprende la etapa de expresar en por lo menos una célula anfitriona dicha molécula de ácido nucleico o dicho grupo de moléculas de ácido nucleico que codifican la enzima híbrida de la invención en condiciones que permiten la expresión de dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico en dicha célula anfitriona.

La invención también se refiere a un procedimiento para producir la enzima híbrida según la invención comprende las etapas siguientes:

- 25 – expresión de una parte de dicho grupo de moléculas de ácido nucleico que codifica una enzima híbrida de la invención en una primera célula anfitriona en condiciones que permiten la expresión de dichas moléculas de ácido nucleico en dicha célula anfitriona, para obtener una primera parte de la enzima híbrida de la invención;
- 30 – expresión de la otra parte de dicho grupo de moléculas de ácido nucleico que codifica la enzima híbrida de la invención en una segunda célula anfitriona en condiciones que permiten la expresión de dichas moléculas de ácido nucleico en dicha célula anfitriona para obtener una segunda parte de la enzima híbrida de la invención; y
- 35 – montaje de dicha primera parte y dicha segunda parte para obtener la enzima híbrida de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa un ensayo de expresión del gen indicador de luciferasa de luciérnaga, que se utilizó para controlar los rendimientos de traducción desencadenados por una enzima híbrida según la invención, la NP868R-T7ARNP. Los plásmidos pNP868R-T7ARNP o pT7ARNP se co-transfectaron con el plásmido de luciferasa pT7p en las células humanas HEK-293 cultivadas. La expresión de las enzimas NP868R-T7ARNP y T7ARNP es conducida por el activador del CMV dependiente de ARN polimerasa II de los plásmidos correspondientes. Las enzimas NP868R-T7ARNP y T7ARNP, a su vez, cabe esperar que inicien la transcripción en el activador T7 del plásmido pT7p-gen indicador de luciferasa. Si las actividades enzimáticas tanto de la caperuza del ARNm como de ARNP dependiente del ADN de las enzimas NP868R-T7ARNP se conservan, deben sintetizarse ARNm de luciferasa con estructuras de caperuza m⁷GpppGm, que se pueden traducir en la proteína luciferasa de luciérnaga y detectarse por análisis de luminiscencia celular. Por el contrario, cabe esperar que la enzima T7ARNP sintetice moléculas de ARN sin caperuza m⁷GpppN en el terminal 5', que por consiguiente están mal traducidas.

La figura 2 (A-B) representa las cartografías físicas de los plásmidos pNP868R-T7ARNP y pT7ARNP. Las cartografías físicas de (A) plásmido pT7ARNP, que codifica la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico natural, (B) plásmidos pNP868R-T7ARNP, que codifican una fusión entre las enzimas NP868R que forman caperuza para contra el ARNm (virus de la peste porcina africana) y la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico natural (bacteriófago T7), mediante un enlazador flexible (Gly₃Ser)₄. Estos dos plásmidos tienen el mismo diseño: activador de CMV, secuencia Kozak seguida de los marcos abiertos de lectura (ORF) de NP868R-T7ARNP o T7ARNP, señal de poli[A], terminador T Φ de la transcripción de la ARN polimerasa del bacteriófago, y la señal de poliadenilación de SV40.

La figura 3 (A-C) representa las cartografías físicas de los plásmidos deL gen indicador de luciferasa de luciérnaga. (A) pT7p-Luciferasa: se diseñó para ensayar la actividad de las enzimas NP868R-T7ARNP y la T7ARNP. Consta de una serie de activadores de ARN polimerasa (activadores ARNP de los bacteriófagos T7, T3 y SP6, seguido del activador ribosómico rrnDI de *E. coli*), una secuencia de operador Lac, todo el ORF de la luciferasa de luciérnaga, señal de poli[A], una secuencia que codifica la ribozima de la hepatitis D para la autoescisión del ARN y el terminador T Φ en el eje central de pET-22b(+), (B) pT7p-Luciferasa digerido con BamHI: en el que se interrumpe la conexión física entre el ORF de la luciferasa y la serie de activadores por la digestión con enzimas que forman

caperuza. Este plásmido se utilizó como referencia negativa. Las flechas indican los puntos de digestión. (C) pCMV-Luciferasa: en la que todo el ORF de la luciferasa de luciérnaga está bajo el control del activador de CMV. Este plásmido se utiliza como un comparador positivo.

5 La figura 4 (A-C) muestra la expresión del gen indicador de luciferasa de luciérnaga después de transfección del plásmido en las células HEK-293. Las células HEK-293 se cultivaron y transfectaron como se describió anteriormente. Las células se transfectaron ya sea con el pNP868R-T7ARNP o los plásmidos pT7ARNP (0,4 µg de ADN/pocillo y 1µl/pocillo de Lipofectamina 2000), y/o el pT7p-luciferasa, pT7p-luciferasa digerido con BamHI, o pCMV-T7ARNP (0,4 µg de ADN/pocillo y 1 µl/pocillo de Lipofectamina 2000) o ninguno. La luminiscencia de la luciferasa de luciérnaga se ensayó en los tiempos puntuales seleccionados utilizando el Luciferase Assay System (Promega, Madison WI, EE.UU.). Para normalizar la eficiencia de transfección, las células se transfectaron también con el plásmido pORF-eSEAP, que codifica la fosfatasa alcalina placentaria segregada (SEAP) que se ensayó en medio de cultivo celular utilizando el kit de ensayo enzimático colorimétrico Quanti-azul (InvivoGen, San Diego, CA). La expresión del gen indicador se expresó como la luminiscencia de luciferasa en las células estudiadas restada de la luminiscencia en las células tratadas sólo con el reactivo de transfección (URL; unidades relativas de luz), a continuación, dividida por la relación de absorbancia de SEAP (DO, densidad óptica). Se realizaron dos repeticiones independientes de este experimento. Las barras de desviaciones representan la desviación estándar de la media (SEM). Se realizaron análisis estadísticos utilizando la prueba de la t de Student de dos colas. (A) Expresión del gen indicador de luciferasa de luciérnaga en pNP868R-T7ARNP/pT7p-Luciferasa, las células transfectadas con pT7ARNP/pT7p-Luciferasa y pCMV-luciferasa. Células transfectadas con el pNP868R-T7ARNP/pT7p-Luciferasa y los plásmidos pCMV-Luciferasa presentan señales 23 y 33 veces mayores que las células transfectadas junto con pT7ARNP/pT7p-Luciferasa, respectivamente (*p<0,05). (B) Expresión del gen indicador de luciferasa de luciérnaga para las células transfectadas con pT7ARNP/pT7p-Luciferasa, pT7p-luciferasa digerido con pT7ARNP/BamHI (*p<0,05) y otras condiciones de referencia (pT7ARNP solo, pT7p-luciferasa digerido o no solo, o sólo reactivo de transfección). (C) Expresión del gen indicador de luciferasa de luciérnaga para el pNP868R-T7ARNP/pT7p-Luciferasa, pNP868R-T7ARNP/pT7p-luciferasa digeridos con BamHI (*p<0,05) y otras condiciones de referencia (pNP868R-T7ARNP solo, pT7p-luciferasa digerido o no solo, o sólo reactivo de transfección).

La figura 5 (A-C) representa la expresión del gen indicador de luciferasa de luciérnaga de células HEK-293 transfectadas tratadas con α-amanitina. (A) Diagrama esquemático del ensayo. Para el plásmido pCMV-luciferasa (la expresión de la luciferasa es conducida por el activador de CMV dependiente de ARN polimerasa II), se añadió α-amanitina al medio celular (a 0 o 20µg/ml) al mismo tiempo a la transfección celular. Para los plásmidos pNP868R-T7ARNP/pT7p-Luciferasa, una primera transfección con el plásmido pNP868R-T7ARNP (la expresión de NP868R-T7ARNP es conducida por el activador de CMV dependiente de ARN polimerasa II) se llevó a cabo 24 horas antes de la adición de α-amanitina al medio celular (en concentraciones que oscilan entre 0 y 20µg/ml) y una segunda transfección con el plásmido pT7p-luciferasa. Se realizaron dos repeticiones de estos experimentos. Las barras de desviaciones representan la desviación estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó como se describió anteriormente. (B) α-amanitina suprimió casi completamente la expresión del gen indicador de luciferasa de las células transfectadas con el plásmido pCMV-luciferasa; *p<0,05) (C) α-amanitina activó sólo una leve disminución de la señal de la expresión de luciferasa en las células transfectadas con los plásmidos pNP868R-T7ARNP/pT7p-luciferasa (*p<0,05), lo que por consiguiente, sugieren que la transcripción por la enzima NP868R-T7ARNP es dependiente de su resto T7 ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico.

La figura 6 (A-C) representa ensayos de viabilidad celular, citotoxicidad y apoptosis de las células HEK-293 transfectadas. Las células se cultivaron y transfectaron como anteriormente con los plásmidos pNP868R-pT7ARNP o T7ARNP. La viabilidad celular, citotoxicidad y apoptosis se evaluaron en los tiempos puntuales seleccionados utilizando el ensayo ApoTox-Glo Triplex. Se realizaron dos repeticiones de este experimento. Las barras de desviaciones representan la desviación estándar de la media (SEM). Los niveles de viabilidad celular, citotoxicidad y apoptosis se expresaron como la señal de luminiscencia/fluorescencia en las células estudiadas restada de luminiscencia/fluorescencia en las células no tratadas. El análisis estadístico se realizó como anteriormente. El reactivo de transfección (es decir, Lipofectamina 2000), con o sin ADN plásmido, perjudica la viabilidad celular, la citotoxicidad y la apoptosis. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las células transfectadas con el plásmido pNP868R-y el plásmido T7ARNP para (A) los niveles de viabilidad celular, en todos los tiempos puntuales, excepto en el día 1 (prueba de la t de Student de dos colas, *p<0,05), (B) niveles de citotoxicidad en todos los tiempos puntuales, o (C) niveles de apoptosis en todos los tiempos puntuales.

La figura 7 (A-D) representa las cartografías físicas de los plásmidos utilizados para las enzimas monoméricas NP868R-T3ARNP e híbridas NP868R-SP6ARNP. Cartografías físicas de: (A) plásmido pT3ARNP, que codifica el T3 ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico, (B) plásmido pSP6 ARNP, que codifica la SP6 ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico, (C) plásmido pNP868R-T3ARNP, que codifica una fusión entre la enzima que forma caperuza para el ARNm del virus de la fiebre porcina africana NP868R y la T3 ARN polimerasa dependiente del ADN bacteriofágico, mediante enlazador (Gly₃Ser)₄ flexible, (D) plásmido pNP868R-SP6ARNP, que codifica una fusión entre la enzima que forma caperuza para el ARNm del virus de la peste porcina africana NP868R y la SP6 ARN polimerasa dependiente del ADN bacteriofágico, mediante el enlazador (Gly₃Ser)₄ flexible. Estos dos plásmidos tienen el mismo diseño: activador de CMV, secuencia de Kozak seguida por los ORF, señal de poli[A], terminador TΦ para la transcripción de ARN polimerasa bacteriofágica y señal de poliadenilación de SV40.

La figura 8 representa la expresión del gen indicador de la luciferasa por las enzimas monomérica NP868R-T3ARNP e híbrida NP868R-SP6ARNP. La transfección y el ensayo de luciferasa se realizaron como se describió anteriormente. La expresión del gen indicador se expresó como la luminiscencia de la luciferasa en las células estudiadas restada de la luminiscencia en las células tratadas sólo con el reactivo de transfección (ULR, unidades relativas de luz), dividida a continuación por la relación de absorbancia de SEAP (DO, densidad óptica). Se realizaron cuatro repeticiones de este experimento. Las barras de desviaciones representan la desviación estándar de la media (SEM).

La figura 9 (A-C) representa la estructura esquemática de enzimas híbridas heterodimérica y heterotrimérica. (A) Enzima heterodimérica RR₁₂₃₄L-NP868R/EE₁₂₃₄L-T7ARNP. Se añadieron las cremalleras de leucina EE₁₂₃₄L (ácida) y RR₁₂₃₄L (básica) a los extremos de los terminales amino de NP868R y T7 ARN polimerasa, respectivamente, que interactúan para formar un heterodímero; (B) Enzima heterodimérica D12L/D1R-T7ARNP CAPP. La subunidad D1R de la enzima que forma caperuza para el ARNm del virus vacunal se fusiona con el extremo del terminal amino de la T7 ARN polimerasa de una sola unidad. Cuando se expresó junto con la subunidad D12L de la enzima que forma caperuza para el ARNm, D1R-T7ARNP forma un heterodímero denominado D12L/D1R-T7ARNP. Para simplificar, no se muestra el otro montaje, es decir, la enzima híbrida D1R/D12L-T7ARNP; (C) enzima híbrida heterotrimérica D12L/RR₁₂₃₄L-D1R/EE₁₂₃₄L-T7ARNP. Las cremalleras de leucina EE₁₂₃₄L (ácida) y RR₁₂₃₄L (básica) se añadieron a los extremos de los terminales amino de D1R y T7 ARN polimerasa, respectivamente. La coexpresión de RR₁₂₃₄L-D1R junto con EE₁₂₃₄L-T7ARNP y la subunidad D12L de la enzima que forma caperuza para el ARNm del virus vacunal forman un heterotrimero. Para simplificar, no se muestra el otro montaje, es decir, la enzima híbrida D1R/RR₁₂₃₄L-D12L/EE₁₂₃₄L-T7ARNP. Las flechas abiertas indican la unión de la cremallera de leucina en orientación antiparalela. Las flechas negras indican otros tipos de interacción de proteínas.

La figura 10 (A-H) representa cartografías físicas de los plásmidos utilizados para enzimas híbridas heterodiméricas y heterotriméricas. Cartografías físicas de (A) plásmido pD1R, que codifica D1R, la subunidad grande de la enzima que forma caperuza para el ARNm de la vacuna, (B) plásmido pD12L, que codifica el D12L, la pequeña subunidad de la enzima que forma caperuza para el ARNm de la vacuna, (C) plásmido pRR₁₂₃₄L-NP868R, que codifica la cremallera de leucina RR₁₂₃₄L fusionada al extremo del terminal amino de NP868R, la enzima que forma caperuza para el ARNm del virus de la peste porcina africana, (D) plásmido pRR₁₂₃₄L-DLR, que codifica la cremallera de leucina RR₁₂₃₄L fusionado con la extremo del terminal amino de D1R, la subunidad grande de la enzima que forma caperuza para ARNm de la vacuna, (E) plásmido pRR₁₂₃₄L-D12L, que codifica la de cremallera de leucina RR₁₂₃₄L fusionado al extremo del terminal amino de D12L, la subunidad pequeña de la enzima que forma caperuza para el ARNm de la vacuna, (F) plásmido pEE₁₂₃₄L-T7ARN, que codifica la cremallera de leucina pEE₁₂₃₄L fusionado a la T7 ARN polimerasa dependiente del ADN bacteriofágico, (G) plásmido pD1R-T7ARNP, que codifica una fusión entre la subunidad grande de la enzima que forma caperuza para el ARNm de la vacuna y la T7 ARN polimerasa dependiente del ADN bacteriofágico, mediante el enlazador (Gly₃Ser)₄ flexible, (H) plásmido pD12L-T7ARNP, que codifica una fusión entre la subunidad pequeña de la enzima que forma caperuza para el ARNm de la vacuna y T7 ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico, mediante el enlazador (Gly₃Ser)₄ flexible. Todos estos plásmidos tienen el mismo diseño: activador de CMV, secuencia de Kozak seguida de los ORFs, señal de poli[A], terminador TΦ para la transcripción de ARN polimerasa bacteriofágica, y señal de poliadenilación de SV40.

La figura 11 representa la expresión del gen indicador de luciferasa para las enzimas híbridas heterodiméricas RR₁₂₃₄L-NP868R/EE₁₂₃₄L-T7ARNP. Las células HEK-293 se cultivaron y transfectaron como se describió anteriormente. Las células se transfectaron ya sea con los plásmidos correspondientes (0,4 µg de ADN/pocillo y 1 µl/pocillo de lipofectamina 2000) y pT7p-luciferasa, o pCMV-T7ARNP 0,4 µg de ADN/pocillo y 1 µl/pocillo de lipofectamina 2000). La expresión del gen indicador se expresa como la luminiscencia de luciferasa en las células estudiadas restada de la luminiscencia en las células tratadas sólo con el reactivo de transfección (ULR, unidades relativas de luz), dividida a continuación por la relación de absorbancia de SEAP (DO, densidad óptica). Se realizaron cuatro repeticiones de este experimento. Las barras de desviaciones representan la desviación estándar de la media (SEM).

La figura 12 representa la expresión del gen indicador de luciferasa por las enzimas heterodimérica D1R/D12L-T7ARNP e híbrida D12L/D1R-T7ARNP. La transfección y ensayo con luciferasa se realizaron como se describió anteriormente. La expresión del gen indicador se expresa como la luminiscencia de la luciferasa en las células estudiadas restada de la luminiscencia en las células tratadas sólo con el reactivo de transfección (ULR, unidades relativas de luz), dividida a continuación por la relación de absorbancia de SEAP (DO, densidad óptica). Se realizaron dos repeticiones de este experimento. Las barras de desviaciones representan la desviación estándar de la media (SEM).

La figura 13 representa la expresión del gen indicador de la luciferasa por las enzimas heterotrimérica D1R/RR₁₂₃₄L-D12L/EE₁₂₃₄L-T7ARNP e híbrida D12L/RR₁₂₃₄L-D1R/EE₁₂₃₄L-T7ARNP. La transfección y el ensayo con luciferasa se realizaron como se describió anteriormente. La expresión del gen indicador se expresó como la luminiscencia de la luciferasa en las células estudiadas restada de la luminiscencia en las células tratadas sólo con el reactivo de transfección (ULR, unidades relativas de luz), dividida a continuación por la relación de absorbancia de SEAP (DO, densidad óptica). Se realizaron dos repeticiones de este experimento. Las barras de desviaciones representan la

desviación estándar de la media (SEM).

La figura 14 representa la expresión del gen indicador de la luciferasa por las enzimas híbridas monoméricas NP868R-SP6ARNP en presencia de los ARNsi conducidos a la subunidad grande de la ARN polimerasa II (POL2AR) o la enzima que forma caperuza humana (RNGTT). La transfección y el ensayo con luciferasa se realizaron como se describió anteriormente, excepto que los ARNsi a una concentración final 25 nM se añadieron al reactivo de transfección. Los ARNsi SI04364381, SI04369344, SI04250162 y SI04354420 se dirigieron al gen POLR2A, mientras que los ARNsi SI00055986, SI03021508, SI00055972 y SI00055979 se dirigieron a RNGTT. La expresión del gen indicador se expresó como la luminiscencia de la luciferasa en las células estudiadas restada de la luminiscencia en las células tratadas sólo con el reactivo de transfección (ULR, unidades relativas de luz), a continuación, dividida por la relación de absorbancia de SEAP (DO, densidad óptica). Se realizaron dos repeticiones de este experimento. Las barras de desviaciones representan la desviación estándar de la media (SEM).

La figura 15 representa la actividad del efecto de la dosis de los ARNsi conducidos a la subunidad grande de la ARN polimerasa II (POL2AR) y la enzima que forma caperuza humana (RNGTT). La transfección y ensayo de luciferasa se realizaron como se describió anteriormente, excepto que los ARNsi se añadieron a una concentración que oscila entre 0 y 100 nM para el reactivo de transfección. Los ARNsi SI04369344 y SI00055972 se dirigieron a los genes POLR2A y RNGTT, respectivamente. La expresión del gen indicador se expresa como la luminiscencia de la luciferasa en las células estudiadas restada de la luminiscencia en las células tratadas sólo con el reactivo de transfección (ULR, unidades relativas de luz), a continuación, dividida por la relación de absorbancia de SEAP (DO, densidad óptica). Se realizaron tres repeticiones de este experimento. Las barras de desviaciones representan la desviación estándar de la media (SEM).

La presente invención se explicará con detalle con ejemplos a continuación, pero el alcance técnico de la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Ejemplo de enzima híbrida monomérica activa NP868R-T7ARNP

I. Plásmidos

Se ha sintetizado un plásmido, que codifica las fusiones entre NP868R, la enzima que forma caperuza para el ARNm del virus de la peste porcina africana, y la ARN polimerasa dependiente del ADN bacteriofágico natural del bacteriófago T7. La enzima que forma caperuza se fusionó al extremo del terminal amino de la T7 ARN polimerasa mediante un enlazador (Gly₃Ser)₄. El plásmido pNP868R-T7ARNP se utilizó para evaluar la actividad de la enzima codificada por un ensayo de expresión del gen indicador de luciferasa de luciérnaga (figura 1). En resumen, los plásmidos pNP868R-T7ARNP y pT7p-luciferasa se co-transfectaron en las células HEK-293 humanas cultivadas. La expresión de la enzima NP868R-T7ARNP es conducida por el activador de CMV dependiente de la ARN polimerasa II del plásmido correspondiente. La enzima NP868R-T7ARNP, a su vez, cabe esperar que inicie la transcripción del plásmido pT7p-luciferasa en su activador T7. Si se conservan ambas actividades enzimáticas de la enzima NP868R-T7ARNP que forma caperuza para el ARNm y ARNP dependiente del ADN, el ARNm de luciferasa que tiene estructuras con caperuza m⁷GpppGm deben sintetizarse, que a su vez puede traducirse en la proteína luciferasa de luciérnaga y detectarse por el ensayo de luminiscencia celular. Además, el plásmido pNP868R-T7ARNP se utilizó para investigar la distribución celular de la enzima, así como la viabilidad celular, la citotoxicidad y la apoptosis relacionada con la expresión de la enzima en las células HEK-293.

El plásmido que codifica las enzimas NP868R-T7ARNP y T7ARNP (T7 ARN polimerasa) se sintetizó en cuatro etapas por AG GeneArt (Regensburg, Alemania). La secuencia de la proteína codificada por plásmido pT7ARNP corresponde a la SEC. ID. n° 19. La secuencia de la proteína codificada por el plásmido pNP868R-T7ARNP corresponde a la SEC. ID. n° 20. En primer lugar, un fragmento de ADN que contiene el activador de la T7 ARN polimerasa y el sitio de clonación múltiple (MCS) se retiró del plásmido pCMV-Script (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.). En segundo lugar, se introdujo un casete en el plásmido entre su activador de CMV y la señal de poliadenilación de SV40 pCMV-Script. Este casete constaba de la estructura en horquilla del operador Lac (Gilbert y Maxam 1973), un MCS, un poly[A]-tract, y una señal de terminador en horquilla TΦ de clase I (Lyakhov, He *et al.* 1997). En tercer lugar, la secuencia de consenso de Kozak para el inicio de la traducción (Kozak, 1987), seguido por el marco de lectura abierto (ORF) completo de las enzimas NP868R-T7ARNP o T7ARNP se montaron en oligonucleótidos sintéticos utilizando un procedimiento basado en la RCP, se clonaron y se verificó toda la secuencia. El ORF de la NP868R-T7ARNP (SEC. ID. n° 21) y de la ORF de la T7ARNP (SEC. ID. n° 22) se optimizaron alterando la utilización de codones preferidos, eliminando los elementos que actúan en cis tales como sitios de corte y empalme crípticos y señales de poli(A), así como mejorando la estabilidad del ARNm por eliminación de repeticiones directas y elementos con estructura secundaria. En cuarto lugar, la totalidad de los ORFs de cada NP868R-T7ARNP o T7ARNP se subclonaron en el MCS del casete, dando como resultado el plásmido pNP868R-T7ARNP y el plásmido pT7ARNP. Como consecuencia de la estrategia de construcción, se añadieron dos aminoácidos adicionales (Glu, Phe) inmediatamente corriente abajo al ATG de la secuencia de Kozak, se añadieron otros dos inmediatamente corriente arriba del enlazador (Gly₃Ser)₄ (Gly, Pro), y dos inmediatamente corriente abajo

de este enlazador (Leu, Glu) de la enzima NP868R-T7ARNP. Por último, los plásmidos pNP868R-T7ARNP y pT7ARNP tenían el siguiente diseño (figuras 2A y 2B): activador de CMV, secuencia de Kozak seguido por los ORF de NP868R-T7ARNP o T7ARNP, señal de poli[A], terminador T Φ para la transcripción de ARN polimerasa bacteriofágica y la señal de poliadenilación de SV40.

En Eurofins/MWT/Operon (Ebersberg, Alemania) se sintetizaron los plásmidos que codifican el gen indicador de luciferasa de luciérnaga. El plásmido pET-22b(+)-ARNPp-luciferasa (denominado pT7p-luciferasa en lo sucesivo) se diseñó para ensayar la actividad de la enzima híbrida según la invención. Una secuencia de prueba se introdujo en el eje central del pET-22b(+) (Novagen, San Diego, CA, EE.UU.), que consistía en una serie de activadores de ARN polimerasa (activadores de ARNP de los bacteriófagos T7, T3 y SP6, seguido por el activador ribosómico rrnDI de *E. coli*), una secuencia con estructura en horquilla del operador Lac, toda la ORF de la luciferasa de luciérnaga, una señal de poli[A], una secuencia que codifica la ribozima de la hepatitis D para autoescisión del ARN (Conzelmann y Schnell 1994; Garcin, Pelet *et al.*, 1995; Bridgen y Elliott 1996; Schurer, Lang *et al.* 2002; Walker, Avis *et al.* 2003) y el terminador T Φ para la transcripción de la ARN polimerasa del bacteriófago (figura 3A). Una versión del plásmido pT7p-Luciferasa digerida con BamHI, que interrumpe la conexión física entre la ORF de luciferasa y el activador de T7, se utilizó también como referencia negativa (figura 3B). Por otra parte, el plásmido pCMV-luciferasa, que se utilizó como comparador activo, contenía luciferasa de luciérnaga corriente abajo al activador de CMV dependiente de ARN polimerasa II del plásmido pCMV-Script (figura 3C).

II. Cultivo celular y transfección

Células 293 de riñón embrionario humano (HEK-293, ATCC CRL 1573) se cultivaron a 37°C con 5% de CO₂. Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) enriquecido con L-alanil-L-glutamina 3,97 mM (sustituida en base equivalente molar de L-glutamina), 10% de suero bovino fetal (FBS), 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de penicilina y estreptomina y 0,2% de fungizona.

El día antes de la transfección, se sembraron células HEK-293 en placas de 24 pocillos a densidades de aproximadamente 8×10^4 células por pocillo. Una hora antes de la transfección, el medio se cambió a medio completo fresco sin antibióticos. Se realizaron transfecciones con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) según las recomendaciones del fabricante. En resumen, ADN plásmido, diluido en medio de suero reducido con Opti-MEM I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y mezclado con Lipofectamina 2000, se añadió al medio celular. Después de la transfección, las células se incubaron hasta 120 horas antes de la prueba para la expresión del gen indicador de la luciferasa y SEAP.

Las células se transfectaron junto con el pT7ARNP o pNP868R-T7ARNP (0,4 μ g de ADN/pocillo y 1 μ l/pocillo de Lipofectamina 2000), junto con el plásmido indicador pT7p-luciferasa (0,4 μ g de ADN/pocillo y 1 μ l/pocillo de Lipofectamina 2000). Se utilizó una serie de otras condiciones de transfección como referencias negativas e incluía: (a) la misma co-transfección que antes, excepto que el pT7p-luciferasa fue digerido por la enzima que forma caperuza BamHI, lo que interrumpe la conexión física entre el ORF de la luciferasa y el activador de T7, (b) los plásmidos pNP868R-T7ARNP o pT7ARNP solos, (c) el plásmido indicador pT7p-luciferasa digerido o no solo, (d) el reactivo de transfección solo (es decir, Lipofectamina 2000). Las células también se transfectaron con el plásmido pORF-eSEAP (InvivoGen, San Diego, CA; utilizado para normalizar la eficacia de la transfección), así como con el plásmido pCMV-T7ARNP (utilizado como comparador activo).

III. Luminiscencia de la luciferasa de luciérnaga y ensayos colorimétricos con SEAP

La luminiscencia de la luciferasa de luciérnaga se ensayó con el Luciferase Assay System según las recomendaciones del fabricante (Promega, Madison WI, EE.UU.). En resumen, se lisaron células HEK-293 en tampón de lisis Cell Culture Lysis Reagent (CCLR), y después se centrifugaron a $12.000 \times g$ durante 2 minutos a 4°C. Luciferase Assay Reagent (Promega; 100 μ l/pocillo) se añadió al sobrenadante (20 μ l/pocillo). La lectura de luminiscencia se tomó en un lector luminómetro (Fluostar; BMG Labtech, Offenburg, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

Se utilizó la expresión del plásmido pORF-eSEAP para normalizar la eficiencia de la transfección. Este plásmido codifica la fosfatasa alcalina placentaria segregada (SEAP), cuya actividad enzimática se ensayó en el medio de cultivo celular utilizando el kit de ensayo enzimático colorimétrico Quanti-Blue (InvivoGen, San Diego, CA) en los tiempos puntuales seleccionados. La expresión del gen indicador se expresó como la luminiscencia de la luciferasa en las células estudiadas restada de la luminiscencia en las células tratadas sólo con reactivo de transfección (URL; unidades relativas de luz), a continuación, dividida por la relación de absorbancia de SEAP para normalizar la eficacia de transfección (DO, densidad óptica).

IV. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando la prueba de la t de Student de dos colas ajustada por corrección de Holm-Bonferroni para pruebas múltiples, si procede. Un valor p inferior a 0,05 se consideró como significativo.

V. Ensayo de expresión del gen indicador

Se utilizó un ensayo de luminiscencia indicador de luciferasa de luciérnaga para evaluar la traducibilidad del ARNm generado por la enzima híbrida según la invención o la enzima T7ARNP. La cotransfección de los plásmidos pT7ARNP y pT7p-luciferasa activó la señal de expresión de la luciferasa baja pero detectable en comparación con las células cotransfectadas con la versión digerida con pT7ARNP/BamHI del plásmido pT7p-luciferasa (que por lo tanto, demuestran que la expresión de gen indicador de luciferasa es conducida por el activador del bacteriófago T7; figuras 4A y 4B). Esto está de acuerdo con los informes publicados previamente, que han demostrado que la T7ARNP expresada en células eucariotas puede sintetizar moléculas de ARN que están mal traducidas debido a su ausencia de caperuza en 5' (Fuerst, S. *et al.* 1986; Chen, Li *et al.* 1994). También se observó una reducción drástica de la señal de la expresión del gen de luciferasa de luciérnaga cuando la transfección se llevó a cabo sin el plásmido pT7ARNP (lo que confirma que la expresión de luciferasa requiere la presencia de T7ARNP) o el plásmido pT7p-luciferasa (lo que confirma la especificidad de la señal de luminiscencia), o ambas.

El plásmido pNP868R-T7ARNP se transfectó junto con el plásmido de luciferasa-pT7p y se probó en las mismas condiciones que anteriormente. En el máximo, se observó la señal de expresión de luciferasa aproximadamente 23 veces mayor con pNP868R-T7ARNP/pT7p-Luciferasa que con los plásmidos pT7ARNP/pT7p-Luciferasa (figura 4A). La especificidad de los resultados anteriores se confirmó por la co-transfección de la versión digerida con BamHI del plásmido pT7p-luciferasa, así como la transfección por los plásmidos pNP868R-T7ARNP o pT7p-Luciferasa digerido o no solo, lo que dio la señal de expresión luciferasa drásticamente reducida (figura 4C). En el máximo, la cotransfección de los plásmidos pNP868R-T7ARNP/pT7p-Luciferasa dio el 72% de la señal de expresión de luciferasa de la del plásmido pCMV-T7ARNP (figura 4A).

En resumen, se ha demostrado la actividad de la enzima híbrida NP868R-T7ARNP según la invención codificada por el plásmido pNP868R-T7ARNP utilizando un ensayo de luminiscencia indicador de luciferasa de luciérnaga. La especificidad de los presentes descubrimientos se apoya en una serie de controles, lo que sugiere que tanto la caperuza del ARNm como las actividades enzimáticas de ARN polimerasa dependiente del ADN de la enzima NP868R-T7ARNP se conservan cuando se expresan en células HEK-293.

VI. Ensayo de la expresión del gen indicador en células tratadas con α -amanitina

Para demostrar aún más que la transcripción por pNP868R-T7ARNP depende de su resto T7 ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriofágico, también se llevaron a cabo ensayos de transfección génica en células tratadas con α -amanitina. α -amanitina es un inhibidor específico de la ARN nuclear polimerasa II (Jacob, Sajdel *et al.* 1970; Keding, Gniazdowski *et al.* 1970; Lindell, Weinberg *et al.* 1970), que une su subunidad Rpb1 (Bushnell, Cramer *et al.* 2002). Por el contrario, α -amanitina no tiene ningún efecto sobre la transcripción por la ARN polimerasa del bacteriófago T7 que se utilizó para diseñar la enzima híbrida NP868R-T7ARNP según la invención (Kupper, McAllister *et al.* 1973; Engleka, Lewis *et al.* 1998).

Para iniciar la expresión de la enzima NP868R-T7ARNP, que es conducida por el activador de CMV dependiente de ARN polimerasa II, se transfectaron células con el pNP868R-T7ARNP 24 horas antes de la adición de α -amanitina al medio celular (en concentraciones que van de 0 a 20 $\mu\text{g/ml}$) y una segunda transfección con el plásmido pT7p-luciferasa (figura 5A). Para el plásmido pCMV-luciferasa, las células se transfectaron simultáneamente y se trataron con α -amanitina (a 0 o 20 $\mu\text{g/ml}$; figura 5A). La expresión del gen indicador se expresó como la luminiscencia de la luciferasa en las células estudiadas restada de la luminiscencia en las células tratadas sólo con el reactivo de transfección (URL; unidades relativas de luz), dividida a continuación por la relación de absorbancia de SEAP para normalizar la eficacia de transfección (DO, densidad óptica).

Como era de esperar, α -amanitina suprimió casi completamente la expresión del gen indicador de luciferasa de luciérnaga de las células transfectadas con pCMV-luciferasa (figura 5B). Por el contrario, sólo una disminución leve de la expresión de la luciferasa fue desencadenada por la α -amanitina a todas las concentraciones en las células transfectadas con pNP868R-T7ARNP/pT7p-Luciferasa (figura 5C).

Los presentes descubrimientos, confirman por lo tanto que la transcripción por la enzima NP868R-T7ARNP depende de la actividad enzimática de su resto de ARN polimerasa dependiente del ADN del bacteriófago T7.

VII. Inmunofluorescencia

Se investigó la distribución subcelular de la enzima NP868R-T7ARNP por inmunofluorescencia indirecta. Las células HEK-293 se sembraron en placas de 24 pocillos a razón de 8×10^4 células/pocillo, sobre cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina (BD BioCoat; Bioscience, Mississauga, ON EE.UU.), a continuación se transfectaron como se describió anteriormente. Seis y 24 horas después de la transfección, las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS), y después se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Después de la fijación, las células se lavaron con PBS, y a continuación se permeabilizaron durante 30 minutos en PBS que contiene suero de cabra al 5% (Invitrogen), Triton X-100 al 0,1% y azida de sodio al 0,02%. Las células se incubaron

durante la noche a 4°C con el anticuerpo monoclonal de ratón producido contra la T7 ARN polimerasa (1:200, Novagen). Después de un lavado extensivo con PBS, las células se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente con anti-IgG de ratón en cabra (Sigma-Aldrich) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los núcleos celulares se tiñeron con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) durante 5 minutos. Las células se lavaron a continuación y se montaron en el medio anti-desteñido Mowiol 4-88 (Calbiochem, Gibbstown, Nueva Jersey EE.UU.). Las células se analizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia con filtros adecuados.

Como era de esperar, se observó una señal débil pero detectable con FITC a las 6 y 24 horas en el citoplasma de las células transfectadas con el plásmido pNP868R-T7ARNP, mientras que sus núcleos se tiñeron con DAPI.

VIII. Ensayos de viabilidad celular, citotoxicidad y apoptosis

El ensayo ApoTox-Glo Triplex (Promega, Madison WI) se utilizó para investigar si la expresión de la enzima NP868R-T7ARNP perjudica la viabilidad, o provoca toxicidad o apoptosis de las células transfectadas. Se analizaron por fluorescencia dos actividades de la proteasa: una es un marcador de viabilidad celular (es decir, el sustrato del péptido GF-AFC), y el otro es un marcador de citotoxicidad (es decir, el sustrato del péptido bis-AAF-R110). La apoptosis se ensayó mediante el sustrato luminógeno caspasa-3/7, que contiene la secuencia DEVD de tetrapéptido, en un reactivo optimizado para la actividad de la caspasa.

El cultivo de células y transfecciones se realizaron como anteriormente, excepto que las células HEK-293 se sembraron en placas de 96 pocillos a densidades que van de $1,2 \times 10^4$ células por pocillo. Las células se transfectaron con el plásmido pNP868R-T7ARNP, el plásmido pT7ARNP, o sólo reactivo de transfección. El ensayo ApoTox-Glo Triplex se realizó según las recomendaciones del fabricante. En resumen, en tiempos puntuales seleccionados, se añadió a los pocillos el reactivo de viabilidad/citotoxicidad que contiene tanto sustrato GF-AFC como sustratos bis-AAF-R110 y se incubó durante 30 minutos a 37°C, antes de la evaluación de la viabilidad y la citotoxicidad de la fluorescencia a dos series de longitudes de onda diferentes. El reactivo de la caspasa, se añadió a continuación a todos los pocillos, y se midió la luminiscencia después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. El análisis estadístico se realizó como anteriormente. Los niveles de viabilidad celular, citotoxicidad y apoptosis se expresaron como señal de luminiscencia/fluorescencia en las células estudiadas restada de luminiscencia/fluorescencia en las células no tratadas.

Como se informó anteriormente (Patil, Rhodes *et al.* 2004), la viabilidad celular, la citotoxicidad y la apoptosis fueron afectadas de manera significativa en las células tratadas con el reactivo de transfección (es decir, Lipofectamina 2000), en comparación con las células no tratadas (figuras 6A, 6B y 6C). Como también cabía esperar, la viabilidad celular, la citotoxicidad y la apoptosis fueron en general más afectadas cuando se añadió ADN plasmídico a la mezcla de transfección (figuras 6A, 6B y 6C). Sin embargo, en todos los tiempos puntuales estudiados, los marcadores de viabilidad celular, citotoxicidad o apoptosis de las células transfectadas con el plásmido pNP868R-T7ARNP no eran estadísticamente diferentes a los del plásmido pT7ARNP, excepto 24 horas después de la transfección para la viabilidad celular sólo, lo que es debido posiblemente al riesgo solamente (figuras 6A, 6B y 6C, prueba de la t de Student de dos colas para tiempos puntuales individuales, valor $p < 0,05$).

En conclusión, ninguna diferencia obvia en la citotoxicidad, la viabilidad celular y la apoptosis y de la enzima NP868R-T7ARNP se puede demostrar en comparación con T7ARNP, que no tiene actividad enzimática que forma caperuza reconocida.

Ejemplo 2 - Ejemplos de enzimas híbridas monoméricas activas NP868R-T3ARNP y NP868R-SP6ARNP

Se han generado otros dos tipos de enzimas híbridas monoméricas según la invención, que consisten en NP868R, la enzima que forma caperuza para ARNm monomérico del virus de la fiebre porcina africana, fusionado al extremo del terminal amino de las ARN polimerasas dependientes de ADN de bacteriófago monomérico T3 o SP6 natural, mediante el enlazador flexible (Gly₃Ser)₄.

I. Procedimientos

Las secuencias utilizadas para generar dichas enzimas híbridas monoméricas se ensamblaron en oligonucleótidos sintéticos utilizando un procedimiento basado en la RCP, se clonaron y se verificó la secuencia completamente. Estas secuencias se subclonaron en el plásmido pCMV-Script que contiene el casete de subclonación descrito anteriormente. Por último, todos los plásmidos utilizados para la expresión tenían el diseño similar: activador/activador potenciador IE1 de CMV, secuencia de Kozak seguida de los ORF, señal de poli[A], terminador TΦ de la transcripción de ARN polimerasa bacteriofágica y señal de poliadenilación de SV40 y (Figure 7 (A-D)).

Como consecuencia de la estrategia de subclonación, se añadieron aminoácidos inmediatamente corriente abajo del ATG de la secuencia Kozak codificada por los plásmidos (Glu-Phe-Leu-Glu para pT3ARNP y pSP6ARNP; Glu-Phe para pNP868R-T3ARNP y pNP868R-SP6ARNP). Además, se añadieron dos aminoácidos inmediatamente corriente arriba (Gly-Pro para pNP868R-T3ARNP y pNP868R-SP6ARNP) o corriente abajo del enlazador (Gly₃Ser)₄ (Leu-Glu para pNP868R-T3ARNP y pNP868R-SP6ARNP).

Se cultivaron células HEK-293 como se describió anteriormente en placas de 24 pocillos y se transfectaron utilizando el reactivo Lipofectamina 2000, y los plásmidos apropiados (0,4 µg de ADN/pocillo, más 1 µl/pocillo de lipofectamina 2000, por plásmido transfectado). La luminiscencia de la luciferasa de luciérnaga se ensayó como se describió anteriormente utilizando el pT7p-luciferasa (que contiene también ambos activadores T3 y SP6) y el Luciferase Assay System. Se utilizó la expresión del plásmido pORF-eSEAP para normalizar la eficacia de la transfección como se describió anteriormente. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando la prueba de la t de Student de dos colas ajustada por la corrección de Holm-Bonferroni para múltiples pruebas, si procede. Un valor de p inferior a 0,05 se consideró como estadísticamente significativo.

II. Resultados

Como se muestra en la figura 8, cuando se transfectaron junto con el plásmido indicador de luciferasa-pT7p, tanto pNP868R-T3ARNP como NP868R-SP6ARNP muestran una fuerte señal del gen indicador de luciferasa, que era 14 y 56 veces superior que pT3ARNP o pSP6RAP, respectivamente (p<0,001 para cada comparación, la prueba t de Student). La enzima NP868R-T3ARNP tiene 36% de actividad de la del plásmido pCMV-T7ARNP (p <0,001, prueba de la t de Student), mientras que o la enzima heterodimérica NP868R-SP6ARNP presenta 1,1 veces la expresión del gen indicador de luciferasa de la del plásmido pCMV-T7ARNP (diferencia no estadísticamente significativa, prueba de la t de Student).

Estos resultados demuestran la actividad de diferentes tipos de enzimas híbridas monoméricas según la invención.

Ejemplo 3 - Ejemplos de enzimas híbridas diméricas y triméricas activas

Se han generado diferentes tipos de enzimas híbridas oligoméricas activas según la invención como se muestra en la figura 9:

- Una enzima híbrida heterodimérica, que proviene del enlace no covalente entre la enzima que forma caperuza NP868R monomérica contra el ARNm del virus de la peste porcina africana y la T7 ARN polimerasa monomérica, mediante las cremalleras de leucina EE_{1234L} y RR_{1234L}, que forman la enzima híbrida RR_{1234L}-pNP868R/EE_{1234L}-T7ARNP heterodimérica,
- dos enzimas híbridas heterodiméricas, obtenidas por fusión entre cada una de las dos subunidades de la enzima que forma caperuza para el ARNm del virus vacunal (es decir, D1R o D12L) con la T7 ARN polimerasa monomérica, mediante el enlazador flexible (Gly₃Ser)₄. Cada una de las proteínas de fusión se expresan junto con la otra subunidad de la enzima que forma caperuza para el ARNm del virus de la vacuna, con el fin de formar las enzimas híbridas D12L/D1R-T7ARNP y D1R/ D12L-T7ARNP heterodiméricas,
- Dos enzimas híbridas heterotriméricas, que se generan por fusión de las cremalleras de leucina EE_{1234L} y RR_{1234L} a los extremos de los terminales amino a una de las subunidades de la enzima que forma caperuza para el ARNm del virus vacunal y la T7 ARN polimerasa, respectivamente. La expresión de RR_{1234L}-D1R o pRR_{1234L}-D12L, junto con la otra subunidad de la enzima que forma caperuza para el ARNm del virus vacunal, más EE_{1234L}-T7ARNP, forman las enzimas híbridas D1R/RR_{1234L}- D12L/EE_{1234L}-T7ARNP y D12L/RR_{1234L}-D1R/EE_{1234L}-T7ARNP heterotriméricas.

I. Procedimientos

Las secuencias utilizadas para generar las enzimas híbridas se montaron en oligonucleótidos sintéticos utilizando un procedimiento basado en la RCP, se clonaron y se verificó toda la secuencia. Estas secuencias se subclonaron en el plásmido pCMV-Script con el casete de subclonación descrito anteriormente. Por último, todos los plásmidos utilizados para la expresión tenían el diseño similar: activador/activador potenciador IE1 de CMV, secuencia de Kozak seguida de los marcos de lectura abiertos (ORF), señal de poli[A], terminador TΦ de la transcripción de la ARN polimerasa de bacteriófago y señal de poliadenilación de SV40 (figura 10 (A-H)).

Como consecuencia de la estrategia de subclonación, se añadieron inmediatamente corriente abajo dos aminoácidos al ATG de la secuencia de Kozak de algunos plásmidos (Leu-Glu para pT7ARNP; Glu-Phe para pNP868R, pD1R, pD12L, pd1R-T7ARNP y pD12L -T7ARNP), inmediatamente corriente abajo de las secuencias de cremallera de leucina (Leu-Glu para pEE_{1234L}-T7ARNP; Glu-Phe para pRR_{1234L}-NP868R, pRR_{1234L}-D1R y pRR_{1234L}-D12L), y en el extremo del terminal carboxilo de algunas proteínas codificadas (Gly-Pro para pNP868R, pRR_{1234L}-NP868R, PD1R, pD12L, pRR_{1234L}-D1R y pRR_{1234L}-D12L). Además, se añadieron inmediatamente dos aminoácidos corriente arriba (Gly-Pro para pD1R-T7ARNP y pD12L-T7ARNP) o corriente abajo al enlazador (Gly₃Ser)₄ (Leu-Glu para pD1R-T7ARNP y pD12L-T7ARNP).

Como se describió anteriormente, las células 293 de riñón embrionario humano (HEK-293) se cultivaron en placas de 24 pocillos. Las células HEK-293 se transfectaron utilizando el reactivo lipofectamina 2000, y los plásmidos apropiados (0,4 µg de ADN/pocillo, más 1 µl/pocillo de lipofectamina 2000, por plásmido transfectado) como se

describió anteriormente. La luminiscencia de la luciferasa luciérnaga se ensayó como se describió anteriormente utilizando el plásmido indicador pET-22b(+)-T7ARNPp-luciferasa (denominado pT7p-luciferasa en lo sucesivo) y el Luciferase Assay System. La expresión del plásmido pORF-eSEAP se utilizó para normalizar la eficacia de la transfección como se describió anteriormente.

La expresión del gen indicador se expresa como la luminiscencia de la luciferasa en las condiciones estudiadas restada de la luminiscencia en las células tratadas sólo con el reactivo de transfección (ULR, unidades relativas de luz), dividida a continuación por la relación de absorbancia de SEAP (DO, densidad óptica). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando la prueba de la t de Student de dos colas ajustada por la corrección de Holm-Bonferroni para múltiples pruebas, si procede. Un valor de p inferior a 0,05 se consideraba estadísticamente significativo.

II. Resultados

II.1 Enzima híbrida RR₁₂₃₄L-NP868R/EE₁₂₃₄L-T7ARNP heterodimérica

Se ha demostrado la actividad de la enzima híbrida RR₁₂₃₄L-NP868R/EE₁₂₃₄L-T7ARN heterodimérica (codificada por los plásmidos pRR₁₂₃₄L-pNP868R y pEE₁₂₃₄L-T7ARNP, respectivamente). Esta enzima heterodimérica se genera mediante un enlace no covalente entre el pNP868R de la enzima que forma caperuza monomérica contra el ARNm del virus de la peste porcina africana y la T7 ARN polimerasa monomérica, mediante las cremalleras de leucina EE₁₂₃₄L y RR₁₂₃₄L (figura 9). La EE₁₂₃₄L (cremallera de leucina ácida; LEIEAAFLEQENTALETEVAELEQEVQRLENIVSQYETRYGPLGGGK, código de aminoácidos de una letra) y la cremallera de leucina RR₁₂₃₄L (cremallera de leucina básica con una ligera modificación de la orientación de GGGK, que no está implicada en la dimerización de la cremallera de leucina (Moll, Ruvinov *et al.* 2001); LEIRAAFLRRRNTALRTRVAELRQRVQRLRNIVSQYETRYGPLGGGK, código de aminoácidos de una letra), que se añadieron respectivamente al extremo del terminal amino de NP868R y T7ARNP, respectivamente. Las cremalleras de leucina RR₁₂₃₄L y EE₁₂₃₄L son estructuras superenrolladas de péptidos diméricos que consisten en dos hélices α anfipáticas que se funden preferentemente en forma de heterodímero en orientación antiparalela (Moll, Ruvinov *et al.* 2001).

Como era de esperar, la transfección del plásmido que codifica la enzima que forma caperuza sola contra el ARNm del virus de la peste porcina africana con o sin secuencias de la cremallera de leucina (es decir, pRR₁₂₃₄L-NP868R y pNP868R, respectivamente) no producen ninguna expresión del gen indicador de luciferasa detectable (figura 11). Como también era de esperar, las células transfectadas con el plásmido que codifica la T7 ARN polimerasa con la cremallera de leucina EE₁₂₃₄L (codificada por pEE₁₂₃₄L-T7ARN) muestran una actividad muy similar a la T7 ARN polimerasa sin cremallera de leucina (codificada por pT7ARN), que proporcionan más pruebas de que el extremo del terminal amino natural de la T7 ARN polimerasa puede modificarse sin deterioro importante de su procesividad enzimática.

Las células HEK293 transfectadas junto con los plásmidos pRR₁₂₃₄L-NP868R y pEE₁₂₃₄L-T7ARN (que codifican a NP868R y T7ARNP con cremalleras de leucina), junto con el plásmido indicador pT7p-luciferasa, muestran una fuerte señal de la expresión del gen indicador de luciferasa, que es 87% con respecto a la del plásmido pCMV-T7ARNP (diferencia estadísticamente no significativa, prueba de la t de Student; figura 11). Además, las células transfectadas en presencia del plásmido indicador pT7p-luciferasa junto con los plásmidos pRR₁₂₃₄L-NP868R y pEE₁₂₃₄L-T7ARN, presentan 3,7 veces mayor expresión del gen indicador luciferasa que las células transfectadas junto con pNP868R y pT7ARNP (que codifican a NP868R y T7ARNP sin cremalleras de leucina, p <0,05, prueba de la t de Student).

Estos resultados demuestran la actividad de enzimas híbridas heterodiméricas según la invención y que el enlace no covalente entre NP868R y T7ARNP por cremalleras de leucina aumenta significativamente la expresión del gen indicador conducida por dichas enzimas híbridas.

II.2 Enzimas híbridas D1R/D12L-T7ARNP y D12L/D1R-T7ARNP heterodiméricas

Se ha demostrado también la actividad de otros tipos de enzima híbrida heterodimérica, utilizando la enzima que forma caperuza para el ARNm de la vacuna.

Por sí misma, la enzima que forma caperuza para el ARNm de la vacuna es un heterodímero que consta de: (i) una subunidad de 95 kDa codificada por el gen D1R del virus de la vacuna (secuencia genómica n° ID. NC_006998,1; gen n° ID. 3707562; UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. YP_232988.1), denominado en adelante D1R, que tiene actividades enzimáticas de ARN-trifosfatasa, ARN guanililtransferasa y ARN N7-guanina-metiltransferasa (Cong y Shuman 1993, Niles y Christen 1993, Higman y Niles 1994, Mao y Shuman 1994; Gong y Shuman 2003), (ii) y una subunidad de 31 kDa codificada por el gen D12L del virus vacunal (secuencia genómica n° ID. NC_006998,1; gen n° ID. 3707515; UniProtKB/Swiss-Prot n° ID. YP_232999.1), denominado en lo sucesivo D12L, que no tiene actividad enzimática intrínseca, pero aumenta drásticamente la actividad de ARN N7-guanina-metiltransferasa de la subunidad D1R (Higman, Bourgeois, *et al.*, 1992; Higman, Christen *et al.* 1994; Mao y Shuman 1994).

D1R o D12L se fusionaron al extremo del terminal amino de la T7 ARN polimerasa, mediante el enlazador (Gly₃Ser)₄ (codificada por D1R-T7ARNP o D12L-T7ARNP, respectivamente). Cuando se coexpresaron, cada una de las proteínas de fusión, junto la otra subunidad enzima que forma caperuza para el ARNm de la vacuna (codificada por pD12L o D1R, respectivamente), generan dos enzimas híbridas heterodiméricas diferentes denominadas D12L/D1R-T7ARNP y D1R/D12L-T7ARNP, respectivamente (figura 9). En presencia del plásmido indicador pT7p-luciferasa, las enzimas híbridas heterodiméricas generan una señal fuerte de un gen indicador de luciferasa en células HEK293 (figura 12). La enzima híbrida D12L/D1R-T7ARNP heterodimérica tiene una 32% de actividad con respecto a la del plásmido pCMV-T7ARNP ($p < 0,01$, prueba de la *t* de Student), mientras que la enzima D1R/D12L-T7ARNP heterodimérica tiene 1,5 veces mayor expresión del gen indicador luciferasa que el plásmido pCMV-T7ARNP (diferencia no estadísticamente significativa, prueba de la *t* de Student). Además, la expresión conjunta de las dos subunidades de la enzima que forma caperuza para el ARNm de la vacuna no unidas a la T7 ARN polimerasa (codificada por pD1R, pD12L y pT7ARNP) presenta 9 y 42 veces menor señal de expresión del gen indicador de luciferasa que las enzimas híbridas D12L/D1R-T7ARNP y D1R/D12L-T7ARNP heterodiméricas, respectivamente ($P < 0,05$ para ambas comparaciones estadísticas, prueba de la *t* de Student).

Estos resultados demuestran la actividad de diferentes tipos de enzimas híbridas heterodiméricas según la invención y que el enlace covalente entre las subunidades de la enzima que forma caperuza para ARNm de la vacuna y T7ARNP estimula significativamente la expresión del gen indicador. Como también era de esperar, en presencia del plásmido indicador pT7p-luciferasa, la expresión de D1R y/o D12L sin T7 ARN polimerasa no produce prácticamente ninguna expresión de la luciferasa detectable.

II.3 Enzimas híbridas D12L/RR₁₂₃₄L-D1R/EE₁₂₃₄L-T7ARNP y D1R/RR₁₂₃₄L- D12L/EE₁₂₃₄L-T7ARNP heterotriméricas

También se ha demostrado la actividad de la enzima híbrida heterotrimérica.

La cremallera de leucina básica RR₁₂₃₄L se fusionó a los extremos de los terminales amino de cualquiera de las subunidades D1R o D12L de la enzima que forma caperuza para ARNm del virus vacunal (codificado por pRR₁₂₃₄L-DLR y RR₁₂₃₄L-D12L, respectivamente), mientras que la cremallera de leucina EE₁₂₃₄L ácida complementaria se añadió al extremo del terminal amino de la T7 ARN polimerasa (codificada por el plásmido pEE₁₂₃₄L-T7ARN). La expresión de pEE₁₂₃₄L-T7ARNP, junto con cualquiera de pRR₁₂₃₄L-D1R o pRR₁₂₃₄L-D12L, más la otra subunidad de la enzima que forma caperuza para el ARNm de la vacuna (plásmidos pD12L y pD1R, respectivamente), por lo tanto generan dos enzimas CCPP heterotriméricas diferentes, denominadas D12L/RR₁₂₃₄L-D1R/EE₁₂₃₄L-T7ARNP y D1R/RR₁₂₃₄L-D12L/EE₁₂₃₄L-T7ARNP, respectivamente (figura 9).

La T7 ARN polimerasa presentó 7 veces mayor señal del gen indicador de luciferasa cuando se expresó junto con las subunidades D1R/D12L de la enzima que forma caperuza para el ARNm del virus de la vacuna que en su ausencia. Estos resultados están por lo tanto, en línea con los obtenidos por el sistema de expresión híbrido virus vacunal/ARNP bacteriofágico, en el que la traducibilidad de los transcritos T7 sin restricción aumenta por la expresión de la enzima que forma caperuza para ARNm de la vacuna proporcionada por un virus recombinante (Fuerst, Niles *et al.* 1986; Fuerst, Earl *et al.* 1987; Elroy-Stein, Fuerst *et al.* 1989; Fuerst, Fernández *et al.* 1989; Fuerst y Moss 1989; Elroy-Stein y Moss 1990).

Una señal fuerte del gen indicador de luciferasa se muestra en las células HEK-293 que expresan las enzimas CCPP D1R/RR₁₂₃₄L-D12L/EE₁₂₃₄L-T7ARNP o la D12L/RR₁₂₃₄L-D1R/EE₁₂₃₄L-T7ARNP, en presencia del plásmido pT7p-luciferasa indicador (figura 13). Las enzimas híbridas D12L/RR₁₂₃₄L-D1R/EE₁₂₃₄L-T7ARNP y D1R/RR₁₂₃₄L-D12L/EE₁₂₃₄L-T7ARNP heterodiméricas tienen respectivamente 57% y 33% de actividad con respecto a la del plásmido pCMV-T7ARNP (diferencia estadísticamente no significativa, prueba de la *t* de Student). Las enzimas híbridas D12L/RR₁₂₃₄L-D1R/EE₁₂₃₄L-T7ARNP y D1R/RR₁₂₃₄L-D12L/EE₁₂₃₄L-T7ARNP heterodiméricas muestran, respectivamente, 11 y 6,7 veces más fuerte la señal de expresión del gen indicador de la luciferasa que las células que expresan D1, D12L y T7ARNP sin cremalleras de leucina ($p = 0,05$ y diferencia estadísticamente no significativa, respectivamente; prueba de la *t* de Student).

Estos resultados demuestran la actividad de las enzimas híbridas heterotriméricas según la invención y que el enlace no covalente entre cualquiera de las subunidades de la enzima que forma caperuza para ARNm de la vacuna y la T7 ARN polimerasa aumenta significativamente la expresión del gen indicador.

III. Conclusión

Estos resultados muestran la actividad de diferentes tipos de enzimas híbridas heterodiméricas y heterotriméricas según la invención, generadas por enlace covalente o no covalente.

Los presentes resultados también proporcionan pruebas de que el enlace covalente o no covalente entre el dominio catalítico diferente de la enzima híbrida y, en especial, entre las enzimas que forman caperuza y ARN polimerasas permite la optimización de la expresión del gen indicador por las enzimas híbridas.

Ejemplo 4 - Estimulación de la expresión del gen indicador de luciferasa por silenciamiento de secuencias contra la ARN polimerasa II celular y la enzima que forma caperuza

I. Procedimientos

Se cultivaron células HEK-293 como se describió previamente en placas de 24 pocillos y se transfectaron utilizando el reactivo Lipofectamina 2000, y la concentración apropiada de ARNsi (Qiagen, Hilden, Alemania) y plásmidos (0,4 µg de ADN/pocillo, más 1 µl/pocillo de lipofectamina 2000, por plásmido transfectado). La enzima híbrida NP868R-SP6, que tiene una fuerte actividad demostrada, se utilizó en el presente experimento. La luminiscencia de la luciferasa de luciérnaga se ensayó como se describió anteriormente utilizando el pT7p-luciferasa (que también contiene ambos activadores T3 y SP6) y el Luciferase Assay System. Se utilizó la expresión del plásmido pORF-eSEAP para normalizar la eficacia de la transfección como se describió anteriormente.

Se utilizaron cuatro ARNsi que se dirigen a la POLR2A humana (gen NCBI n° ID. 5430; secuencias de ARNm n° ID. NM 000937,4; secuencia de proteína NCBI n° ID .NP_000928.1): SI04364381 (secuencia de ARNm 1255-1275: CAGCGGTTGAAGGGCAAGGAA), SI04369344 (secuencia de ARNm 830-850: ATGCGGAATGGAAGCACGTTA), SI04250162 (secuencia de ARNm 2539-2559: ATGGTCGTGCCGAGCTAAA) y SI04354420 (secuencia de ARNm 4896-4916: CAGCGGCTTCAGCCAGGTTA).

Además, se utilizaron cuatro ARNsi que se dirigen a la RNGTT humana (gen n° ID. 8732; secuencia de ARNm n° ID. NM_003800.3; secuencia de proteína NCBI n° ID. NP_003791.3): SI00055986 (secuencia de ARNm 3187-3207: ATGGATTTAAAGGGCGGCTAA), SI03021508 (secuencia de ARNm 430-450: TTCAAGGTTCTATGACCGAAA), SI00055972 (secuencia de ARNm 2530-2550: CAGGGTTGTTAAGTTGTTACTA) y SI00055979 (secuencia de ARNm 4132-4152: TACCATCTGCAGTATTATAAA).

II. Resultados

En una primera serie de experimentos, los efectos de cuatro ARNsi de POLR2A y cuatro ARNsi de RNGTT se ensayaron a una concentración final de 25 nM (figura 14). Los ARNsi se transfectaron junto con el plásmido de la enzima híbrida pNP868R-SP6ARNP y el plásmido pT7p-luciferasa indicador. En conjunto, la tendencia de ARNsi de POLR2A a aumentar la expresión del gen indicador de luciferasa en un 127%, de promedio, en comparación con la misma condición, sin ARNsi. Del mismo modo, la adición del ARNsi de RNGTT aumentó en conjunto la expresión del gen indicador de la luciferasa en un 147% de promedio en comparación con la misma condición sin ARNsi.

Los ARNsi SI04369344 de POLR2A y SI00055972 de RNGTT, que han mostrado la tasa de estimulación más alta, se seleccionaron para una segunda serie de experimentos. Se ensayó la expresión del gen indicador de luciferasa conducido por NP868R-SP6ARNP en presencia de ARNsi a concentraciones que van de 0 a 100 nM (figura 15). Se observó la respuesta a la dosis con ambos ARNsi. La estimulación de la expresión más fuerte de 3,8 veces se observó a 100 nM con el ARNsi SI04369344 de POLR2A, y de 5,1 veces con el SI00055972 de RNGTT a 100 nM.

III. Conclusión

Los presentes resultados demuestran que el silenciamiento de la transcripción celular y de los mecanismos tras la transcripción por ARNsi estimulan la expresión del gen indicador conducido por la enzima híbrida NP868R-SP6ARNP.

Referencias

Bedzyk, W. D., K. M. Weidner, *et al.* (1990). "Immunological and structural characterization of a high affinity anti-fluorescein single-chain antibody." *J Biol Chem* 265(30): 18615-18620.

Bengal, E., O. Flores, *et al.* (1991). "Role of the mammalian transcription factors IIF, IIS, and IIX during elongation by RNA polymerase II." *Mol Cell Biol* 11(3): 1195-1206.

Benton, B. M., W. K. Eng, *et al.* (1990). "Signal-mediated import of bacteriophage T7 RNA polymerase into the *Saccharomyces cerevisiae* nucleus and specific transcription of target genes." *Mol Cell Biol* 10(1): 353-360.

Bird, R. E., K. D. Hardman, *et al.* (1988). "Single-chain antigen-binding proteins." *Science* 242(4877): 423-426.

Bridgen, A. y R. M. Elliott (1996). "Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary ADNs." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(26): 15400-15404.

Brisson, M., Y. He, *et al.* (1999). "A novel T7 RNA polymerase autogene for efficient cytoplasmic expression of target genes." *Gene Ther* 6(2): 263-270.

Bush, R., A. Pashine, *et al.* (2002). "Stabilization of soluble, low-affinity HLA-DM/HLA-DR1 complexes by leucine

- zipper." *J Immunol Methods* 263(1-2): 111-121.
- Busch, R., Z. Reich, *et al.* (1998). "Secondary structure composition and pH-dependent conformational changes of soluble recombinant HLA-DM." *J Biol Chem* 273(42): 27557-27564.
- 5 Bushnell, D. A., P. Cramer, *et al.* (2002). "Structural basis of transcription: alpha-amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 Å resolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3): 1218-1222.
- 10 Chang, H. C., Z. Bao, *et al.* (1994). "A general method for facilitating heterodimeric pairing between two proteins: application to expression of alpha and beta T-cell receptor extracellular segments." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(24): 11408-11412.
- 15 Chen, X., Y. Li, *et al.* (1994). "A self-initiating eukaryotic transient gene expression system based on cotransfection of bacteriophage T7 RNA polymerase and ADN vectors containing a T7 autogene." *Nucleic Acids Res* 22(11): 2114-2120.
- Chen, Z. y T. D. Schneider (2005). "Information theory based T7-like promoter models: classification of bacteriophages and differential evolution of promoters and their polymerases." *Nucleic Acids Res* 33(19): 6172-6187.
- 20 Cho, E. J., T. Takagi, *et al.* (1997). "mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain." *Genes Dev* 11(24): 3319-3326.
- Clayton, D. A. (1991). "Replication and transcription of vertebrate mitochondrial ADN." *Annu Rev Cell Biol* 7: 453-478.
- 25 Cong, P. y S. Shuman (1993). "Covalent catalysis in nucleotidyl transfer. A KTDG motif essential for enzyme-GMP complex formation by mRNA capping enzyme is conserved at the active sites of RNA and ADN ligases." *J Biol Chem* 268(10): 7256-60.
- 30 Cong, Y. S., D. Yarrow, *et al.* (1994). "Linear ADN plasmids from *Pichia etchellsii*, *Debaryomyces hansenii* and *Wingea robertsiae*." *Microbiology* 140 (Pt 6): 1327-1335.
- Conzelmann, K. K. y M. Schnell (1994). "Rescue of synthetic genomic RNA analogs of rabies virus by plasmid-encoded proteins." *J Virol* 68(2): 713-719.
- 35 Crasto, C. J. y J. A. Feng (2000). "LINKER: a program to generate linker sequences for fusion proteins." *Protein Eng* 13(5): 309-312.
- Cronan, J. E., Jr. (1990). "Biotination of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins." *J Biol Chem* 265(18): 10327-33.
- 40 Davanloo, P., A. H. Rosenberg, *et al.* (1984). "Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(7): 2035-2039.
- 45 Dias, N. y C. A. Stein (2002). "Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms." *Mol Cancer Ther* 1(5): 347-55.
- Dower, K. y M. Rosbash (2002). "T7 RNA polymerase-directed transcripts are processed in yeast and link 3' end formation to mRNA nuclear export." *Rna* 8(5): 686-697.
- 50 Drummond, D. R., J. Armstrong, *et al.* (1985). "The effect of capping and polyadenylation on the stability, movement and translation of synthetic messenger RNAs in *Xenopus* oocytes." *Nucleic Acids Res* 13(20): 7375-7394.
- Elroy-Stein, O., T. R. Fuerst, *et al.* (1989). "Cap-independent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the performance of the vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(16): 6126-6130.
- 55 Elroy-Stein, O. y B. Moss (1990). "Cytoplasmic expression system based on constitutive synthesis of bacteriophage T7 RNA polymerase in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(17): 6743-6747.
- 60 Engleka, K. A., E. W. Lewis, *et al.* (1998). "Mechanisms of replication-deficient vaccinia virus/T7 RNA polymerase hybrid expression: effect of T7 RNA polymerase levels and alpha-amanitin." *Virology* 243(2): 331-339.
- Epicentre Biotechnologies website. "ScriptCap™ 2'-O-Methyltransferase."
- 65 Fancy, D. A. y T. Kodadek (1999). "Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(11): 6020-4.

- 5 Fernandez-Silva, P., F. Martinez-Azorin, *et al.* (1997). "The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to ADN as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions." *Embo J* 16(5): 1066-1079.
- 10 Finn, J., I. MacLachlan, *et al.* (2005). "Factors limiting autogene-based cytoplasmic expression systems." *Faseb J* 19(6): 608-610.
- 15 Fire, A., M. Samuels, *et al.* (1984). "Interactions between RNA polymerase II, factors, and template leading to accurate transcription." *J Biol Chem* 259(4): 2509-2516.
- 20 Fisher, R. P. y D. A. Clayton (1985). "A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro." *J Biol Chem* 260(20): 11330-11338.
- 25 Fisher, R. P. y D. A. Clayton (1988). "Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1." *Mol Cell Biol* 8(8): 3496-3509.
- 30 Fisher, R. P., J. N. Topper, *et al.* (1987). "Promoter selection in human mitochondria involves binding of a transcription factor to orientation-independent upstream regulatory elements." *Cell* 50(2): 247-258.
- 35 Fortes, P., Y. Cuevas, *et al.* (2003). "Inhibiting expression of specific genes in mammalian cells with 5' end-mutated U1 small nuclear RNAs targeted to terminal exons of pre-mRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8264-9.
- 40 Fuerst, T. R., P. L. Earl, *et al.* (1987). "Use of a hybrid vaccinia virus-T7 RNA polymerase system for expression of target genes." *Mol Cell Biol* 7(7): 2538-2544.
- 45 Fuerst, T. R., M. P. Fernandez, *et al.* (1989). "Transfer of the inducible lac repressor/operator system from *Escherichia coli* to a vaccinia virus expression vector." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(8): 2549-2553.
- 50 Fuerst, T. R. y B. Moss (1989). "Structure and stability of mRNA synthesized by vaccinia virus-encoded bacteriophage T7 RNA polymerase in mammalian cells. Importance of the 5' untranslated leader." *J Mol Biol* 206(2): 333-348.
- 55 Fuerst, T. R., E. G. Niles, *et al.* (1986). "Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(21): 8122-8126.
- 60 Furuichi, Y., A. LaFiandra, *et al.* (1977). "5'-Terminal structure and mRNA stability." *Nature* 266(5599): 235-239.
- 65 Furuichi, Y. y A. J. Shatkin (2000). "Viral and cellular mRNA capping: past and prospects." *Adv Virus Res* 55: 135-184.
- Gallie, D. R. (1991). "The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency." *Genes Dev* 5(11): 2108-2116.
- Gao, X. y L. Huang (1993). "Cytoplasmic expression of a reporter gene by co-delivery of T7 RNA polymerase and T7 promoter sequence with cationic liposomes." *Nucleic Acids Res* 21(12): 2867-2872.
- Garcin, D., T. Pelet, *et al.* (1995). "A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendai paramyxovirus from cADN: generation of a novel copy-back nondefective interfering virus." *Embo J* 14(24): 6087-6094.
- Ghosh, I., A. D. Hamilton, *et al.* (2000). "Antiparallel Leucine Zipper-Directed Protein Reassembly: Application to the Green Fluorescent Protein." *Journal of the American Chemical Society* 122(23): 5658-5659.
- Gilbert, W. y A. Maxam (1973). "The nucleotide sequence of the lac operator." *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(12): 3581-3584.
- Gill, D. R., S. E. Smyth, *et al.* (2001). "Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing the ubiquitin C or elongation factor 1alpha promoter." *Gene Ther* 8(20): 1539-1546.
- Gingras, A. C., B. Raught, *et al.* (1999). "eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation." *Annu Rev Biochem* 68: 913-963.
- Golomb, M. y M. Chamberlin (1974). "Characterization of T7-specific ribonucleic acid polymerase. IV. Resolution of the major in vitro transcripts by gel electrophoresis." *J Biol Chem* 249(9): 2858-2863.

- Gong, C. y S. Shuman (2003). "Mapping the active site of vaccinia virus RNA triphosphatase." *Virology* 309(1): 125-34.
- 5 Gregoire, C., S. Y. Lin, *et al.* (1996). "Covalent assembly of a soluble T cell receptor-peptide-major histocompatibility class I complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(14): 7184-7189.
- Gustavsson, M., J. Lehtio, *et al.* (2001). "Stable linker peptides for a cellulose-binding domain-lipase fusion protein expressed in *Pichia pastoris*." *Protein Eng* 14(9): 711-715.
- 10 Han, Y. T., C. S. Tsai, *et al.* (2007). "Mutational analysis of a helicase motif-based RNA 5'-triphosphatase/NTPase from bamboo mosaic virus." *Virology*.
- Hennecke, F., C. Krebber, *et al.* (1998). "Non-repetitive single-chain Fv linkers selected by selectively infective phage (SIP) technology." *Protein Eng* 11(5): 405-410.
- 15 Higman, M. A., N. Bourgeois, *et al.* (1992). "The vaccinia virus mRNA (guanine-N7-)-methyltransferase requires both subunits of the mRNA capping enzyme for activity." *J Biol Chem* 267(23): 16430-7.
- 20 Higman, M. A., L. A. Christen, *et al.* (1994). "The mRNA (guanine-7-)-methyltransferase domain of the vaccinia virus mRNA capping enzyme. Expression in *Escherichia coli* and structural and kinetic comparison to the intact capping enzyme." *J Biol Chem* 269(21): 14974-81.
- Higman, M. A. y E. G. Niles (1994). "Location of the S-adenosyl-L-methionine binding region of the vaccinia virus mRNA (guanine-7-)-methyltransferase." *J Biol Chem* 269(21): 14982-7.
- 25 Hu, W., F. Li, *et al.* (2004). "A flexible peptide linker enhances the immunoreactivity of two copies HBsAg preS1 (21-47) fusion protein." *J Biotechnol* 107(1): 83-90.
- 30 Huang, Y. y J. A. Steitz (2005). "SRprises along a messenger's journey." *Mol Cell* 17(5): 613-615.
- Huston, J. S., D. Levinson, *et al.* (1988). "Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(16): 5879-5883.
- 35 Izban, M. G. y D. S. Luse (1992). "Factor-stimulated RNA polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked ADN but very poorly on chromatin templates." *J Biol Chem* 267(19): 13647-13655.
- Jacob, S. T., E. M. Sajdel, *et al.* (1970). "Specific action of alpha-amanitin on mammalian RNA polymerase protein." *Nature* 225(5227): 60-62.
- 40 Kedinger, C., M. Gniazdowski, *et al.* (1970). "Alpha-amanitin: a specific inhibitor of one of two ADN-pendent RNA polymerase activities from calf thymus." *Biochem Biophys Res Commun* 38(1): 165-171.
- Kohler, A. y E. Hurt (2007). "Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(10): 761-773.
- 45 Komarnitsky, P., E. J. Cho, *et al.* (2000). "Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription." *Genes Dev* 14(19): 2452-2460.
- Kozak, M. (1987). "At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells." *J Mol Biol* 196(4): 947-950.
- 50 Kozak, M. (2005). "Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes." *Gene* 361: 13-37.
- Kruse, B., N. Narasimhan, *et al.* (1989). "Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a ADN binding protein factor that promotes termination." *Cell* 58(2): 391-397.
- 55 Kuge, H., G. G. Brownlee, *et al.* (1998). "Cap ribose methylation of c-mos mRNA stimulates translation and oocyte maturation in *Xenopus laevis*." *Nucleic Acids Res* 26(13): 3208-3214.
- Kupper, H. A., W. T. McAllister, *et al.* (1973). "Comparison of *Escherichia coli* and T3 RNA polymerases. Differential inhibition of transcription by various drugs." *Eur J Biochem* 38(3): 581-586.
- 60 Lamla, T. y V. A. Erdmann (2004). "The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins." *Protein Expr Purif* 33(1): 39-47.
- 65 Lang, I., M. Scholz, *et al.* (1986). "Molecular mobility and nucleocytoplasmic flux in hepatoma cells." *J Cell Biol*

- 102(4): 1183-1190.
- Langberg, S. R. y B. Moss (1981). "Post-transcriptional modifications of mRNA. Purification and characterization of cap I and cap II RNA (nucleoside-2')-methyltransferases from HeLa cells." *J Biol Chem* 256(19): 10054-10060.
- 5 Lee, D. N., L. Phung, *et al.* (1990). "Transcription pausing by Escherichia coli RNA polymerase is modulated by downstream ADN sequences." *J Biol Chem* 265(25): 15145-15153.
- Li, Y. I., Y. J. Chen, *et al.* (2001). "Characterization of the AdoMet-dependent guanylyltransferase activity that is associated with the N terminus of bamboo mosaic virus replicase." *J Virol* 75(2): 782-788.
- 10 Li, Y. I., Y. M. Cheng, *et al.* (1998). "Identification and characterization of the Escherichia coli-expressed RNA-dependent RNA polymerase of bamboo mosaic virus." *J Virol* 72(12): 10093-10099.
- 15 Li, Y. I., T. W. Shih, *et al.* (2001). "The helicase-like domain of plant potexvirus replicase participates in formation of RNA 5' cap structure by exhibiting RNA 5'-triphosphatase activity." *J Virol* 75(24): 12114-12120.
- Lian, Y., M. B. De Young, *et al.* (1999). "The sCYMV1 hairpin ribozyme: targeting rules and cleavage of heterologous RNA." *Gene Ther* 6(6): 1114-9.
- 20 Lieschke, G. J., P. K. Rao, *et al.* (1997). "Bioactive murine and human interleukin-12 fusion proteins which retain antitumor activity in vivo." *Nat Biotechnol* 15(1): 35-40.
- Lindell, T. J., F. Weinberg, *et al.* (1970). "Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by alpha-amanitin." *Science* 170(956): 447-449.
- 25 Lissner, S. y H. Margalit (1993). "Compilation of E. coli mRNA promoter sequences." *Nucleic Acids Res* 21(7): 1507-1516.
- 30 Liu, Z. y G. G. Carmichael (1994). "Nuclear antisense RNA. An efficient new method to inhibit gene expression." *Mol Biotechnol* 2(2): 107-18.
- Liu, Z., J. Jian-Bo, *et al.* (2005). "Anti-proteolysis Study of Recombinant IIn-UK Fusion Protein in CHO Cell " *Prog. Biochem. Biophys* 32(6): 544-550.
- 35 Lo, H. J., H. K. Huang, *et al.* (1998). "RNA polymerase I-promoted HIS4 expression yields uncapped, polyadenylated mRNA that is unstable and inefficiently translated in Saccharomyces cerevisiae." *Mol Cell Biol* 18(2): 665-675.
- Lodish, H., A. Berk, *et al.* (2008). *Molecular Cell Biology*. New York, USA, Freeman, W.H. and Co.
- 40 Loser, P., G. S. Jennings, *et al.* (1998). "Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver: involvement of NFkappaB." *J Virol* 72(1): 180-190.
- Lumb, K. J. y P. S. Kim (1995). "A buried polar interaction imparts structural uniqueness in a designed heterodimeric coiled coil." *Biochemistry* 34(27): 8642-8.
- 45 Lyakhov, D. L., B. He, *et al.* (1997). "Mutant bacteriophage T7 RNA polymerases with altered termination properties." *J Mol Biol* 269(1): 269-40.
- 50 Makarova, O. V., E. M. Makarov, *et al.* (1995). "Transcribing of Escherichia coli genes with mutant T7 RNA polymerases: stability of lacZ mRNA inversely correlates with polymerase speed." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(26): 12250-12254.
- Malone, R. W., P. L. Felgner, *et al.* (1989). "Cationic liposome-mediated RNA transfection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(16): 6077-6081.
- 55 Mantile, G., C. Fuchs, *et al.* (2000). "Stable, long-term bacterial production of soluble, dimeric, disulfide-bonded protein pharmaceuticals without antibiotic selection." *Biotechnol Prog* 16(1): 17-25.
- 60 Mao, X. y S. Shuman (1994). "Intrinsic RNA (guanine-7) methyltransferase activity of the vaccinia virus capping enzyme D1 subunit is stimulated by the D12 subunit. Identification of amino acid residues in the D1 protein required for subunit association and methyl group transfer." *J Biol Chem* 269(39): 24472-9.
- Martinez-Costas, J., G. Sutton, *et al.* (1998). "Guanylyltransferase and RNA 5'-triphosphatase activities of the purified expressed VP4 protein of bluetongue virus." *J Mol Biol* 280(5): 859-866.
- 65

- McClain, D. L., H. L. Woods, *et al.* (2001). "Design and characterization of a heterodimeric coiled coil that forms exclusively with an antiparallel relative helix orientation." *J Am Chem Soc* 123(13): 3151-3152.
- 5 McCracken, S., N. Fong, *et al.* (1997). "5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II." *Genes Dev* 11(24): 3306-3318.
- McCulloch, V., B. L. Seidel-Rogol, *et al.* (2002). "A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine." *Mol Cell Biol* 22(4): 1116-1125.
- 10 Miao, C. H., A. R. Thompson, *et al.* (2001). "Long-term and therapeutic-level hepatic gene expression of human factor IX after naked plasmid transfer in vivo." *Mol Ther* 3(6): 947-957.
- Miao, C. H., X. Ye, *et al.* (2003). "High-level factor VIII gene expression in vivo achieved by nonviral liver-specific gene therapy vectors." *Hum Gene Ther* 14(14): 1297-1305.
- 15 Mifflin, R. C. y R. E. Kellems (1991). "Coupled transcription-polyadenylation in a cell-free system." *J Biol Chem* 266(29): 19593-19598.
- Moffatt, B. A., J. J. Dunn, *et al.* (1984). "Nucleotide sequence of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase." *J Mol Biol* 173(2): 265-269.
- 20 Moll, J. R., S. B. Ruvinov, *et al.* (2001). "Designed heterodimerizing leucine zippers with a ranger of pls and stabilities up to 10(-15) M." *Protein Sci* 10(3): 649-55.
- 25 Natalizio, B. J., N. D. Robson-Dixon, *et al.* (2009). "The Carboxyl-terminal Domain of RNA Polymerase II Is Not Sufficient to Enhance the Efficiency of Pre-mRNA Capping or Splicing in the Context of a Different Polymerase." *J Biol Chem* 284(13): 8692-8702.
- Newton, D. L., Y. Xue, *et al.* (1996). "Angiogenin single-chain immunofusions: influence of peptide linkers and spacers between fusion protein domains." *Biochemistry* 35(2): 545-553.
- 30 Nicol, F., M. Wong, *et al.* (2002). "Poly-L-glutamate, an anionic polymer, enhances transgene expression for plasmids delivered by intramuscular injection with in vivo electroporation." *Gene Ther* 9(20): 1351-1358.
- 35 Niles, E. G. y L. Christen (1993). "Identification of the vaccinia virus mRNA guanyltransferase active site lysine." *J Biol Chem* 268(33): 24986-9.
- O'Shea, E. K., J. D. Klemm, *et al.* (1991). "X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil." *Science* 254(5031): 539-544.
- 40 O'Shea, E. K., K. J. Lumb, *et al.* (1993). "Peptide 'Velcro': design of a heterodimeric coiled coil." *Curr Biol* 3(10): 658-667.
- Oakley, M. G. y P. S. Kim (1998). "A buried polar interaction can direct the relative orientation of helices in a coiled coil." *Biochemistry* 37(36): 12603-12610.
- 45 Ojala, D., J. Montoya, *et al.* (1981). "tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria." *Nature* 290(5806): 470-474.
- 50 Osumi-Davis, P. A., M. C. de Aguilera, *et al.* (1992). "Asp537, Asp812 are essential and Lys631, His811 are catalytically significant in bacteriophage T7 RNA polymerase activity." *J Mol Biol* 226(1): 37-45.
- Osumi-Davis, P. A., N. Sreerama, *et al.* (1994). "Bacteriophage T7 RNA polymerase and its active-site mutants. Kinetic, spectroscopic and calorimetric characterization." *J Mol Biol* 237(1): 5-19.
- 55 Paguirigan, A. L. y D. J. Beebe (2007). "Protocol for the fabrication of enzymatically crosslinked gelatin microchannels for microfluidic cell culture." *Nat Protoc* 2(7): 1782-8.
- Palancade, B. y O. Bensaude (2003). "Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation." *Eur J Biochem* 270(19): 3859-3870.
- 60 Pantoliano, M. W., R. E. Bird, *et al.* (1991). "Conformational stability, folding, and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in *Escherichia coli*." *Biochemistry* 30(42): 10117-10125.
- 65 Pashine, A., R. Busch, *et al.* (2003). "Interaction of HLA-DR with an acidic face of HLA-DM disrupts sequence-dependent interactions with peptides." *Immunity* 19(2): 183-192.

- Patil, S. D., D. G. Rhodes, *et al.* (2004). "Anionic liposomal delivery system for ADN transfection." *Aaps J* 6(4): e29.
- 5 Pavlinkova, G., G. W. Beresford, *et al.* (1999). "Pharmacokinetics and biodistribution of engineered single-chain antibody constructs of MAb CC49 in colon carcinoma xenografts." *J Nucl Med* 40(9): 1536-1546.
- Platt, T. (1986). "Transcription termination and the regulation of gene expression." *Annu Rev Biochem* 55: 339-372.
- 10 Prieto-Martin, A., J. Montoya, *et al.* (2001). "A study on the human mitochondrial RNA polymerase activity points to existence of a transcription factor B-like protein." *FEBS Lett* 503(1): 51-55.
- Ramadevi, N., N. J. Burroughs, *et al.* (1998). "Capping and methylation of mRNA by purified recombinant VP4 protein of bluetongue virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23): 13537-13542.
- 15 Ramadevi, N., J. Rodriguez, *et al.* (1998). "A leucine zipper-like domain is essential for dimerization and encapsidation of bluetongue virus nucleocapsid protein VP4." *J Virol* 72(4): 2983-2990.
- Ramsey-Ewing, A. y B. Moss (1996). "Recombinant protein synthesis in Chinese hamster ovary cells using a vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system." *J Biol Chem* 271(28): 16962-16966.
- 20 Rhoads, R. E. (1999). "Signal transduction pathways that regulate eukaryotic protein synthesis." *J Biol Chem* 274(43): 30337-30340.
- Robinson, C. R. y R. T. Sauer (1998). "Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 5929-5934.
- 25 Salehi-Ashtiani, K. y J. W. Szostak (2001). "In vitro evolution suggests multiple origins for the hammerhead ribozyme." *Nature* 414(6859): 82-4.
- 30 Schmidt, T. G. y A. Skerra (1993). "The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment." *Protein Eng* 6(1): 109-22.
- Schroeder, S. C., B. Schwer, *et al.* (2000). "Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II." *Genes Dev* 14(19): 2435-2440.
- 35 Schurer, H., K. Lang, *et al.* (2002). "A universal method to produce in vitro transcripts with homogeneous 3' ends." *Nucleic Acids Res* 30(12): e56.
- Shao, W. H., X. E. Zhang, *et al.* (2000). "Anchor-chain molecular system for orientation control in enzyme immobilization." *Bioconjug Chem* 11(6): 822-826.
- 40 Spohner, D., S. Gillard, *et al.* (1988). "A cowpox virus gene required for multiplication in Chinese hamster ovary cells." *J Virol* 62(4): 1297-1304.
- 45 Studier, F. W., A. H. Rosenberg, *et al.* (1990). "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." *Methods Enzymol* 185: 60-89.
- Tang, Y., N. Jiang, *et al.* (1996). "Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology." *J Biol Chem* 271(26): 15682-15686.
- 50 Ting, A. (2003). Genetically encoded fluorescent reporters of kinase, methyltransferase, and acetyl-transferase activities.
- Ting, A. Y., K. H. Kain, *et al.* (2001). "Genetically encoded fluorescent reporters of protein tyrosine kinase activities in living cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26): 15003-15008.
- 55 Tiranti, V., A. Savoia, *et al.* (1997). "Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database." *Hum Mol Genet* 6(4): 615-625.
- 60 Tommasino, M., S. Ricci, *et al.* (1988). "Genome organization of the killer plasmid pGK12 from *Kluyveromyces lactis*." *Nucleic Acids Res* 16(13): 5863-5878.
- Topper, J. N. y D. A. Clayton (1989). "Identification of transcriptional regulatory elements in human mitochondrial ADN by linker substitution analysis." *Mol Cell Biol* 9(3): 1200-1211.
- 65 Turner, D. J., M. A. Ritter, *et al.* (1997). "Importance of the linker in expression of single-chain Fv antibody fragments:

optimisation of peptide sequence using phage display technology." J Immunol Methods 205(1): 43-54.

Ucker, D. S. y K. R. Yamamoto (1984). "Early events in the stimulation of mammary tumor virus RNA synthesis by glucocorticoids. Novel assays of transcription rates." J Biol Chem 259(12): 7416-7420.

5 Uptain, S. M. y M. J. Chamberlin (1997). "Escherichia coli RNA polymerase terminates transcription efficiently at rho-independent terminators on single-stranded ADN templates." Proc Natl Acad Sci U S A 94(25): 13548-13553.

10 Walker, S. C., J. M. Avis, *et al.* (2003). "General plasmids for producing RNA in vitro transcripts with homogeneous ends." Nucleic Acids Res 31(15): e82.

Wells, J. A. y D. B. Powers (1986). "In vivo formation and stability of engineered disulfide bonds in subtilisin." J Biol Chem 261(14): 6564-6570.

15 Whitlow, M., B. A. Bell, *et al.* (1993). "An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability." Protein Eng 6(8): 989-995.

Wickham, T. J., M. E. Carrion, *et al.* (1995). "Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs." Gene Ther 2(10): 750-756.

20 Wu, S. C., J. C. Yeung, *et al.* (2002). "Design, production, and characterization of an engineered biotin ligase (BirA) and its application for affinity purification of staphylokinase produced from Bacillus subtilis via secretion." Protein Expr Purif 24(3): 357-65.

25 Wyatt, L. S., B. Moss, *et al.* (1995). "Replication-deficient vaccinia virus encoding bacteriophage T7 RNA polymerase for transient gene expression in mammalian cells." Virology 210(1): 202-205.

30 Yue, Z., E. Maldonado, *et al.* (1997). "Mammalian capping enzyme complements mutant Saccharomyces cerevisiae lacking mRNA guanylyltransferase and selectively binds the elongating form of RNA polymerase II." Proc Natl Acad Sci U S A 94(24): 12898-12903.

Zabner, J., A. J. Fasbender, *et al.* (1995). "Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid." J Biol Chem 270(32): 18997-19007.

35 Zhang, X. y F. W. Studier (1997). "Mechanism of inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase by T7 lysozyme." J Mol Biol 269(1): 10-27.

Listado de secuencias

40 <110> EUKARYS
<120> ENZIMAS DE ARN POLIMERASA PROPENSAS A LA FORMACIÓN DE CAPERUZA Y SUS APLICACIONES

45 <130> 358243D28594

<150> EP 10305400.3
<151> 2010-04-16

50 <160> 50

<170> PatentIn versión 3.3

55 <210> 1
<211> 883
<212> PRT
<213> Enterobacteria fago T7

60 <400> 1

ES 2 436 356 T3

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu
 1 5 10 15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu
 20 25 30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu
 35 40 45

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val
 50 55 60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys
 65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg
 85 90 95

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu
 100 105 110

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser
 115 120 125

Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala
 130 135 140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys
 145 150 155 160

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His
 165 170 175

ES 2 436 356 T3

Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser
 180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp
 195 200 205

Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr
 210 215 220

Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp
 225 230 235 240

Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr
 245 250 255

Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val
 260 265 270

Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Tyr Trp Ala
 275 280 285

Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala
 290 295 300

Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile
 305 310 315 320

Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala
 325 330 335

Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile
 340 345 350

Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp
 355 360 365

Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val
 370 375 380

Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe
 385 390 395 400

Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe
 405 410 415

Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe
 420 425 430

ES 2 436 356 T3

Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys
 435 440 445

Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly
 450 455 460

Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys
 465 470 475 480

Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro
 485 490 495

Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu
 500 505 510

Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr
 515 520 525

Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln
 530 535 540

His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn
 545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys
 565 570 575

Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn
 580 585 590

Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys
 595 600 605

Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly
 610 615 620

Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly
 625 630 635 640

Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln
 645 650 655

Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln
 660 665 670

Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr
 675 680 685

Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys

ES 2 436 356 T3

```

        690                695                700

Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg
705                710                715                720

Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp
                725                730                735

Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu
                740                745                750

Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu
                755                760                765

Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His
770                775                780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu
785                790                795                800

Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr
                805                810                815

Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met
                820                825                830

Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln
835                840                845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu
850                855                860

Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe
865                870                875                880

```

Ala Phe Ala

<210> 2
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Enlazador de péptidos

10 <400> 2

```

Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Ser Met Val Gly Gly Gly Gly Ser
1         5                10                15

```

15 <210> 3
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Enlazador de péptidos

ES 2 436 356 T3

<400> 3

Ser Pro Asn Gly Ala Ser Asn Ser Gly Ser Ala Pro Asp Thr Ser Ser
1 5 10 15

Ala Pro Gly Ser Gln
20

5 <210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Enlazador de péptidos

<400> 4

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr Glu
15 1 5 10 15

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador de péptidos

25 <400> 5

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Glu Phe
1 5 10

<210> 6
30 <211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Enlazador de péptidos

<400> 6

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly

40 <210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Enlazador de péptidos

<400> 7

50 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

<210> 8
<211> 18
55 <212> PRT

ES 2 436 356 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador de péptidos

5

<400> 8

Tyr Pro Arg Ser Ile Tyr Ile Arg Arg Arg His Pro Ser Pro Ser Leu
1 5 10 15

Thr Thr

10 <210> 9
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Enlazador de péptidos

<400> 9

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

20 **Lys Gly**

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Enlazador de péptidos

30 <400> 10

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
1 5 10 15

<210> 11
 <211> 25
 <212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Enlazador de péptidos

<400> 11

Ser Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
1 5 10 15

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala
20 25

45 <210> 12
 <211> 26
 <212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Enlazador de péptidos

ES 2 436 356 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que aparece de manera natural
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que aparece de manera natural
 10
 <400> 12

 Gly Ser Ala Asp Asp Ala Xaa Xaa Asp Ala Ala Xaa Lys Asp Asp Ala
 1 5 10 15

 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Gly Ser
 20 25
 15 <210> 13
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Enlazador de péptidos

 <400> 13

 Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
 1 5 10 15

 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu
 20 25
 25 <210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Enlazador de péptidos

 <400> 14

 Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
 1 5 10 15

 Ala
 40 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> Enlazador de péptidos

 <400> 15

 Gly Ser His Ser Gly Ser Gly Lys Pro
 1 5
 50 <210> 16
 <211> 34
 <212> PRT

ES 2 436 356 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador de péptidos

5

<400> 16

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Ser Gly
20 25 30

Glu Gly

10

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Enlazador de péptidos

<400> 17

20

Leu Ser Leu Glu Val Ala Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val
1 5 10 15

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador de péptidos

30

<400> 18

Gly Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Gly Glu Phe
1 5 10

35

<210> 19

<211> 885

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Secuencia de proteína codificada por plásmido pT7ARN

<400> 19

ES 2 436 356 T3

Met Leu Glu Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile
 1 5 10 15

Glu Leu Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu
 20 25 30

Arg Leu Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met
 35 40 45

Gly Glu Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly
 50 55 60

Glu Val Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu
 65 70 75 80

Pro Lys Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala
 85 90 95

Lys Arg Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys
 100 105 110

Pro Glu Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu
 115 120 125

Thr Ser Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly
 130 135 140

Arg Ala Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu
 145 150 155 160

ES 2 436 356 T3

Ala Lys His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val
 165 170 175

Gly His Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met
 180 185 190

Leu Ser Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys
 195 200 205

Glu Asp Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu
 210 215 220

Ser Thr Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly
 225 230 235 240

Gln Asp Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile
 245 250 255

Ala Thr Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro
 260 265 270

Cys Val Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr
 275 280 285

Trp Ala Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys
 290 295 300

Lys Ala Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys
 305 310 315 320

Ala Ile Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val
 325 330 335

Leu Ala Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu
 340 345 350

Asp Ile Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp
 355 360 365

Ile Asp Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala
 370 375 380

Ala Val Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu
 385 390 395 400

Glu Phe Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile
 405 410 415

Trp Phe Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser

ES 2 436 356 T3

420	425	430
Met Phe Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu 435 440 445		
Ala Lys Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile 450 455 460		
His Gly Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg 465 470 475 480		
Ile Lys Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys 485 490 495		
Ser Pro Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys 500 505 510		
Phe Leu Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu 515 520 525		
Ser Tyr Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly 530 535 540		
Ile Gln His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala 545 550 555 560		
Val Asn Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val 565 570 575		
Ala Lys Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr 580 585 590		
Asp Asn Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser 595 600 605		
Glu Lys Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala 610 615 620		
Tyr Gly Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala 625 630 635 640		
Tyr Gly Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr 645 650 655		
Ile Gln Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro 660 665 670		
Asn Gln Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser 675 680 685		

ES 2 436 356 T3

Val Thr Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala
690 695 700

Ala Lys Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile
705 710 715 720

Leu Arg Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro
725 730 735

Val Trp Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met
740 745 750

Phe Leu Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp
755 760 765

Ser Glu Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe
770 775 780

Val His Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala
785 790 795 800

His Glu Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe
805 810 815

Gly Thr Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu
820 825 830

Thr Met Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr
835 840 845

Asp Gln Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro
850 855 860

Ala Leu Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser
865 870 875 880

Asp Phe Ala Phe Ala
885

<210> 20

<211> 1776

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteína codificada por plásmido pNP868R-pT7ARNP

10

<400> 20

Met Glu Phe Ala Ser Leu Asp Asn Leu Val Ala Arg Tyr Gln Arg Cys

ES 2 436 356 T3

1 5 10 15

Phe Asn Asp Gln Ser Leu Lys Asn Ser Thr Ile Glu Leu Glu Ile Arg
 20 25 30

Phe Gln Gln Ile Asn Phe Leu Leu Phe Lys Thr Val Tyr Glu Ala Leu
 35 40 45

Val Ala Gln Glu Ile Pro Ser Thr Ile Ser His Ser Ile Arg Cys Ile
 50 55 60

Lys Lys Val His His Glu Asn His Cys Arg Glu Lys Ile Leu Pro Ser
 65 70 75 80

Glu Asn Leu Tyr Phe Lys Lys Gln Pro Leu Met Phe Phe Lys Phe Ser
 85 90 95

Glu Pro Ala Ser Leu Gly Cys Lys Val Ser Leu Ala Ile Glu Gln Pro
 100 105 110

Ile Arg Lys Phe Ile Leu Asp Ser Ser Val Leu Val Arg Leu Lys Asn
 115 120 125

Arg Thr Thr Phe Arg Val Ser Glu Leu Trp Lys Ile Glu Leu Thr Ile
 130 135 140

Val Lys Gln Leu Met Gly Ser Glu Val Ser Ala Lys Leu Ala Ala Phe
 145 150 155 160

Lys Thr Leu Leu Phe Asp Thr Pro Glu Gln Gln Thr Thr Lys Asn Met
 165 170 175

Met Thr Leu Ile Asn Pro Asp Asp Glu Tyr Leu Tyr Glu Ile Glu Ile
 180 185 190

Glu Tyr Thr Gly Lys Pro Glu Ser Leu Thr Ala Ala Asp Val Ile Lys
 195 200 205

Ile Lys Asn Thr Val Leu Thr Leu Ile Ser Pro Asn His Leu Met Leu
 210 215 220

Thr Ala Tyr His Gln Ala Ile Glu Phe Ile Ala Ser His Ile Leu Ser
 225 230 235 240

Ser Glu Ile Leu Leu Ala Arg Ile Lys Ser Gly Lys Trp Gly Leu Lys
 245 250 255

Arg Leu Leu Pro Gln Val Lys Ser Met Thr Lys Ala Asp Tyr Met Lys
 260 265 270

ES 2 436 356 T3

Phe Tyr Pro Pro Val Gly Tyr Tyr Val Thr Asp Lys Ala Asp Gly Ile
 275 280 285

Arg Gly Ile Ala Val Ile Gln Asp Thr Gln Ile Tyr Val Val Ala Asp
 290 295 300

Gln Leu Tyr Ser Leu Gly Thr Thr Gly Ile Glu Pro Leu Lys Pro Thr
 305 310 315 320

Ile Leu Asp Gly Glu Phe Met Pro Glu Lys Lys Glu Phe Tyr Gly Phe
 325 330 335

Asp Val Ile Met Tyr Glu Gly Asn Leu Leu Thr Gln Gln Gly Phe Glu
 340 345 350

Thr Arg Ile Glu Ser Leu Ser Lys Gly Ile Lys Val Leu Gln Ala Phe
 355 360 365

Asn Ile Lys Ala Glu Met Lys Pro Phe Ile Ser Leu Thr Ser Ala Asp
 370 375 380

Pro Asn Val Leu Leu Lys Asn Phe Glu Ser Ile Phe Lys Lys Lys Thr
 385 390 395 400

Arg Pro Tyr Ser Ile Asp Gly Ile Ile Leu Val Glu Pro Gly Asn Ser
 405 410 415

Tyr Leu Asn Thr Asn Thr Phe Lys Trp Lys Pro Thr Trp Asp Asn Thr
 420 425 430

Leu Asp Phe Leu Val Arg Lys Cys Pro Glu Ser Leu Asn Val Pro Glu
 435 440 445

Tyr Ala Pro Lys Lys Gly Phe Ser Leu His Leu Leu Phe Val Gly Ile
 450 455 460

Ser Gly Glu Leu Phe Lys Lys Leu Ala Leu Asn Trp Cys Pro Gly Tyr
 465 470 475 480

Thr Lys Leu Phe Pro Val Thr Gln Arg Asn Gln Asn Tyr Phe Pro Val
 485 490 495

Gln Phe Gln Pro Ser Asp Phe Pro Leu Ala Phe Leu Tyr Tyr His Pro
 500 505 510

Asp Thr Ser Ser Phe Ser Asn Ile Asp Gly Lys Val Leu Glu Met Arg
 515 520 525

ES 2 436 356 T3

Cys Leu Lys Arg Glu Ile Asn Tyr Val Arg Trp Glu Ile Val Lys Ile
 530 535 540

Arg Glu Asp Arg Gln Gln Asp Leu Lys Thr Gly Gly Tyr Phe Gly Asn
 545 550 555 560

Asp Phe Lys Thr Ala Glu Leu Thr Trp Leu Asn Tyr Met Asp Pro Phe
 565 570 575

Ser Phe Glu Glu Leu Ala Lys Gly Pro Ser Gly Met Tyr Phe Ala Gly
 580 585 590

Ala Lys Thr Gly Ile Tyr Arg Ala Gln Thr Ala Leu Ile Ser Phe Ile
 595 600 605

Lys Gln Glu Ile Ile Gln Lys Ile Ser His Gln Ser Trp Val Ile Asp
 610 615 620

Leu Gly Ile Gly Lys Gly Gln Asp Leu Gly Arg Tyr Leu Asp Ala Gly
 625 630 635 640

Val Arg His Leu Val Gly Ile Asp Lys Asp Gln Thr Ala Leu Ala Glu
 645 650 655

Leu Val Tyr Arg Lys Phe Ser His Ala Thr Thr Arg Gln His Lys His
 660 665 670

Ala Thr Asn Ile Tyr Val Leu His Gln Asp Leu Ala Glu Pro Ala Lys
 675 680 685

Glu Ile Ser Glu Lys Val His Gln Ile Tyr Gly Phe Pro Lys Glu Gly
 690 695 700

Ala Ser Ser Ile Val Ser Asn Leu Phe Ile His Tyr Leu Met Lys Asn
 705 710 715 720

Thr Gln Gln Val Glu Asn Leu Ala Val Leu Cys His Lys Leu Leu Gln
 725 730 735

Pro Gly Gly Met Val Trp Phe Thr Thr Met Leu Gly Glu Gln Val Leu
 740 745 750

Glu Leu Leu His Glu Asn Arg Ile Glu Leu Asn Glu Val Trp Glu Ala
 755 760 765

Arg Glu Asn Glu Val Val Lys Phe Ala Ile Lys Arg Leu Phe Lys Glu
 770 775 780

ES 2 436 356 T3

Asp Ile Leu Gln Glu Thr Gly Gln Glu Ile Gly Val Leu Leu Pro Phe
 785 790 795 800
 Ser Asn Gly Asp Phe Tyr Asn Glu Tyr Leu Val Asn Thr Ala Phe Leu
 805 810 815
 Ile Lys Ile Phe Lys His His Gly Phe Ser Leu Val Gln Lys Gln Ser
 820 825 830
 Phe Lys Asp Trp Ile Pro Glu Phe Gln Asn Phe Ser Lys Ser Leu Tyr
 835 840 845
 Lys Ile Leu Thr Glu Ala Asp Lys Thr Trp Thr Ser Leu Phe Gly Phe
 850 855 860
 Ile Cys Leu Arg Lys Asn Gly Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 865 870 875 880
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Glu Asn Thr
 885 890 895
 Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu Ala Ala Ile
 900 905 910
 Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu Ala Arg Glu
 915 920 925
 Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu Ala Arg Phe
 930 935 940
 Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val Ala Asp Asn
 945 950 955 960
 Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys Met Ile Ala
 965 970 975
 Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg Gly Lys Arg
 980 985 990
 Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu Ala Val Ala
 995 1000 1005
 Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser Ala Asp
 1010 1015 1020
 Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala Ile
 1025 1030 1035
 Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys

ES 2 436 356 T3

1040		1045		1050
His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly 1055		1060		1065
His Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met 1070		1075		1080
Leu Ser Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His 1085		1090		1095
Lys Glu Asp Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu 1100		1105		1110
Ile Glu Ser Thr Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly 1115		1120		1125
Val Val Gly Gln Asp Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr 1130		1135		1140
Ala Glu Ala Ile Ala Thr Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser 1145		1150		1155
Pro Met Phe Gln Pro Cys Val Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly 1160		1165		1170
Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala 1175		1180		1185
Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala Leu Met Arg Tyr Glu Asp 1190		1195		1200
Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile Asn Ile Ala Gln Asn 1205		1210		1215
Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala Val Ala Asn Val 1220		1225		1230
Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile Pro Ala Ile 1235		1240		1245
Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp Met Asn 1250		1255		1260
Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Ala Val Tyr 1265		1270		1275
Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe 1280		1285		1290

ES 2 436 356 T3

Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp
 1295 1300 1305

Phe Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser
 1310 1315 1320

Met Phe Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr
 1325 1330 1335

Leu Ala Lys Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu
 1340 1345 1350

Lys Ile His Gly Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe
 1355 1360 1365

Pro Glu Arg Ile Lys Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met
 1370 1375 1380

Ala Cys Ala Lys Ser Pro Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln
 1385 1390 1395

Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly
 1400 1405 1410

Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala
 1415 1420 1425

Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln His Phe Ser Ala Met Leu
 1430 1435 1440

Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn Leu Leu Pro Ser Glu
 1445 1450 1455

Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys Lys Val Asn Glu
 1460 1465 1470

Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn Glu Val Val
 1475 1480 1485

Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys Val Lys
 1490 1495 1500

Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly Val
 1505 1510 1515

Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly
 1520 1525 1530

ES 2 436 356 T3

Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile
 1535 1540 1545

Gln Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro
 1550 1555 1560

Asn Gln Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val
 1565 1570 1575

Ser Val Thr Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys
 1580 1585 1590

Ser Ala Ala Lys Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr
 1595 1600 1605

Gly Glu Ile Leu Arg Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro
 1610 1615 1620

Asp Gly Phe Pro Val Trp Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr
 1625 1630 1635

Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr
 1640 1645 1650

Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu Ile Asp Ala His Lys Gln Glu
 1655 1660 1665

Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His Ser Gln Asp Gly Ser His
 1670 1675 1680

Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu Lys Tyr Gly Ile Glu
 1685 1690 1695

Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr Ile Pro Ala Asp
 1700 1705 1710

Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met Val Asp Thr
 1715 1720 1725

Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln Phe Ala
 1730 1735 1740

Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu Pro
 1745 1750 1755

Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe
 1760 1765 1770

Ala Phe Ala
 1775

5 <210> 21
 <211> 5331
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> ORF del NP868R-T7ARNP

ES 2 436 356 T3

<400> 21

atggaattcg ccagcctgga caacctggtg gccagatacc agcggtgctt caacgaccag 60
 agcctgaaga acagaccat cgagctggaa atccggttcc agcagatcaa cttcctgctg 120
 ttcaagaccg tgtacgaggc cctggtcgcc caggaaatcc ccagcaccat cagccacagc 180
 atccggtgca tcaagaaggt gcaccacgag aaccactgcc gggagaagat cctgcccagc 240
 gagaacctgt acttcaagaa acagcccctg atgttcttca agttcagcga gcccggcagc 300
 ctgggctgta aagtgtccct ggccatcgag cagcccatcc ggaagttcat cctggacagc 360
 agcgtgctgg tccggctgaa gaaccggacc accttccggg tgtccgagct gtggaagatc 420
 gagctgacca tcgtgaagca gctgatgggc agcgaggtgt cagccaagct ggccgccttc 480
 aagacctgac tgttcgacac ccccgagcag cagaccacca agaacatgat gacctgatc 540
 aaccccagc acgagtacct gtacgagatc gagatcgagt acaccggcaa gcctgagagc 600
 ctgacagccg ccgacgtgat caagatcaag aacaccgtgc tgacactgat cagccccaac 660
 cacctgatgc tgaccgccta ccaccaggcc atcgagtta tcgccagcca catcctgagc 720
 agcgagatcc tgctggcccg gatcaagagc ggcaagtggg gcctgaagag actgctgccc 780
 caggtcaagt ccatgaccaa gcccgactac atgaagttct accccccctg gggctactac 840
 gtgaccgaca aggccgacgg catccggggc attgccgtga tccaggacac ccagatctac 900
 gtggtggccg accagctgta cagcctgggc accaccggca tcgagcccct gaagcccacc 960
 atcctggacg gcgagttcat gcccgagaag aaagagttct acggctttga cgtgatcatg 1020
 tacgagggca acctgctgac ccagcagggc ttcgagacac ggatcgagag cctgagcaag 1080
 ggcacaaagg tgctgcaggg cttcaacatc aaggccgaga tgaagccctt catcagcctg 1140
 acctccgccg accccaacgt gctgctgaag aatttcgaga gcatcttcaa gaagaaaacc 1200
 cggccctaca gcatcgacgg catcatcctg gtggagcccg gcaacagcta cctgaacacc 1260
 aacaccttca agtgaagcc cacctgggac aacaccctgg actttctggt ccggaagtgc 1320
 cccgagtccc tgaacgtgcc cgagtacgcc cccaagaagg gcttcagcct gcatctgctg 1380
 ttcgtgggca tcagcggcga gctgtttaag aagctggccc tgaactggtg ccccggctac 1440
 accaagctgt tccccgtgac ccagcggaac cagaactact tccccgtgca gttccagccc 1500
 agcgacttcc ccctggcctt cctgtactac caccocgaca ccagcagctt cagcaacatc 1560

5

ES 2 436 356 T3

gatggcaagg tgctggaaat gcggtgcctg aagcgggaga tcaactacgt gcgctgggag 1620
atcgtgaaga tccgggagga ccggcagcag gatctgaaaa ccggcggcta ctctggcaac 1680
gacttcaaga ccgcccagct gacctggctg aactacatgg accccttcag ctctgaggaa 1740
ctggccaagg gaccocagcg catgtacttc gctggcgcca agaccggcat ctacagagcc 1800
cagaccgccc tgatcagctt catcaagcag gaaatcatcc agaagatcag ccaccagagc 1860
tgggtgatcg acctgggcat cggcaagggc caggacctgg gcagatacct ggacgcccgc 1920
gtgagacacc tggtcggcat cgataaggac cagacagccc tggccgagct ggtgtaccgg 1980
aagttctccc acgccaccac cagacagcac aagcacgcca ccaacateta cgtgctgcac 2040
caggatctgg ccgagcctgc caaagaaatc agcgagaaag tgcaccagat ctatggcttc 2100
cccaaagagg gcgccagcag catcgtgtcc aacctgttca tccactacct gatgaagaac 2160
accocagcagg tcgagaacct ggctgtgctg tgcacaagc tgctgcagcc tggcggcatg 2220
gtctggttca ccaccatgct gggcgaacag gtgctggaac tgctgcacga gaaccggatc 2280
gaactgaacg aagtgtggga ggccccggag aacgaggtgg tcaagtctgc catcaagcgg 2340
ctgttcaag aggacatcct gcaggaaacc gggcaggaaa tcggcgtcct gctgcccttc 2400
agcaacggcg acttctacaa tgagtacctg gtcaacaccg cctttctgat caagatttc 2460
aagcaccatg gctttagcct cgtgcagaag cagagcttca aggactggat ccccgagttc 2520
cagaacttca gcaagagcct gtacaagatc ctgaccgagg ccgacaagac ctggaccagc 2580
ctgttcggct tcatctgcct gcggaagaac gggcccggcg gaggcggaag tggagcggga 2640
ggaagcggag ggggaggatc tggcggcgga ggcagcctcg agaaccacat caatatcgcc 2700
aagaacgact tcagcgacat cgagctggcc gccatccctt tcaacaccct ggccgaccac 2760
tatggcgagc ggctggccag agaacagctg gccctggaac acgagagcta cgaaatgggc 2820
gaggcccgtt tccggaagat gttcgagaga cagctgaagg ccggcgaggt ggccgataat 2880
gccgccccta agcccctgat caccaccctg ctgcccaga tgatcgccc gatcaacgat 2940
tggttcgagg aagtgaaggc caagcggggc aagaggccca ccgccttcca gtttctgcag 3000
gaaatcaagc ccgaggcctt ggcctacatc accatcaaga ccaccctggc ctgcctgacc 3060
agcgcgaca ataccaccgt gcaggctgtc gcttctgcca tcggcagagc catcgaggac 3120
gaggccagat tcgcgagaat ccgggacctg gaagccaagc acttcaagaa aaacgtggag 3180
gaacagctga acaagcgcgt gggccacgtg tacaagaaag ccttcatgca ggtggtggag 3240
gccgacatgc tgagcaaggc cctgctgggc ggagaagcct ggtccagctg gcacaaagag 3300
gacagcatcc acgtcggcgt gcggtgcatc gagatgctga tcgagtcgac cggcatggtg 3360
tccctgcaca ggcagaatgc cggcgtggtg ggcaggaca gcgagacaat cgaactggcc 3420
cccagtatg ccgaggccat tgccacaaga gccggcctc tggccggcat cagccccatg 3480
ttccagccct gcgtggtgcc tcetaagccc tggacaggca tcacaggcgg cggatactgg 3540

ES 2 436 356 T3

gccaacggca gacgccctct ggctctggtg cggaccacaca gcaagaaagc cctgatgctc 3600
 tacgaggacg tgtacatgcc cgaggtgtac aaggccatca acattgcca gaacaccgcc 3660
 tggaagatca acaagaaagt gctggccgtg gccaatgtga tcaccaagtg gaagcactgc 3720
 cccgtggagg acatccccgc catcgagcgg gaggaactgc ccatgaagcc cgaggacatc 3780
 gacatgaacc ccgaggccct gacagcctgg aaaagggccg ctgccgccgt gtaccggaag 3840
 gacaaggccc ggaagtcccg gcggatcagc ctggagttca tgctggaaca ggccaacaag 3900
 ttgcceaacc acaaggccat ttggttccct tacaacatgg actggcgggg cagagtgtac 3960
 gccgtgagca tgttcaatcc acaaggcaac gacatgacca aggggctgct gaccctggcc 4020
 aagggcaagc ccatcgcaaa agagggctac tactggctga agatccacgg cgccaactgc 4080
 gctggcgtgg acaaggtgcc ctteccagag cggatcaagt tcatcgagga aaaccacgag 4140
 aacatcatgg cctgcgcca gacccctcta gaaacactt ggtgggcca gcaggacagc 4200
 cccttctgct tcctggcctt ctgctttgag tacgccggag tgcagcacca cggcctgagc 4260
 tacaactgca gcctgccctt ggccttcgat ggcagctgca gcggcatcca gcacttcagc 4320
 gccatgctga gggacgaagt gggcggcaga gccgtgaatc tgctgccaag cgagacagtg 4380
 caggacatct acgggatcgt ggccaagaaa gtgaacgaga tcctgcaggc cgacgccatc 4440
 aacggcaccg acaacgaggt ggtgaccgtg accgatgaga acaccggcga gatcagcag 4500
 aaagtgaagc tcggcaccaa ggcctggctt ggcagtgcc tggcctacgg cgtgaccaga 4560
 tccgtgacca agcggagcgt gatgacactg gcctatggca gcaaagagtt cggcttccgg 4620
 cagcaggtgc tggaagatac catcagcct gccatcgaca gcggcaagg gctgatgttc 4680
 acccagccca accaggccgc tggctacatg gccaaactca tatgggagag cgtgtccgtg 4740
 acagtgtgg cgcctgtgga ggccatgaat tggctgaagt ccgccgcca actgctggcc 4800
 gctgaagtga aggacaaaa gaccggcgaa atcctgcgga agagatgctc cgtgactgg 4860
 gtgacccccg atggcttccc cgtgtggcag gagtacaaga agcccatcca gaccggctg 4920
 aacctgatgt tcctgggcca gttcagactg cagccacca tcaacaccaa caaggactcc 4980
 gagatcgacg ccacaagca ggaaagcggc attgccccca acttcgtgca cagccaggac 5040
 ggcagccacc tgagaaagac cgtggtgtgg gctcacgaga agtacggcat cgagagcttc 5100
 gccctgatcc acgacagctt cggcaccatt cccgccgagc ccgccaacct gttcaaggcc 5160
 gtgcgggaga caatggtgga cacctacgag agctgcgagc tgctggccga cttctacgac 5220
 cagttcggc accagctgca cgagagccag ctggacaaga tgcccgccct gcccgccaag 5280
 gggaacctga acctgcggga catcctggaa agcgacttcg ccttcgctg a 5331

<210> 22
 <211> 2658
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> ORF del T7ARNP

10

<400> 22

ES 2 436 356 T3

atgctcgaga acaccatcaa tatcgccaag aacgacttca gcgacatcga gctggccgcc 60
 atccctttca acaccctggc cgaccactat ggcgagcggc tggccagaga acagctggcc 120
 ctggaacacg agagctacga aatggggcag gcccggttcc ggaagatggt cgagagacag 180
 ctgaaggccg gcgaggtggc cgataatgcc gccgctaagc ccctgatcac caccctgctg 240
 cccaagatga tcgcccggat caacgattgg ttcgaggaag tgaaggccaa gcggggcaag 300
 aggccaccg ccttccagtt tctgcaggaa atcaagcccg aggccgtggc ctacatcacc 360
 atcaagacca ccctggcctg cctgaccagc gccgacaata ccaccgtgca ggctgtcgtc 420
 tctgccatcg gcagagccat cgaggacgag gccagattcg gcagaatccg ggacctggaa 480
 gccaagcact tcaagaaaaa cgtggaggaa cagctgaaca agcgcgtggg ccacgtgtac 540
 aagaaagcct tcatgcaggt ggtggaggcc gacatgctga gcaaggcct gctgggcgga 600
 gaagcctggt ccagctggca caaagaggac agcatccacg tcggcgtgcg gtgcatcgag 660
 atgctgatcg agtcgaccgg catggtgtcc ctgcacaggc agaatgccgg cgtggtgggc 720
 caggacagcg agacaatcga actggccccc gagtatgccg aggccattgc cacaagagcc 780
 ggcgctctgg ccggcatcag ccccatgttc cagccctgcy tggtgccctcc taagccctgg 840
 acaggcatca caggcggcgg atactgggcc aacggcagac gccctctggc tctggtgcyg 900
 acccacagca agaaagccct gatgcyctac gaggacgtgt acatgcccg ggtgtacaag 960
 gccatcaaca ttgccagaa caccgcctgy aagatcaaca agaaagtgct ggccgtggcc 1020
 aatgtgatca ccaagtggaa gcaactgccc gtggaggaca tccccgcat cgagcgggag 1080
 gaactgcca tgaagcccga ggacatcgac atgaaccccg aggcctgac agcctgaaa 1140
 agggccgctg ccgccgtgta ccggaaggac aaggcccgga agtcccggcg gatcagcctg 1200
 gagttcatgc tggaacaggc caacaagttc gccaacaca aggccatttg gttcccttac 1260
 aacatggact ggcggggcag agtgtacgcc gtgagcatgt tcaatccaca aggcaacgac 1320
 atgaccaagg ggtgctgac cctggccaag ggcaagcca tcggcaaaga gggctactac 1380
 tggctgaaga tccacggcgc caactgcyct ggcgtggaca aggtgccctt cccagagcgg 1440
 atcaagtca tcgaggaaaa ccacgagaac atcatggcct gcgccaagag ccctctagaa 1500
 aacacttggg gggccgagca ggacagccc ttctgcttcc tggccttctg ctttgagtac 1560
 gccggagtgc agcaccacgg cctgagctac aactgcagcc tggccctggc cttcgatggc 1620
 agctgcagcg gcatccagca cttcagcgc atgctgaggg acgaagtggg cggcagagcc 1680
 gtgaatctgc tgccaagcga gacagtgcag gacatctacg ggatcgtggc caagaaagtg 1740
 aacgagatcc tgcaggccga cgccatcaac ggcaccgaca acgaggtggt gaccgtgacc 1800

ES 2 436 356 T3

gatgagaaca cggcgagat cagcgagaaa gtgaagctcg gcaccaaggc cctggctggc 1860
 cagtggctgg cctacggcgt gaccagatcc gtgaccaagc ggagcgtgat gacactggcc 1920
 tatggcagca aagagttcgg cttccggcag caggtgctgg aagataccat ccagcctgcc 1980
 atcgacagcg gcaaggggct gatgttcacc cagcccaacc aggcogctgg ctacatggcc 2040
 aagctcatat gggagagcgt gtccgtgaca gtggtggccg ccgtggaggc catgaattgg 2100
 ctgaagtccg ccgcaaaact gctggccgct gaagtgaagg acaaaaagac cggcgaaatc 2160
 ctgcggaaga gatgcgcctg gcaactgggtg acccccgatg gcttccccgt gtggcaggag 2220
 tacaagaagc ccatccagac ccggctgaac ctgatgttcc tgggccagtt cagactgcag 2280
 cccaccatca acaccaacaa ggactccgag atcgacgccc acaagcagga aagcggcatt 2340
 gccccaact tcgtgcacag ccaggacggc agccacctga gaaagaccgt ggtgtgggct 2400
 cacgagaagt acggcatcga gagcttcgcc ctgatccacg acagcttcgg caccattccc 2460
 gccgacgccg ccaacctggt caaggccgtg cgggagacaa tgggtggacac ctacgagagc 2520
 tgcgacgtgc tggccgactt ctacgaccag ttcgccgacc agctgcacga gagccagctg 2580
 gacaagatgc ccgccctgcc cgccaagggg aacctgaacc tgcgggacat cctgaaagc 2640
 gacttcgcct tcgcctga 2658

<210> 23
 <211> 2667
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Marco abierto de lectura del plásmido pT3ARNP

10

<400> 23

atggaattcc tcgagaacat catcgagaat atcgagaaga acgacttctc cgagatcgag 60
 ctggccgcca tccccctcaa caccctggcc gaccactacg gctccgccct ggccaaagag 120
 cagctggccc tggaaacatga gtccctacgag ctgggcgagc ggcggttcct gaagatgctg 180
 gaacggcagg ccaaggccgg cgagatcgcc gataacgccg ctgccaaagcc cctgctggcc 240
 accctgctgc ctaagctgac caccocgatc gtggaatggc tggaaagagta cgcctccaag 300
 aaggccgga agccctccgc ctacgccctt ctgcagctgc tgaagcctga agcctccgcc 360
 ttcattaccg tgaagtgat cctggcctcc ctgacctcca ccaacatgac caccatccag 420
 gccgctgccg gcatgctggg caaggccatc gaggacgagg ccagattcgg ccggattcgg 480
 gacctggaag ccaagcactt caagaagcac gtcgaggaac agctgaacaa gcggcacggc 540
 caggtgtaca agaaagcctt catgcaggtc gtggaagccg acatgatcgg cagaggactg 600
 ctgggaggag aggcttggtc ctccctgggac aaagaaacca ccatgcacgt gggcatccgg 660
 ctgatcgaga tgctgatcga gtcaaccggg ctggtggaac tgcagcggca caacgcaggc 720

ES 2 436 356 T3

aatgctggct ctgatcacga ggccctgcag ctggctcagg aatacgtgga cgtgctggcc 780
aagcgggctg gcgctctggc tggcatctcc cccatgttcc agccctgcgt ggtgccccca 840
aagccatggg tggccatcac cggcggaggc tactgggcca acggcagacg acctctggcc 900
ctggtccgaa cccactccaa gaaaggcctg atgagatacg aggacgtgta catgcccgaa 960
gtgtacaagg ccgtgaacct ggcccagaat accgcctgga agatcaacaa gaaagtgctg 1020
gccgtgtca acgagatcgt gaactggaag aactgccccg tggccgacat ccccagcctg 1080
gaaagacagg aactgcccc taagcccagc gacatcgaca ccaacgaggc cgcctgaaa 1140
gagtgaaga aggctgccgc tggcatctac cggctggaca aggcccgggt gtcacggcgg 1200
atctccctgg agttcatgct ggaacaggcc aacaagtctg ccagcaagaa ggccatctg 1260
ttcccttaca acatggactg gcggggcaga gtgtacgccg tgcccatggt caatccacag 1320
ggcaacgaca tgaccaaggg cctgtgacc ctggccaagg gcaagcccat cggcggaggaa 1380
ggcttctact ggctgaagat ccacggcgc aactgtgccg gggtggacaa ggtgcccttc 1440
ccagagcggg tgccttcat cgagaagcac gtggacgaca tcctggcctg cggcaaggac 1500
cccatcaaca acacttggtg ggccgagcag gactccccct tctgttctct ggcttctgt 1560
ttcgagtacg caggcgtgac ccaccaaggc ctgtcctaca actgtccct gccctggcc 1620
ttcgacggct cctgctctgg catccagcac ttctccgcca tgctgcgga cgaagtggc 1680
ggcagagccg tgaatctgct gccctccgag acagtgcagg acatctacgg catcgtggcc 1740
cagaaagtga acgagatcct gaagcaggac gccatcaacg gcacccccaa cgagatgatc 1800
accgtgaccg acaaggacac aggcgagatc tccgagaagc tgaagctggg cacctccacc 1860
ctggctcagc agtggctggc ctacggcgtg accagatccg tgaccaacg gagcgtgatg 1920
accctggctt acggctccaa agagtccggc ttccggcagc aggtcctgga cgacaccatc 1980
cagcctgcca tcgactccgg caaggcctg atgttcccc agccccacca ggctgccggc 2040
tacatggcca agctgatctg ggacgccgtg tccgtgactg tgggtggcgc cgtggaagcc 2100
atgaattggc tgaagtccgc cgcaaagctg ctggccgccg aagtgaagga caaaaagacc 2160
aaagagatcc tgcggcacag atgcgccgtg cactggacca ccccgcagcg ctttcccgtg 2220
tggcaggaat accggaagcc cctgcagaaa cggctggata tgatcttctt gggccagttc 2280
cgactgcagc ccaccatcaa taccctgaag gactccggca tcgacgcca caagcaggaa 2340
agcggaatcg cccccaactt cgtgcacagc caggacggct cccacctgag aatgacagtg 2400
gtgtacgccc acgagaagta cggcatcgag tccttcgccc tgatccacga ctcttcggc 2460
accatccctg ccgacgcccg aaagctgttc aaggccgtgc gggaaacat ggtcatcacc 2520
tacgagaaca acgatgtgct ggccgacttc tacagccagt tcgccacca gctgcacgag 2580
acacagctgg acaagatgcc cccctgcct aagaagggca acctgaacct gcaggatatt 2640
ctgaagtccg acttcgcctt cgcttga 2667

<210> 24
<211> 888
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia de proteína codificada por plásmido pT3ARNP

<400> 24

ES 2 436 356 T3

Met Glu Phe Leu Glu Asn Ile Ile Glu Asn Ile Glu Lys Asn Asp Phe
 1 5 10 15

Ser Glu Ile Glu Leu Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His
 20 25 30

Tyr Gly Ser Ala Leu Ala Lys Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser
 35 40 45

Tyr Glu Leu Gly Glu Arg Arg Phe Leu Lys Met Leu Glu Arg Gln Ala
 50 55 60

Lys Ala Gly Glu Ile Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Leu Ala
 65 70 75 80

Thr Leu Leu Pro Lys Leu Thr Thr Arg Ile Val Glu Trp Leu Glu Glu
 85 90 95

Tyr Ala Ser Lys Lys Gly Arg Lys Pro Ser Ala Tyr Ala Pro Leu Gln
 100 105 110

Leu Leu Lys Pro Glu Ala Ser Ala Phe Ile Thr Leu Lys Val Ile Leu
 115 120 125

Ala Ser Leu Thr Ser Thr Asn Met Thr Thr Ile Gln Ala Ala Ala Gly
 130 135 140

Met Leu Gly Lys Ala Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg
 145 150 155 160

Asp Leu Glu Ala Lys His Phe Lys Lys His Val Glu Glu Gln Leu Asn
 165 170 175

Lys Arg His Gly Gln Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu
 180 185 190

Ala Asp Met Ile Gly Arg Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser
 195 200 205

Trp Asp Lys Glu Thr Thr Met His Val Gly Ile Arg Leu Ile Glu Met

ES 2 436 356 T3

Pro Glu Arg Ile Ala Phe Ile Glu Lys His Val Asp Asp Ile Leu Ala
 485 490 495

Cys Ala Lys Asp Pro Ile Asn Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser
 500 505 510

Pro Phe Cys Phe Leu Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Thr His
 515 520 525

His Gly Leu Ser Tyr Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser
 530 535 540

Cys Ser Gly Ile Gln His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly
 545 550 555 560

Gly Arg Ala Val Asn Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr
 565 570 575

Gly Ile Val Ala Gln Lys Val Asn Glu Ile Leu Lys Gln Asp Ala Ile
 580 585 590

Asn Gly Thr Pro Asn Glu Met Ile Thr Val Thr Asp Lys Asp Thr Gly
 595 600 605

Glu Ile Ser Glu Lys Leu Lys Leu Gly Thr Ser Thr Leu Ala Gln Gln
 610 615 620

Trp Leu Ala Tyr Gly Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met
 625 630 635 640

Thr Leu Ala Tyr Gly Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu
 645 650 655

Asp Asp Thr Ile Gln Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe
 660 665 670

Thr Gln Pro Asn Gln Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Asp
 675 680 685

Ala Val Ser Val Thr Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu
 690 695 700

Lys Ser Ala Ala Lys Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr
 705 710 715 720

Lys Glu Ile Leu Arg His Arg Cys Ala Val His Trp Thr Thr Pro Asp
 725 730 735

ES 2 436 356 T3

Gly Phe Pro Val Trp Gln Glu Tyr Arg Lys Pro Leu Gln Lys Arg Leu
 740 745 750

Asp Met Ile Phe Leu Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr
 755 760 765

Leu Lys Asp Ser Gly Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala
 770 775 780

Pro Asn Phe Val His Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Met Thr Val
 785 790 795 800

Val Tyr Ala His Glu Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His
 805 810 815

Asp Ser Phe Gly Thr Ile Pro Ala Asp Ala Gly Lys Leu Phe Lys Ala
 820 825 830

Val Arg Glu Thr Met Val Ile Thr Tyr Glu Asn Asn Asp Val Leu Ala
 835 840 845

Asp Phe Tyr Ser Gln Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Thr Gln Leu Asp
 850 855 860

Lys Met Pro Pro Leu Pro Lys Lys Gly Asn Leu Asn Leu Gln Asp Ile
 865 870 875 880

Leu Lys Ser Asp Phe Ala Phe Ala
 885

<210> 25
 <211> 2637
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Marco de lectura abierto del plásmido pSP6ARNP

<400> 25

atggaattcc tcgagcagga cctgcacgcc attcagctgc agctggaaga ggaaatgttc 60
 aacggcggca tcagaagatt cgaggccgac cagcagcgac agattgccgc tggctccgag 120
 tctgacacag cctggaaccg gcggtgctg tctgagctga tcgccctat ggccgagggc 180
 atccaggcct acaaagagga atacgagggc aagaagggca gagccccag agccctggcc 240
 ttctgcagt gcgtgaaaa tgaggctgcc gcctacatca ccatgaaggt ggtcatggac 300
 atgctgaaca ccgacgccac cctgcaggct atcgccatgt ctgtggccga gcggatcgag 360
 gaccaggtcc gattctccaa gctggaaggc cagcccgcca agtacttcga gaaagtgaag 420
 aagtcctcga aggcctccc gaccaagtcc taccggcacg cccacaacgt ggccgtggtg 480

ES 2 436 356 T3

gccgagaagt ccgtggctga gaaggacgcc gacttcgaca gatgggagggc ctggcccaaa 540
 gagacacagc tgcagatcgg caccaccctg ctggaattc tggaaggctc cgtgttctac 600
 aacggcgagc ccgtgttcat gcgggccatg agaacctacg gcggcaagac catctactac 660
 ctgcagacct ccgagtcctg gggccagtgg atctccgctt tcaaagaaca cgtggcccag 720
 ctgtcccccg cctacgcccc ttgtgtgatc cctccccgac cttggcggac ccccttcaat 780
 ggcggcttcc acaccgagaa ggtggcctct cggatccggc tggtaagggg caaccgcgag 840
 cacgtgcgga agctgaccca gaaacagatg cccaagggtg acaaggccat caaccgctg 900
 cagaaccccc agtggcagat caacaaggac gtgctggccg tgatcgagga agtgatcaga 960
 ctggacctgg gctacggcgt gccagcttc aagcccctga tcgacaaaga gaacaagccc 1020
 gccaaccccc tgcccgtgga atttcagcac ctgagaggcc gcgagctgaa agagatgctg 1080
 tcccctgagc agtggcagca gttcatcaac tggaaggggc agtgccgacg actgtacacc 1140
 gccgagacaa agcggggctc caagtctgcc gccgtcgtgc gaatggtcgg acaggcccgg 1200
 aagtactccg ccttcgagtc catctacttc gtgtacgcca tggactcccg gtcccgggtg 1260
 tacgtgcagt cctccaccct gtccccccag tccaacgacc tgggcaaggc cctgctgagg 1320
 ttcaccgagg gcagacctgt gaacggcgtg gaagccctga agtggttctg catcaatggc 1380
 gccaacctgt ggggctggga caagaaaacc ttcgacgtgc ggggtgtcaa cgtgctggac 1440
 gaagagtacc aggacatgtg ccgggatata gccgcccacc ccctgacctt taccagtggt 1500
 gccaaaggccg acgcccccta cgagttctct gcctgggtgt tcgagtacgc ccagtacctg 1560
 gacctggtgg acgagggcag ggccgacgag ttccggaccc atctgcccgt gcaccaggac 1620
 ggcagctgct ctggcatcca gcactactcc gccatgctgc gggacgaagt gggcgctaag 1680
 gccgtgaacc tgaagccttc cgatgcccct caggacatct acggagccgt ggctcaggtg 1740
 gtcacatcaaga aaaacgccct gtacatggac gccgacgacg ccaccacctt cacctccggc 1800
 tccgtgacct tgtccggcac cgagctgaga gctatggcct ccgcctggga ctccatcggc 1860
 atcaccgggt ccctgaccaa gaaaccctg atgaccctgc cctacggctc caccagactg 1920
 acctgcccgg agtccgtgat cgactacatc gtggacctgg aagagaaaga ggcccagaag 1980
 gccgtcggcg agggcaggac cgccaacaag gtgcaccctt tcgaggacga ccggcaggac 2040
 tacctgacct ctggcgccgc ttacaactac atgaccgccc tgatctggcc ctccatctcc 2100
 gaggtggtca aggcccccat tgtggccatg aagatgatcc ggcagctggc cagattcgcc 2160
 gccaaagaaa acgagggcct gatgtacacc ctgccaccg gcttcattct ggaacagaaa 2220
 atcatggcca ccgagatgct gagagtgcgg acctgcctga tggcgacat caagatgtcc 2280
 ctgcaggtcg agacagacat cgtggatgag gccgcatga tggcgctgc cggccetaac 2340
 ttcgtgcacg gccacgacgc ctcccacctg atcctgaccg tgtgcgagct ggtggataag 2400
 ggcgtgacct ctatcgccgt gatccacgac tccttcggca cccacgcccga caacacactg 2460
 accctgcggg tggccctgaa gggccagatg gtggccatgt acatcgacgg caatgctctg 2520
 cagaagctgc tggaagaaca cgaagtgcgg tggatggtgg acaccggcat cgaggtcccc 2580
 gagcagggag agttcgacct gaacgagatc atggactccg agtacgtgtt cgcttga 2637

5 <210> 26
<211> 878

ES 2 436 356 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia de proteína codificada por plásmido pSP6ARNP

<400> 26

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

10

ES 2 436 356 T3

Ile Leu Glu Gly Ser Val Phe Tyr Asn Gly Glu Pro Val Phe Met Arg
 195 200 205

Ala Met Arg Thr Tyr Gly Gly Lys Thr Ile Tyr Tyr Leu Gln Thr Ser
 210 215 220

Glu Ser Val Gly Gln Trp Ile Ser Ala Phe Lys Glu His Val Ala Gln
 225 230 235 240

Leu Ser Pro Ala Tyr Ala Pro Cys Val Ile Pro Pro Arg Pro Trp Arg
 245 250 255

Thr Pro Phe Asn Gly Gly Phe His Thr Glu Lys Val Ala Ser Arg Ile
 260 265 270

Arg Leu Val Lys Gly Asn Arg Glu His Val Arg Lys Leu Thr Gln Lys
 275 280 285

Gln Met Pro Lys Val Tyr Lys Ala Ile Asn Ala Leu Gln Asn Thr Gln
 290 295 300

Trp Gln Ile Asn Lys Asp Val Leu Ala Val Ile Glu Glu Val Ile Arg
 305 310 315 320

Leu Asp Leu Gly Tyr Gly Val Pro Ser Phe Lys Pro Leu Ile Asp Lys
 325 330 335

Glu Asn Lys Pro Ala Asn Pro Val Pro Val Glu Phe Gln His Leu Arg
 340 345 350

Gly Arg Glu Leu Lys Glu Met Leu Ser Pro Glu Gln Trp Gln Gln Phe
 355 360 365

Ile Asn Trp Lys Gly Glu Cys Ala Arg Leu Tyr Thr Ala Glu Thr Lys
 370 375 380

Arg Gly Ser Lys Ser Ala Ala Val Val Arg Met Val Gly Gln Ala Arg
 385 390 395 400

Lys Tyr Ser Ala Phe Glu Ser Ile Tyr Phe Val Tyr Ala Met Asp Ser
 405 410 415

Arg Ser Arg Val Tyr Val Gln Ser Ser Thr Leu Ser Pro Gln Ser Asn
 420 425 430

Asp Leu Gly Lys Ala Leu Leu Arg Phe Thr Glu Gly Arg Pro Val Asn
 435 440 445

ES 2 436 356 T3

Gly Val Glu Ala Leu Lys Trp Phe Cys Ile Asn Gly Ala Asn Leu Trp
450 455 460

Gly Trp Asp Lys Lys Thr Phe Asp Val Arg Val Ser Asn Val Leu Asp
465 470 475 480

Glu Glu Phe Gln Asp Met Cys Arg Asp Ile Ala Ala Asp Pro Leu Thr
485 490 495

Phe Thr Gln Trp Ala Lys Ala Asp Ala Pro Tyr Glu Phe Leu Ala Trp
500 505 510

Cys Phe Glu Tyr Ala Gln Tyr Leu Asp Leu Val Asp Glu Gly Arg Ala
515 520 525

Asp Glu Phe Arg Thr His Leu Pro Val His Gln Asp Gly Ser Cys Ser
530 535 540

Gly Ile Gln His Tyr Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Ala Lys
545 550 555 560

Ala Val Asn Leu Lys Pro Ser Asp Ala Pro Gln Asp Ile Tyr Gly Ala
565 570 575

Val Ala Gln Val Val Ile Lys Lys Asn Ala Leu Tyr Met Asp Ala Asp
580 585 590

Asp Ala Thr Thr Phe Thr Ser Gly Ser Val Thr Leu Ser Gly Thr Glu
595 600 605

Leu Arg Ala Met Ala Ser Ala Trp Asp Ser Ile Gly Ile Thr Arg Ser
610 615 620

Leu Thr Lys Lys Pro Val Met Thr Leu Pro Tyr Gly Ser Thr Arg Leu
625 630 635 640

Thr Cys Arg Glu Ser Val Ile Asp Tyr Ile Val Asp Leu Glu Glu Lys
645 650 655

Glu Ala Gln Lys Ala Val Ala Glu Gly Arg Thr Ala Asn Lys Val His
660 665 670

Pro Phe Glu Asp Asp Arg Gln Asp Tyr Leu Thr Pro Gly Ala Ala Tyr
675 680 685

Asn Tyr Met Thr Ala Leu Ile Trp Pro Ser Ile Ser Glu Val Val Lys
690 695 700

ES 2 436 356 T3

Ala Pro Ile Val Ala Met Lys Met Ile Arg Gln Leu Ala Arg Phe Ala
705 710 715 720

Ala Lys Arg Asn Glu Gly Leu Met Tyr Thr Leu Pro Thr Gly Phe Ile
725 730 735

Leu Glu Gln Lys Ile Met Ala Thr Glu Met Leu Arg Val Arg Thr Cys
740 745 750

Leu Met Gly Asp Ile Lys Met Ser Leu Gln Val Glu Thr Asp Ile Val
755 760 765

Asp Glu Ala Ala Met Met Gly Ala Ala Ala Pro Asn Phe Val His Gly
770 775 780

His Asp Ala Ser His Leu Ile Leu Thr Val Cys Glu Leu Val Asp Lys
785 790 795 800

Gly Val Thr Ser Ile Ala Val Ile His Asp Ser Phe Gly Thr His Ala
805 810 815

Asp Asn Thr Leu Thr Leu Arg Val Ala Leu Lys Gly Gln Met Val Ala
820 825 830

Met Tyr Ile Asp Gly Asn Ala Leu Gln Lys Leu Leu Glu Glu His Glu
835 840 845

Val Arg Trp Met Val Asp Thr Gly Ile Glu Val Pro Glu Gln Gly Glu
850 855 860

Phe Asp Leu Asn Glu Ile Met Asp Ser Glu Tyr Val Phe Ala
865 870 875

<210> 27
<211> 2547
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Marco abierto de lectura del plásmido pD1R

<400> 27
atggaattcg acgccaacgt ggtgtcctcc tccacaatcg ccacctacat cgacgcctg 60
gccaagaacg cctccgagct ggaacagcgg tccaccgcct acgagatcaa caatgagctg 120
gaactggtgt tcactcaagcc ccccctgatc accctgacca acgtggtcaa catcagcacc 180
atccaggaat ccttcatccg gttcaccgtg accaacaag aaggcgtgaa gatccggacc 240
aagatcccc tgtccaaggt gcacggcctg gacgtgaaga acgtgcagct ggtggacgcc 300
atcgacaaca tcgtgtggga gaagaagtcc ctggtcaccg agaaccggct gcacaaagag 360

ES 2 436 356 T3

tgcctgctgc ggctgtccac cgaggaacgg cacatcttcc tggactacaa gaagtacggc 420
 toctccatca gactggaact ggtcaacctg atccaggcca agaccaagaa cttcaccatc 480
 gacttcaage tgaagtactt cctgggctct ggcgccaggt ccaagtccctc tctgctgcac 540
 gccatcaacc accccaagtc ccggcccaac acctccctgg aaatcgagtt caccctcggg 600
 gacaacgaga cagtgcccta cgacgagctg atcaaagagc tgaccaccct gtccagacac 660
 atcttcatgg cctccccga gaacgtgatc ctgtccccc ccatcaacgc ccccatcaag 720
 accttcatgc tgcccaagca ggacatcgtg ggctggacc tggaaaacct gtacgccgtg 780
 accaagaccg acggcatccc catcaccatc agagtgaacct ccaacggcct gtactgctac 840
 ttcaccacc tgggtacat catcagatac cccgtgaagc ggatcatcga ctccgaggtg 900
 gtggtgttcg gcgaggccgt gaaggacaag aactggaccg tgtacctgat caagctgatc 960
 gagccctga acgccatcaa tgaccggctg gaagagtcca aatacgtgga atccaagctg 1020
 gtggatatct gcgaccgat cgtgttcaag tctaagaagt acgagggacc cttcactaca 1080
 acttcagagg tggctgacat gctgtccacc tacctgccta agcagcccga gggcgtcatc 1140
 ctggttctact ccaaggacc caagtccaac atcgatttca agatcaagaa agagaacacc 1200
 atcgaccaga ccgccaatgt ggtgttccgg tacatgtcct ccgagcccat catcttcggc 1260
 gagtctcca tcttctgca gtacaagaag ttctccaacg acaagggtt ccccaaagag 1320
 tacggcagcg gcaagatcgt gctgtacaac ggcgtgaact acctgaacaa catctactgc 1380
 ctggagtaca tcaacacca caacgaagtg ggcacaaat ccgtgggtgt gccatcaag 1440
 tttatgccg agttcctggt caacggcgag atcctgaagc ccgggatcga caagaccatg 1500
 aagtacatca attccgagga ctactacggc aaccagcaca acatcatcgt ggaacacctg 1560
 agggaccagt ccatcaagat cggcgacatc ttcaacgagg acaagctgtc cgacgtgggc 1620
 caccagtacg ccaacaacga caagttccgg ctgaacccc aggtgtccta cttcaccac 1680
 aagagaaccc gaggccact gggcatcctg tccaactacg tgaaaacct gctgatctcc 1740
 atgtactget ccaagacctt cctggaagc tccaacaagc ggaaggtgct ggccatcgat 1800
 ttcggcaacg gcgccgatct ggaaggtac ttctatggg agatcgcct gctggtggct 1860
 accgacctg acgcccagc tatcgccaga ggcaacgagc ggtacaacaa gctgaactcc 1920
 ggcacaaaga ccaagtacta caagttcgac tacatccagg aaacctccg ctccgacacc 1980
 ttcgtgtcct ccgtgcgca ggtgttctat ttcggcaagt tcaatatcat cgactggcag 2040
 ttcgcatcc actacagctt ccacccccg cactacgcca ccgtgatgaa caacctgtcc 2100
 gagctgaccg cctccggcgg caaggtgctg atcaccacca tggacggcga caagctgagc 2160
 aagctgaccg acaagaaaac ctctcatc cacaagaacc tgccctccag cgagaactac 2220
 atgtccgtg aaaagatcgc cgacgacaga atcgtggtgt acaatccctc caccatgtcc 2280
 accccatga ccgagtacat catcaagaag aacgacatc tccgggtgtt caacgagtac 2340
 ggcttcgtgc tgggtggaaa cgtggacttc gccaccatca tcgagcggtc caaaaagttc 2400
 atcaatggag ccagcaccat ggaagatcgg cctctacc ggaacttct cgagctgaac 2460
 agaggcgcca tcaagtgcga gggcctggat gtggaagatc tgctgagcta ctacgtggtg 2520
 tacgtgttct ccaagagagg gccctga 2547

5 <210> 28
 <211> 848
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 436 356 T3

<220>

<223> Secuencia de proteína codificada por plásmido pD1R

5 <400> 28

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

ES 2 436 356 T3

180	185	190
Leu Glu Ile Glu Phe Thr Pro Arg Asp Asn Glu Thr Val Pro Tyr Asp 195 200 205		
Glu Leu Ile Lys Glu Leu Thr Thr Leu Ser Arg His Ile Phe Met Ala 210 215 220		
Ser Pro Glu Asn Val Ile Leu Ser Pro Pro Ile Asn Ala Pro Ile Lys 225 230 235 240		
Thr Phe Met Leu Pro Lys Gln Asp Ile Val Gly Leu Asp Leu Glu Asn 245 250 255		
Leu Tyr Ala Val Thr Lys Thr Asp Gly Ile Pro Ile Thr Ile Arg Val 260 265 270		
Thr Ser Asn Gly Leu Tyr Cys Tyr Phe Thr His Leu Gly Tyr Ile Ile 275 280 285		
Arg Tyr Pro Val Lys Arg Ile Ile Asp Ser Glu Val Val Val Phe Gly 290 295 300		
Glu Ala Val Lys Asp Lys Asn Trp Thr Val Tyr Leu Ile Lys Leu Ile 305 310 315 320		
Glu Pro Val Asn Ala Ile Asn Asp Arg Leu Glu Glu Ser Lys Tyr Val 325 330 335		
Glu Ser Lys Leu Val Asp Ile Cys Asp Arg Ile Val Phe Lys Ser Lys 340 345 350		
Lys Tyr Glu Gly Pro Phe Thr Thr Thr Ser Glu Val Val Asp Met Leu 355 360 365		
Ser Thr Tyr Leu Pro Lys Gln Pro Glu Gly Val Ile Leu Phe Tyr Ser 370 375 380		
Lys Gly Pro Lys Ser Asn Ile Asp Phe Lys Ile Lys Lys Glu Asn Thr 385 390 395 400		
Ile Asp Gln Thr Ala Asn Val Val Phe Arg Tyr Met Ser Ser Glu Pro 405 410 415		
Ile Ile Phe Gly Glu Ser Ser Ile Phe Val Glu Tyr Lys Lys Phe Ser 420 425 430		
Asn Asp Lys Gly Phe Pro Lys Glu Tyr Gly Ser Gly Lys Ile Val Leu 435 440 445		

ES 2 436 356 T3

Tyr Asn Gly Val Asn Tyr Leu Asn Asn Ile Tyr Cys Leu Glu Tyr Ile
 450 455 460

Asn Thr His Asn Glu Val Gly Ile Lys Ser Val Val Val Pro Ile Lys
 465 470 475 480

Phe Ile Ala Glu Phe Leu Val Asn Gly Glu Ile Leu Lys Pro Arg Ile
 485 490 495

Asp Lys Thr Met Lys Tyr Ile Asn Ser Glu Asp Tyr Tyr Gly Asn Gln
 500 505 510

His Asn Ile Ile Val Glu His Leu Arg Asp Gln Ser Ile Lys Ile Gly
 515 520 525

Asp Ile Phe Asn Glu Asp Lys Leu Ser Asp Val Gly His Gln Tyr Ala
 530 535 540

Asn Asn Asp Lys Phe Arg Leu Asn Pro Glu Val Ser Tyr Phe Thr Asn
 545 550 555 560

Lys Arg Thr Arg Gly Pro Leu Gly Ile Leu Ser Asn Tyr Val Lys Thr
 565 570 575

Leu Leu Ile Ser Met Tyr Cys Ser Lys Thr Phe Leu Asp Asp Ser Asn
 580 585 590

Lys Arg Lys Val Leu Ala Ile Asp Phe Gly Asn Gly Ala Asp Leu Glu
 595 600 605

Lys Tyr Phe Tyr Gly Glu Ile Ala Leu Leu Val Ala Thr Asp Pro Asp
 610 615 620

Ala Asp Ala Ile Ala Arg Gly Asn Glu Arg Tyr Asn Lys Leu Asn Ser
 625 630 635 640

Gly Ile Lys Thr Lys Tyr Tyr Lys Phe Asp Tyr Ile Gln Glu Thr Ile
 645 650 655

Arg Ser Asp Thr Phe Val Ser Ser Val Arg Glu Val Phe Tyr Phe Gly
 660 665 670

Lys Phe Asn Ile Ile Asp Trp Gln Phe Ala Ile His Tyr Ser Phe His
 675 680 685

Pro Arg His Tyr Ala Thr Val Met Asn Asn Leu Ser Glu Leu Thr Ala
 690 695 700

ES 2 436 356 T3

Ser Gly Gly Lys Val Leu Ile Thr Thr Met Asp Gly Asp Lys Leu Ser
705 710 715 720

Lys Leu Thr Asp Lys Lys Thr Phe Ile Ile His Lys Asn Leu Pro Ser
725 730 735

Ser Glu Asn Tyr Met Ser Val Glu Lys Ile Ala Asp Asp Arg Ile Val
740 745 750

Val Tyr Asn Pro Ser Thr Met Ser Thr Pro Met Thr Glu Tyr Ile Ile
755 760 765

Lys Lys Asn Asp Ile Val Arg Val Phe Asn Glu Tyr Gly Phe Val Leu
770 775 780

Val Asp Asn Val Asp Phe Ala Thr Ile Ile Glu Arg Ser Lys Lys Phe
785 790 795 800

Ile Asn Gly Ala Ser Thr Met Glu Asp Arg Pro Ser Thr Arg Asn Phe
805 810 815

Phe Glu Leu Asn Arg Gly Ala Ile Lys Cys Glu Gly Leu Asp Val Glu
820 825 830

Asp Leu Leu Ser Tyr Tyr Val Val Tyr Val Phe Ser Lys Arg Gly Pro
835 840 845

<210> 29
<211> 876
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Marco abierto de lectura del plásmido pD12L

<400> 29

```

atggaattcg acgagatcgt gaagaacatc cgcgagggca cccacgtgct gctgcccttc      60
tacgagacac tgcccagact gaacctgtcc ctgggcaagt cccccctgcc ctccttgaa      120
tacggcgcca actacttctt gcagatctcc agagtgaacg acctgaaccg gatgcccacc      180
gacatgctga agctgttcac ccacgacatc atgctgcccg agtccgacct ggacaagggtg      240
tacgagattc tgaagatcaa ctccgtgaag tactacggcc ggtccacaaa ggctgacgcc      300
gtggtggccg acctgtctgc ccggaacaag ctgttcaaga gagagcggga cgccatcaag      360
tccaacaacc acctgaccga gaacaacctg tacatctccg actacaagat gctgaccttc      420
gacgtgttcc ggcccctggt cgacttcgtg aacgagaagt actgcatcat caagctgccc      480
accctgttcg gcagaggcgt gatcgacacc atgcggatct actgctccct gttcaagaac      540
gtgcggtctg tgaagtgcgt gtccgactcc tggctgaagg actccgcat catggtggcc      600
    
```

ES 2 436 356 T3

tccgacgtgt gcaagaagaa cctggacctg ttcattgtccc acgtgaagtc cgtgaccaag 660
 tcatccagct ggaaggacgt gaactccgtg cagttctcca tectgaacaa ccccgtggac 720
 accgagttca tcaacaagtt tctggaattt tccaaccggg tgtacgaggc cctgtactac 780
 gtgcactccc tgctgtactc ctccatgacc tccgactcca agtccatcga gaacaaacat 840
 cagcgacggc tggccaagct gctgctgggg ccctga 876

<210> 30
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de proteína codificada por plásmido pD12L

10

<400> 30

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

ES 2 436 356 T3

Leu Phe Lys Asn Val Arg Leu Leu Lys Cys Val Ser Asp Ser Trp Leu
 180 185 190

Lys Asp Ser Ala Ile Met Val Ala Ser Asp Val Cys Lys Lys Asn Leu
 195 200 205

Asp Leu Phe Met Ser His Val Lys Ser Val Thr Lys Ser Ser Ser Trp
 210 215 220

Lys Asp Val Asn Ser Val Gln Phe Ser Ile Leu Asn Asn Pro Val Asp
 225 230 235 240

Thr Glu Phe Ile Asn Lys Phe Leu Glu Phe Ser Asn Arg Val Tyr Glu
 245 250 255

Ala Leu Tyr Tyr Val His Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Met Thr Ser Asp
 260 265 270

Ser Lys Ser Ile Glu Asn Lys His Gln Arg Arg Leu Val Lys Leu Leu
 275 280 285

Leu Gly Pro
 290

<210> 31
 <211> 2760
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> Marco abierto de lectura del plásmido pRR1234L-NP868R

<400> 31

```

atgctggaaa tcagggccgc cttcctgctg agaagaaaca ccgccctgcg gaccagagtg      60
gccgagctga gacagcgggt gcagcggctg cggaacatcg tgtcccagta cgagacaaga      120
tacggccccc tgggcgaggg caaagaattc gccagcctgg acaacctggt ggccagatac      180
cagcggtgct tcaacgacca gagcctgaag aacagcacca tcgagctgga aatccggttc      240
cagcagatca acttcctgct gttcaagacc gtgtacgagg ccctggtcgc ccaggaaatc      300
cccagcacca tcagccacag catccggctg atcaagaagg tgcaccacga gaaccactgc      360
cgggagaaga tcctgcccag cgagaacctg tacttcaaga aacagcccct gatgttcttc      420
aagttcagcg agcccgccg cctgggctgt aaagtgtccc tggccatcga gcagcccatc      480
cggaagttca tcctggacag cagcgtgctg gtccggctga agaaccggac caccttccg      540
gtgtccgagc tgtggaagat cgagctgacc atcgtgaagc agctgatggg cagcgaggtg      600
tcagccaagc tggccgcctt caagacctg ctgttcgaca cccccgagca gcagaccacc      660
aagaacatga tgaccctgat caaccccgac gacgagtacc tgtacgagat cgagatcgag      720
    
```

ES 2 436 356 T3

tacaccggca agcctgagag cctgacagcc gccgacgtga tcaagatcaa gaacaccgtg 780
ctgacactga tcagccccc aa ccacctgatg ctgaccgcct accaccaggc catcgagttt 840
atcgccagcc acatcctgag cagcgagatc ctgctggccc ggatcaagag cggcaagtgg 900
ggcctgaaga gactgctgcc ccaggtaag tccatgacca aggccgacta catgaagttc 960
tcccccccg tgggctacta cgtgaccgac aaggccgacg gcatccgggg cattgcccgtg 1020
atccaggaca ccagatcta cgtggtggcc gaccagctgt acagcctggg caccaccggc 1080
atcgagcccc tgaagcccac catcctggac ggcgagttca tgcccagaaa gaaagagttc 1140
tacggctttg acgtgatcat gtacgagggc aacctgctga ccagcaggg cttcgagaca 1200
cggatcgaga gcctgagcaa gggcatcaag gtgctgcagc ccttcaacat caaggccgag 1260
atgaagccct tcatcagcct gacctccgcc gacccaacg tgctgctgaa gaatttcgag 1320
agcatcttca agaagaaaac ccggccctac agcatcgacg gcatcatcct ggtggagccc 1380
ggcaacagct acctgaacac caacacctc aagtggaaac ccacctggga caacacctg 1440
gactttctgg tccggaagtg ccccgagtcc ctgaacctgc ccgagtacg cccaagaag 1500
ggcttcagcc tgcactctgt gttcgtggc atcagcggcg agctgttaa gaagctggcc 1560
ctgaactggt gccccggcta caccaagctg ttccccgtga ccagcggaa ccagaactac 1620
ttccccgtgc agttccagcc cagcgacttc cccctggcct tcctgtacta ccaccocgac 1680
accagcagct tcagcaacat cgatggcaag gtgctggaaa tgcggtgcct gaagcgggag 1740
atcaactacg tgcgctggga gatcgtgaag atccgggagg accggcagca ggatctgaaa 1800
accggcggct acttcggcaa cgaactcaag accgocgagc tgacctggct gaactacatg 1860
gacccttca gcttcgagga actggccaag ggaccocgag gcatgtactt cgctggcgcc 1920
aagaccggca totacagagc ccagaccgcc ctgatcagct tcatcaagca ggaaatcctc 1980
cagaagatca gccaccagag ctgggtgatc gacctgggca tcggcaaggg ccaggacctg 2040
ggcagatacc tggagccggc cgtgagacac ctggtcggca tcgataagga ccagacagcc 2100
ctggccgagc tgggtgtacc gaagttctcc cacgccacca ccagacagca caagcacgcc 2160
accaacatct acgtgctgca ccaggatctg gccgagcctg ccaaagaaat cagcgagaaa 2220
gtgcaccaga tctatggctt ccccaaagag ggcgcccagca gcatcgtgtc caacctgttc 2280
atccactacc tgatgaagaa caccocgagc gtcgagaacc tggctgtgct gtgccacaag 2340
ctgctgcagc ctggcggcat ggtctggtc accaccatgc tgggcgaaca ggtgctggaa 2400
ctgctgcagc agaaccggat cgaactgaac gaagtgtggg aggccccggga gaacgaggtg 2460
gtcaagttcg ccatcaagcg gctgttcaaa gaggacatcc tgcaggaaac cggccaggaa 2520
atcgcgctcc tgctgccctt cagcaacggc gacttctaca atgagtacct ggtcaacacc 2580
gcctttctga tcaagatfff caagcaccat ggetttagcc tcgtgcagaa gcagagottc 2640
aaggactgga tccccgagtt ccagaacttc agcaagagcc tgtacaagat cctgaccgag 2700
gccgacaaga cctggaccag cctgttcggc ttcatctgcc tcggaagaa cgggccctga 2760

5 <210> 32
<211> 919
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>

ES 2 436 356 T3

<223> Secuencia de proteína codificada por plásmido pRR1234L-NP868R

<400> 32

```

Met Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Arg Arg Asn Thr Ala Leu
1           5           10           15

Arg Thr Arg Val Ala Glu Leu Arg Gln Arg Val Gln Arg Leu Arg Asn
                20           25           30

Ile Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr Gly Pro Leu Gly Gly Gly Lys
        35           40           45

Glu Phe Ala Ser Leu Asp Asn Leu Val Ala Arg Tyr Gln Arg Cys Phe
        50           55           60

Asn Asp Gln Ser Leu Lys Asn Ser Thr Ile Glu Leu Glu Ile Arg Phe
65           70           75           80

Gln Gln Ile Asn Phe Leu Leu Phe Lys Thr Val Tyr Glu Ala Leu Val
                85           90           95

Ala Gln Glu Ile Pro Ser Thr Ile Ser His Ser Ile Arg Cys Ile Lys
        100           105

Lys Val His His Glu Asn His Cys Arg Glu Lys Ile Leu Pro Ser Glu
        115           120           125

Asn Leu Tyr Phe Lys Lys Gln Pro Leu Met Phe Phe Lys Phe Ser Glu
        130           135           140

Pro Ala Ser Leu Gly Cys Lys Val Ser Leu Ala Ile Glu Gln Pro Ile
145           150           155           160

Arg Lys Phe Ile Leu Asp Ser Ser Val Leu Val Arg Leu Lys Asn Arg
                165           170           175

Thr Thr Phe Arg Val Ser Glu Leu Trp Lys Ile Glu Leu Thr Ile Val
                180           185           190

Lys Gln Leu Met Gly Ser Glu Val Ser Ala Lys Leu Ala Ala Phe Lys
        195           200           205

```

5

ES 2 436 356 T3

Thr Leu Leu Phe Asp Thr Pro Glu Gln Gln Thr Thr Lys Asn Met Met
 210 215 220

Thr Leu Ile Asn Pro Asp Asp Glu Tyr Leu Tyr Glu Ile Glu Ile Glu
 225 230 235 240

Tyr Thr Gly Lys Pro Glu Ser Leu Thr Ala Ala Asp Val Ile Lys Ile
 245 250 255

Lys Asn Thr Val Leu Thr Leu Ile Ser Pro Asn His Leu Met Leu Thr
 260 265 270

Ala Tyr His Gln Ala Ile Glu Phe Ile Ala Ser His Ile Leu Ser Ser
 275 280 285

Glu Ile Leu Leu Ala Arg Ile Lys Ser Gly Lys Trp Gly Leu Lys Arg
 290 295 300

Leu Leu Pro Gln Val Lys Ser Met Thr Lys Ala Asp Tyr Met Lys Phe
 305 310 315 320

Tyr Pro Pro Val Gly Tyr Tyr Val Thr Asp Lys Ala Asp Gly Ile Arg
 325 330 335

Gly Ile Ala Val Ile Gln Asp Thr Gln Ile Tyr Val Val Ala Asp Gln
 340 345 350

Leu Tyr Ser Leu Gly Thr Thr Gly Ile Glu Pro Leu Lys Pro Thr Ile
 355 360 365

Leu Asp Gly Glu Phe Met Pro Glu Lys Lys Glu Phe Tyr Gly Phe Asp
 370 375 380

Val Ile Met Tyr Glu Gly Asn Leu Leu Thr Gln Gln Gly Phe Glu Thr
 385 390 395 400

Arg Ile Glu Ser Leu Ser Lys Gly Ile Lys Val Leu Gln Ala Phe Asn
 405 410 415

Ile Lys Ala Glu Met Lys Pro Phe Ile Ser Leu Thr Ser Ala Asp Pro
 420 425 430

Asn Val Leu Leu Lys Asn Phe Glu Ser Ile Phe Lys Lys Lys Thr Arg
 435 440 445

Pro Tyr Ser Ile Asp Gly Ile Ile Leu Val Glu Pro Gly Asn Ser Tyr
 450 455 460

ES 2 436 356 T3

Leu Asn Thr Asn Thr Phe Lys Trp Lys Pro Thr Trp Asp Asn Thr Leu
 465 470 475 480
 Asp Phe Leu Val Arg Lys Cys Pro Glu Ser Leu Asn Val Pro Glu Tyr
 485 490 495
 Ala Pro Lys Lys Gly Phe Ser Leu His Leu Leu Phe Val Gly Ile Ser
 500 505 510
 Gly Glu Leu Phe Lys Lys Leu Ala Leu Asn Trp Cys Pro Gly Tyr Thr
 515 520 525
 Lys Leu Phe Pro Val Thr Gln Arg Asn Gln Asn Tyr Phe Pro Val Gln
 530 535 540
 Phe Gln Pro Ser Asp Phe Pro Leu Ala Phe Leu Tyr Tyr His Pro Asp
 545 550 555 560
 Thr Ser Ser Phe Ser Asn Ile Asp Gly Lys Val Leu Glu Met Arg Cys
 565 570 575
 Leu Lys Arg Glu Ile Asn Tyr Val Arg Trp Glu Ile Val Lys Ile Arg
 580 585 590
 Glu Asp Arg Gln Gln Asp Leu Lys Thr Gly Gly Tyr Phe Gly Asn Asp
 595 600 605
 Phe Lys Thr Ala Glu Leu Thr Trp Leu Asn Tyr Met Asp Pro Phe Ser
 610 615 620
 Phe Glu Glu Leu Ala Lys Gly Pro Ser Gly Met Tyr Phe Ala Gly Ala
 625 630 635 640
 Lys Thr Gly Ile Tyr Arg Ala Gln Thr Ala Leu Ile Ser Phe Ile Lys
 645 650 655
 Gln Glu Ile Ile Gln Lys Ile Ser His Gln Ser Trp Val Ile Asp Leu
 660 665 670
 Gly Ile Gly Lys Gly Gln Asp Leu Gly Arg Tyr Leu Asp Ala Gly Val
 675 680 685
 Arg His Leu Val Gly Ile Asp Lys Asp Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu
 690 695 700
 Val Tyr Arg Lys Phe Ser His Ala Thr Thr Arg Gln His Lys His Ala
 705 710 715 720

ES 2 436 356 T3

Thr Asn Ile Tyr Val Leu His Gln Asp Leu Ala Glu Pro Ala Lys Glu
725 730 735

Ile Ser Glu Lys Val His Gln Ile Tyr Gly Phe Pro Lys Glu Gly Ala
740 745 750

Ser Ser Ile Val Ser Asn Leu Phe Ile His Tyr Leu Met Lys Asn Thr
755 760 765

Gln Gln Val Glu Asn Leu Ala Val Leu Cys His Lys Leu Leu Gln Pro
770 775 780

Gly Gly Met Val Trp Phe Thr Thr Met Leu Gly Glu Gln Val Leu Glu
785 790 795 800

Leu Leu His Glu Asn Arg Ile Glu Leu Asn Glu Val Trp Glu Ala Arg
805 810 815

Glu Asn Glu Val Val Lys Phe Ala Ile Lys Arg Leu Phe Lys Glu Asp
820 825 830

Ile Leu Gln Glu Thr Gly Gln Glu Ile Gly Val Leu Leu Pro Phe Ser
835 840 845

Asn Gly Asp Phe Tyr Asn Glu Tyr Leu Val Asn Thr Ala Phe Leu Ile
850 855 860

Lys Ile Phe Lys His His Gly Phe Ser Leu Val Gln Lys Gln Ser Phe
865 870 875 880

Lys Asp Trp Ile Pro Glu Phe Gln Asn Phe Ser Lys Ser Leu Tyr Lys
885 890 895

Ile Leu Thr Glu Ala Asp Lys Thr Trp Thr Ser Leu Phe Gly Phe Ile
900 905 910

Cys Leu Arg Lys Asn Gly Pro
915

<210> 33
<211> 2688
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Marco abierto de lectura del plásmido pRR1234L-DIR

<400> 33

atgctggaaa tcagggccgc cttcctgcgg agaagaaca ccgccctgcg gaccagagtg 60
gccgagctga gacagcgggt gcagcggctg cggaacatcg tgtcccagta cgagacaaga 120

ES 2 436 356 T3

tacggccccc tgggcggagg caaagaattc gacgccaacg tgggtgcctc ctccacaatc 180
gccacctaca tcgacgccct ggccaagaac gcctccgagc tggaacagcg gtccaccgcc 240
tacgagatca acaatgagct ggaactggtg ttcataaagc cccccctgat caccctgacc 300
aacgtggtca acatcagcac catccaggaa tccttcatac ggttcaccgt gaccaacaaa 360
gaaggcgtga agatccggac caagatcccc ctgtccaagg tgcacggcct ggacgtgaag 420
aacgtgcagc tgggtggacgc catcgacaac atcgtgtggg agaagaagtc cctggtcacc 480
gagaaccggc tgcacaaaga gtgcctgctg cggctgtcca ccgaggaacg gcacatcttt 540
ctggactaca agaagtacgg ctctccatc agactggaac tggtaacct gatccaggcc 600
aagaccaaga acttcacat cgacttcaag ctgaagtact tcctgggctc tggcggccag 660
tccaagtccct ctctgctgca cgccatcaac ccccccaagt cccggcccaa caoctccctg 720
gaaatcgagt tcacccctcg ggacaacgag acagtgcctt acgacgagct gatcaaagag 780
ctgaccaccc tgtccagaca catcttcag gcctccccg agaacgtgat cctgtcccc 840
cccatcaacg ccccatcaa gaccttcag ctgcccgaagc aggacatcgt gggcctggac 900
ctggaaaacc tgtacgccgt gaccaagacc gacggcatcc ccatcaccat cagagtgacc 960
tccaacggcc tgtactgcta cttcaccac ctgggttaca tcatcagata ccccgtagaag 1020
cggatcatcg actccgaggt ggtggtgttc ggcgaggccg tgaaggacaa gaactggacc 1080
gtgtacctga tcaagctgat cgagcccgtg aacgccatca atgaccggct ggaagagtcc 1140
aaatcgtgg aatccaagct ggtggatatc tgcgaccgga tcgtgttcaa gtctaagaag 1200
tacgagggac ccttcaactac aacttcagag gtggtcgaca tgcgtgccac ctacctgctt 1260
aagcagcccg agggcgatc cctgtttac tccaagggac ccaagtcaa catcgatttc 1320
aagatcaaga aagagaacac catcgaccag accgccaatg tgggttccg gtacatgtcc 1380
tccgagccca tcatcttcg cgagtcctcc atcttcgtcg agtacaagaa gttctccaac 1440
gacaagggct tccccaaaga gtacggcagc ggcaagatcg tgcgtgataa cggcgtgaac 1500
tacctgaaca acatctactg cctggagtac atcaacaccc acaacgaagt gggcatcaag 1560
tccgtggtgg tgcccatcaa gtttatcgcc gagttcctgg tcaacggcga gatcctgaag 1620
ccccggatcg acaagaccat gaagtacatc aattccgagg actactacgg caaccagcac 1680
aacatcatcg tggaacacct gagggaccag tccatcaaga tcggcgacat cttcaacgag 1740
gacaagctgt ccgacgtggg ccaccagtac gccacaacg acaagttccg gctgaacccc 1800
gaggtgtcct acttcaccaa caagagaacc cgaggcccac tgggcatcct gtccaactac 1860
gtgaaaaccc tgcgtatctc catgtactgc tccaagacct tcctggacga ctccaacaag 1920
cggaaaggtc tggccatcga tttcggcaac ggcgcccgtc tggaaaagta cttctatggc 1980
gagatcgccc tgcgtggtggc taccgacct gacgcccag ctatcgccag aggcaacgag 2040
cggtaacaaca agctgaactc cggcatcaag accaagtact acaagttcga ctacatccag 2100

ES 2 436 356 T3

gaaaccatcc gctccgacac cttcgtgtcc tccgtgcgcg aggtgttcta tttcggcaag 2160
 ttcaatatca tcgactggca gttcgccatc cactacagct tccacccccg gcactacgcc 2220
 accgtgatga acaacctgtc cgagctgacc gcctccggcg gcaaggtgct gatcaccacc 2280
 atggacggcg acaagctgag caagctgacc gacaagaaa ccttcatcat ccacaagaac 2340
 ctgccctcca gcgagaacta catgtccgtg gaaaagatcg ccgacgacag aatcgtggtg 2400
 tacaatccct ccaccatgtc ccccccatg accgagtaca tcatcaagaa gaacgacatc 2460
 gtccgggtgt tcaacgagta cggcttcgtg ctggtggaca acgtggactt cgccaccatc 2520
 atcgagcggc ccaaaaagtt catcaatgga gccagcacca tggaagatcg gccctctacc 2580
 cggaaacttct tcgagctgaa cagaggcgc atcaagtgcg agggcctgga tgtggaagat 2640
 ctgctgagct actacgtggt gtacgtgttc tccaagagag ggcctga 2688

<210> 34
 <211> 895
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de proteína codificada por plásmido pRR1234L-DIR

<400> 34

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

ES 2 436 356 T3

Tyr Glu Gly Pro Phe Thr Thr Thr Ser Glu Val Val Asp Met Leu Ser
405 410 415

Thr Tyr Leu Pro Lys Gln Pro Glu Gly Val Ile Leu Phe Tyr Ser Lys
420 425 430

Gly Pro Lys Ser Asn Ile Asp Phe Lys Ile Lys Lys Glu Asn Thr Ile
435 440 445

Asp Gln Thr Ala Asn Val Val Phe Arg Tyr Met Ser Ser Glu Pro Ile
450 455 460

Ile Phe Gly Glu Ser Ser Ile Phe Val Glu Tyr Lys Lys Phe Ser Asn
465 470 475 480

Asp Lys Gly Phe Pro Lys Glu Tyr Gly Ser Gly Lys Ile Val Leu Tyr
485 490 495

Asn Gly Val Asn Tyr Leu Asn Asn Ile Tyr Cys Leu Glu Tyr Ile Asn
500 505 510

Thr His Asn Glu Val Gly Ile Lys Ser Val Val Val Pro Ile Lys Phe
515 520 525

Ile Ala Glu Phe Leu Val Asn Gly Glu Ile Leu Lys Pro Arg Ile Asp
530 535 540

Lys Thr Met Lys Tyr Ile Asn Ser Glu Asp Tyr Tyr Gly Asn Gln His
545 550 555 560

Asn Ile Ile Val Glu His Leu Arg Asp Gln Ser Ile Lys Ile Gly Asp
565 570 575

Ile Phe Asn Glu Asp Lys Leu Ser Asp Val Gly His Gln Tyr Ala Asn
580 585 590

Asn Asp Lys Phe Arg Leu Asn Pro Glu Val Ser Tyr Phe Thr Asn Lys
595 600 605

Arg Thr Arg Gly Pro Leu Gly Ile Leu Ser Asn Tyr Val Lys Thr Leu
610 615 620

Leu Ile Ser Met Tyr Cys Ser Lys Thr Phe Leu Asp Asp Ser Asn Lys
625 630 635 640

Arg Lys Val Leu Ala Ile Asp Phe Gly Asn Gly Ala Asp Leu Glu Lys
645 650 655

ES 2 436 356 T3

Tyr Phe Tyr Gly Glu Ile Ala Leu Leu Val Ala Thr Asp Pro Asp Ala
660 665 670

Asp Ala Ile Ala Arg Gly Asn Glu Arg Tyr Asn Lys Leu Asn Ser Gly
675 680 685

Ile Lys Thr Lys Tyr Tyr Lys Phe Asp Tyr Ile Gln Glu Thr Ile Arg
690 695 700

Ser Asp Thr Phe Val Ser Ser Val Arg Glu Val Phe Tyr Phe Gly Lys
705 710 715 720

Phe Asn Ile Ile Asp Trp Gln Phe Ala Ile His Tyr Ser Phe His Pro
725 730 735

Arg His Tyr Ala Thr Val Met Asn Asn Leu Ser Glu Leu Thr Ala Ser
740 745 750

Gly Gly Lys Val Leu Ile Thr Thr Met Asp Gly Asp Lys Leu Ser Lys
755 760 765

Leu Thr Asp Lys Lys Thr Phe Ile Ile His Lys Asn Leu Pro Ser Ser
770 775 780

Glu Asn Tyr Met Ser Val Glu Lys Ile Ala Asp Asp Arg Ile Val Val
785 790 795 800

Tyr Asn Pro Ser Thr Met Ser Thr Pro Met Thr Glu Tyr Ile Ile Lys
805 810 815

Lys Asn Asp Ile Val Arg Val Phe Asn Glu Tyr Gly Phe Val Leu Val
820 825 830

Asp Asn Val Asp Phe Ala Thr Ile Ile Glu Arg Ser Lys Lys Phe Ile
835 840 845

Asn Gly Ala Ser Thr Met Glu Asp Arg Pro Ser Thr Arg Asn Phe Phe
850 855 860

Glu Leu Asn Arg Gly Ala Ile Lys Cys Glu Gly Leu Asp Val Glu Asp
865 870 875 880

Leu Leu Ser Tyr Tyr Val Val Tyr Val Phe Ser Lys Arg Gly Pro
885 890 895

<210> 35
<211> 1017
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Marco abierto de lectura del plásmido pRR1234L-D12L

10 <400> 35

ES 2 436 356 T3

atgctggaaa tcagagccgc cttcctgcgg cggagaaaca ccgccctgcg gaccagagtg 60
gccgagctga gacagcgggt gcagcggctg cggaacatcg tgtcccagta cgagacaaga 120
tacggccccc tgggcggagg caaagaattc gacgagatcg tgaagaacat ccgcgagggc 180
accacagtgc tgctgcocct ctacgagaca ctgcccgagc tgaacctgtc cctgggcaag 240
tccccctgc cctccctgga atacggcgcc aactacttcc tgcagatctc cagagtgaac 300
gacctgaacc ggatgccacc cgacatgctg aagctgttca cccacgacat catgctgccc 360
gagtccgacc tggacaaggt gtacgagatt ctgaagatca actccgtgaa gtactacggc 420
cgggccacaa aggctgacgc cgtggtggcc gacctgtctg cccggaacaa gctgttcaag 480
agagagcggg acgccatcaa gtccaacaac cacctgaccg agaacaacct gtacatctcc 540
gactacaaga tgctgacctt cgacgtgttc cggcccctgt tcgacttcgt gaacgagaag 600
tactgcatca tcaagctgcc caccctgttc ggcagaggcg tgatcgacac catgcccgatc 660
tactgctccc tgttcaagaa cgtgcccgtg ctgaagtgcg tgtccgactc ctggctgaag 720
gactccgcca tcatggtggc ctccgacgtg tgcaagaaga acctggacct gttcatgtcc 780
cacgtgaagt ccgtgaccaa gtcattcagc tggaaggacg tgaactccgt gcagttctcc 840
atcctgaaca acccctgga caccgagttc atcaacaagt ttctggaatt ttccaaccgg 900
gtgtacgagg ccctgtacta cgtgcactcc ctgctgtact cctccatgac ctccgactcc 960
aagtccatcg agaacaacaa tcagcgacgg ctggtcaagc tgctgctggg gccctga 1017

<210> 36
<211> 338
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia de proteína codificada por plásmido pRR1234L-D12L

<400> 36

Met	Leu	Glu	Ile	Arg	Ala	Ala	Phe	Leu	Arg	Arg	Arg	Asn	Thr	Ala	Leu
1				5					10					15	
Arg	Thr	Arg	Val	Ala	Glu	Leu	Arg	Gln	Arg	Val	Gln	Arg	Leu	Arg	Asn
			20					25					30		
Ile	Val	Ser	Gln	Tyr	Glu	Thr	Arg	Tyr	Gly	Pro	Leu	Gly	Gly	Gly	Lys
		35					40					45			
Glu	Phe	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Asn	Ile	Arg	Glu	Gly	Thr	His	Val	Leu
	50					55					60				

ES 2 436 356 T3

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

Ser Pro Leu Pro Ser Leu Glu Tyr Gly Ala Asn Tyr Phe Leu Gln Ile
 85 90 95

Ser Arg Val Asn Asp Leu Asn Arg Met Pro Thr Asp Met Leu Lys Leu
 100 105 110

Phe Thr His Asp Ile Met Leu Pro Glu Ser Asp Leu Asp Lys Val Tyr
 115 120 125

Glu Ile Leu Lys Ile Asn Ser Val Lys Tyr Tyr Gly Arg Ser Thr Lys
 130 135 140

Ala Asp Ala Val Val Ala Asp Leu Ser Ala Arg Asn Lys Leu Phe Lys
 145 150 155 160

Arg Glu Arg Asp Ala Ile Lys Ser Asn Asn His Leu Thr Glu Asn Asn
 165 170 175

Leu Tyr Ile Ser Asp Tyr Lys Met Leu Thr Phe Asp Val Phe Arg Pro
 180 185 190

Leu Phe Asp Phe Val Asn Glu Lys Tyr Cys Ile Ile Lys Leu Pro Thr
 195 200 205

Leu Phe Gly Arg Gly Val Ile Asp Thr Met Arg Ile Tyr Cys Ser Leu
 210 215 220

Phe Lys Asn Val Arg Leu Leu Lys Cys Val Ser Asp Ser Trp Leu Lys
 225 230 235 240

Asp Ser Ala Ile Met Val Ala Ser Asp Val Cys Lys Lys Asn Leu Asp
 245 250 255

Leu Phe Met Ser His Val Lys Ser Val Thr Lys Ser Ser Ser Trp Lys
 260 265 270

Asp Val Asn Ser Val Gln Phe Ser Ile Leu Asn Asn Pro Val Asp Thr
 275 280 285

Glu Phe Ile Asn Lys Phe Leu Glu Phe Ser Asn Arg Val Tyr Glu Ala
 290 295 300

Leu Tyr Tyr Val His Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Met Thr Ser Asp Ser
 305 310 315 320

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

Gly Pro

- 5 <210> 37
- <211> 2799
- <212> ADN
- <213> Artificial

ES 2 436 356 T3

<220>

<223> Marco abierto de lectura del plásmido pEE1234L-T7ARN

5 <400> 37

```

atgctggaaa tcgagggcgc cttcctggaa caggaaaaca ccgccctgga aaccgaggtg      60
gccgagctgg aacaggaagt gcagcggctg gaaaacatcg tgtcccagta cgagacaaga      120
tacggccccc tgggcggagg caaactcgag aacaccatca atatcgcaa gaacgacttc      180
agcgacatcg agctggccgc catcccttcc aacaccctgg ccgaccacta tggcgagcgg      240
ctggccagag aacagctggc cctggaacac gagagctacg aaatgggcga ggcccggttc      300
cggaagatgt tcgagagaca gctgaaggcc ggcgaggtgg ccgataatgc cgccgctaag      360
cccctgatca ccaccctgct gcccaagatg atcgcccgga tcaacgattg gttcgaggaa      420
gtgaaggcca agcggggcaa gagcccacc gccttccagt ttctgcagga aatcaagccc      480
gaggccgtgg cctacatcac catcaagacc accctggcct gcctgaccag cgccgacaat      540
accaccgtgc aggtgtcgc ttctgccatc ggcagagcca tcgaggacga ggccagattc      600
ggcagaatcc gggacctgga agccaagcac ttcaagaaa acgtggagga acagctgaac      660
aagcgcgtgg gccacgtgta caagaaagcc ttcattgcagg tggaggaggc cgacatgctg      720
agcaagggcc tgcctggcgg agaagcctgg tccagctggc acaaagagga cagcatccac      780
gtcggcgtgc ggtgcatcga gatgctgac gagtcgaccg gcatggtgtc cctgcacagc      840
cagaatgccg gcgtgggggg ccaggacagc gagacaatcg aactggcccc cgagtatgcc      900
gaggccattg ccacaagagc cggcgctctg gccggcatca gcccctggt ccagccctgc      960
gtggtgcctc ctaagccctg gacaggcatc acaggcggcg gatactgggc caacggcaga     1020
cgccctctgg ctctgggtgcg gaccacagc aagaaagccc tgatgcgcta cgaggacgtg     1080
tacatgcccg aggtgtacaa ggccatcaac attgccaga acaccgcctg gaagatcaac     1140
aagaaagtgc tggccgtggc caatgtgatc accaagtgga agcactgccc cgtggaggac     1200
atccccgcca tcgagcggga ggaactgccc atgaagcccg aggacatcga catgaacccc     1260
gaggccctga cagcctggaa aagggccgct gccgccgtgt accggaagga caaggcccgg     1320
aagtcccggc ggatcagcct ggagttcatg ctggaacagg ccaacaagtt cgccaaccac     1380
aaggccattt ggttccctta caacatggac tggcggggca gagtgtacgc cgtgagcatg     1440

```

ES 2 436 356 T3

ttcaatccac aaggcaacga catgaccaag gggctgctga ccctggccaa gggcaagccc 1500
 atcggcaaaag agggctacta ctggctgaag atccacggcg ccaactgcbc tggcgtggac 1560
 aaggtgcctt tcccagagcg gatcaagttc atcgaggaaa accacgagaa catcatggcc 1620
 tgcgccaaaga gccctctaga aaacacttgg tgggcccagc aggacagccc cttctgcttc 1680
 ctggccttct gctttgagta cgcgggagtg cagcaccacg gcctgagcta caactgcagc 1740
 ctgcccctgg ccttcgatgg cagctgcagc ggcatccagc acttcagcgc catgctgagg 1800
 gacgaagtgg gcggcagagc cgtgaatctg ctgccaaagc agacagtgca ggacatctac 1860
 gggatcgtgg ccaagaaagt gaacgagatc ctgcaggccg acgccatcaa cggcaccgac 1920
 aacgaggtgg tgaccgtgac cgatgagaac accggcgaga tcagcgagaa agtgaagctc 1980
 ggcaccaagc ccctggctgg ccagtggctg gcctacggcg tgaccagatc cgtgaccaag 2040
 cggagcgtga tgacactggc ctatggcagc aaagagtctg gcttccggca gcaggtgctg 2100
 gaagatacca tccagcctgc catcgacagc ggcaaggggc tgatgttcac ccagcccaac 2160
 caggccgctg gctacatggc caagctcata tgggagagcg tgtccgtgac agtgggtggc 2220
 gccgtggagg ccatgaattg gctgaagtcc gccgccaaac tgctggccgc tgaagtgaag 2280
 gacaaaaaga ccggcgaaat cctgcggaag agatgcgccg tgactgggtt gacccccgat 2340
 ggcttccccg tgtggcagga gtacaagaag cccatccaga cccggctgaa cctgatgttc 2400
 ctgggccagt tcagactgca gccaccatc aacaccaaca aggactccga gatcgacgcc 2460
 cacaagcagg aaagcggcat tgcccccaac ttcgtgcaca gccaggacgg cagccacctg 2520
 agaaagaccg tgggtgtggc tcacgagaag tacggcatcg agagcttcgc cctgatccac 2580
 gacagcttcg gcaccattcc cgcggacgcc gccaacctgt tcaaggccgt gcgggagaca 2640
 atgggtggaca cctacgagag ctgcgacgtg ctggccgact tctacgacca gttcggcgac 2700
 cagctgcagc agagccagct ggacaagatg cccgccctgc ccgccaaggg gaacctgaac 2760
 ctgcgggaca tcctggaaag cgacttcgcc ttcgcctga 2799

<210> 38
 <211> 932
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de proteína codificada por plásmido pEE1234L-T7ARN

<400> 38

Met Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Gln Glu Asn Thr Ala Leu
 1 5 10 15

Glu Thr Glu Val Ala Glu Leu Glu Gln Glu Val Gln Arg Leu Glu Asn
 20 25 30

ES 2 436 356 T3

Ile Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr Gly Pro Leu Gly Gly Gly Lys
 35 40 45

Leu Glu Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu
 50 55 60

Leu Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg
 65 70 75 80

Leu Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly
 85 90 95

Glu Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu
 100 105 110

Val Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro
 115 120 125

Lys Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys
 130 135 140

Arg Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro
 145 150 155 160

Glu Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr
 165 170 175

Ser Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg
 180 185 190

Ala Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala
 195 200 205

Lys His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly
 210 215 220

His Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu
 225 230 235 240

Ser Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu
 245 250 255

Asp Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser
 260 265 270

Thr Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln
 275 280 285

Asp Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala

ES 2 436 356 T3

Leu Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser
 565 570 575

Tyr Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile
 580 585 590

Gln His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val
 595 600 605

Asn Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala
 610 615 620

Lys Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp
 625 630 635 640

Asn Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu
 645 650 655

Lys Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr
 660 665 670

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

Gly Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile
 690 695 700

Gln Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn
 705 710 715 720

Gln Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val
 725 730 735

Thr Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala
 740 745 750

Lys Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu
 755 760 765

Arg Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val
 770 775 780

Trp Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe
 785 790 795 800

Leu Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser
 805 810 815

ES 2 436 356 T3

Glu Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val
 820 825 830

His Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His
 835 840 845

Glu Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly
 850 855 860

Thr Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr
 865 870 875 880

Met Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp
 885 890 895

Gln Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala
 900 905 910

Leu Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp
 915 920 925

Phe Ala Phe Ala
 930

<210> 39
 <211> 5259
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> Marco abierto de lectura del plásmido pD1R-T7ARNP

<400> 39
 atggaattcg acgccaacgt ggtgtcctcc tccacaatcg ccacctacat cgacgccctg 60
 gccaagaacg cctccgagct ggaacagcgg tccaccgcct acgagatcaa caatgagctg 120
 gaactggtgt tcatcaagcc ccccctgatc accctgacca acgtggtcaa catcagcacc 180
 atccaggaat ccttcatccg gttcaccgtg accaacaag aaggcgtgaa gatccggacc 240
 aagatcccc tgtccaaggt gcacggcctg gacgtgaaga acgtgcagct ggtggacgcc 300
 atcgacaaca tctgtgggga gaagaagtcc ctggtcaccg agaaccggct gcacaaagag 360
 tgctgtctgc ggctgtccac cgaggaacgg cacatcttcc tggactacaa gaagtacggc 420
 tcctccatca gactggaact ggtcaacctg atccaggcca agaccaagaa cttcaccatc 480
 gacttcaagc tgaagtactt cctgggctct ggcgccagc ccaagtcctc tctgctgcac 540
 gccatcaacc accccaagtc ccggcccaac acctccctgg aatogagtt caccctcgg 600
 gacaacgaga cagtgcctca cgacgagctg atcaaagagc tgaccaccct gtccagacac 660
 atcttcatgg cctccccga gaacgtgatc ctgtcccccc ccatcaacgc cccatcaag 720

ES 2 436 356 T3

acctcatgc tgcceaagca ggacatcgtg ggccctggacc tggaaaacct gtacgcccgtg 780
 accaagaccg acggcatccc catcaccatc agagtgcacct ccaacggcct gtactgctac 840
 ttcacccacc tgggtacat catcagatac cccgtgaagc ggatcatcga ctccgaggtg 900
 gtgggtgttcg gcgaggccgt gaaggacaag aactggaccg tgtacctgat caagctgatc 960
 gagcccgtga acgccatcaa tgaccggctg gaagagtcca aatacgtgga atccaagctg 1020
 gtggatatct gcgaccggat cgtgttcaag tctaagaagt acgagggacc cttcactaca 1080
 acttcagagg tggtcgacat gctgtccacc tacctgccta agcagcccga gggcgtcatc 1140
 ctgttctact ccaagggacc caagtccaac atcgatttca agatcaagaa agagaacacc 1200
 atcgaccaga ccgccaatgt ggtgttccgg tacatgtcct ccgagcccat catcttcggc 1260
 gagtcctcca tcttcgtcga gtacaagaag ttctccaacg acaagggctt ccccaaagag 1320
 tacggcagcg gcaagatcgt gctgtacaac ggcgtgaact acctgaacaa catctactgc 1380
 ctggagtaca tcaacaccca caacgaagtg ggcatcaagt ccgtggtggt gcccatcaag 1440
 tttatcgccg agttcctggt caacggcgag atcctgaagc cccggatcga caagaccatg 1500
 aagtacatca attccgagga ctactacggc aaccagcaca acatcatcgt ggaacacctg 1560
 agggaccagt ccatcaagat cggcgacatc ttcaacgagc acaagctgtc cgacgtgggc 1620
 caccagtacg ccaacaacga caagttccgg ctgaaccccg aggtgtccta cttcaccaac 1680
 aagagaaccc gaggccact gggcatcctg tccaactacg tgaaaacct gctgatctcc 1740
 atgtactgct ccaagacctt cctggacgac tccaacaagc ggaaggtgct ggccatcgat 1800
 ttcggcaacg gcgccgatct ggaaaagtac ttctatggcg agatcgccct gctggtggct 1860
 accgaccctg acgcccagcg tatcgccaga ggcaacgagc ggtacaacaa gctgaactcc 1920
 ggcatcaaga ccaagtacta caagttcgac tacatccagg aaaccatccg ctccgacacc 1980
 ttcgtgtcct ccgtgcgca ggtgttctat ttcggcaagt tcaatatcat cgactggcag 2040
 ttcgccatcc actacagctt ccacccccgg cactacgcca ccgtgatgaa caacctgtcc 2100
 gagctgaccg cctccggcgg caaggtgctg atcaccacca tggacggcga caagctgagc 2160
 aagctgaccg acaagaaaac cttcatcatc cacaagaacc tgccctccag cgagaactac 2220
 atgtccgtgg aaaagatcgc cgacgacaga atcgtggtgt acaatccctc caccatgtcc 2280
 accccatga ccgagtacat catcaagaag aacgacatcg tccgggtgtt caacgagtac 2340
 ggcttcgtgc tggtggaaca cgtggacttc gccaccatca tcgagcggtc caaaaagttc 2400
 atcaatggag ccagcaccat ggaagatcgg ccctctaccg ggaacttctt cgagctgaac 2460
 agagggccca tcaagtgcga gggcctggat gtggaagatc tgctgagcta ctacgtggtg 2520
 tacgtgttct ccaagagagg gcccgccgga ggcggaagtg gagcggaggg aagcggaggg 2580
 ggaggatctg gcggcggagg cagcctcgag aacaccatca atatcgccaa gaacgacttc 2640

ES 2 436 356 T3

agcgadatcg agctggccgc catcccttc aacaccctgg cggaccacta tggcgagcgg 2700
 ctggccagag aacagctggc cctggaacac gagagctacg aaatgggcga ggcccggttc 2760
 cggaaagtgt tcgagagaca gctgaaggcc ggcgaggtgg ccgataatgc cgccgctaag 2820
 cccctgatca ccaccctgct gcccgaagatg atcgcccgga tcaacgattg gttcgaggaa 2880
 gtgaaggcca agcggggcaa gagggccacc gccttcagt ttctgcagga aatcaagccc 2940
 gaggccgtgg octacatcac catcaagacc accctggcct gcctgaccag cgccgacaat 3000
 accaccgtgc aggtctgcgc ttctgccatc ggcagagcca tcgaggacga ggccagattc 3060
 ggcagaatcc gggacctgga agccaagcac ttcaagaaaa acgtggagga acagctgaac 3120
 aagcgcgtgg gccacgtgta caagaaagcc ttcatgcagg tggtaggaggc cgacatgctg 3180
 agcaagggcc tgctgggcgg agaagcctgg tccagctggc acaaagagga cagcatccac 3240
 gtcggcgtgc ggtgcatcga gatgctgacg gactcgaccg gcatggtgtc cctgcacagg 3300
 cagaatgccg gcgtggtggg ccaggacagc gagacaatcg aactggcccc cgagtatgcc 3360
 gaggccattg ccacaagagc cggcgcctctg gccggcatca gcccctggt ccagccctgc 3420
 gtggtgcctc ctaagccctg gacaggcac acagggcggc gatactgggc caacggcaga 3480
 cgcctcttgg ctctggtgcg gaccacagc aagaaagccc tgatgcgcta cgaggacgtg 3540
 tacatgcccc aggtgtacaa ggccatcaac attgcccaga acaccgcctg gaagatcaac 3600
 aagaaagtgc tggccgtggc caatgtgac accaagtga agcactgccc cgtggaggac 3660
 atccccgcca tcgagcggga ggaactgccc atgaagcccg aggacatcga catgaacccc 3720
 gaggccctga cagcctggaa aaggcccgct gccgccgtgt accggaagga caaggccggg 3780
 aagtcccggc ggatcagcct ggagttcatg ctggaacagg ccaacaagtt cgccaaccac 3840
 aaggccattt ggttcctta caacatggac tggcggggca gagtgtacgc cgtgagcatg 3900
 ttcaatccac aaggcaacga catgaccaag gggctgctga cctggccaa gggcaagccc 3960
 atcggcaaag agggctacta ctggtgaa atccacggcg ccaactgcgc tggcgtggac 4020
 aaggtgccct tcccagagcg gatcaagttc atcgaggaaa accacgagaa catcatggcc 4080
 tgcgccaaaga gccctctaga aaacacttgg tggccgagc aggacagccc cttctgcttc 4140
 ctggccttct gctttgagta cgcggagtg cagcaccacg gcctgageta caactgcagc 4200
 ctgcccctgg ccttcgatgg cagctgcagc ggcattcagc acttcagcgc catgctgagg 4260
 gacgaagtgg gcggcagagc cgtgaatctg ctgccaaagc agacagtgca ggacatctac 4320
 gggatcgtgg ccaagaaagt gaacgagatc ctgcaggccg acgccatcaa cggcacccgac 4380
 aacgaggtgg tgaccgtgac cgatgagaac accggcgaga tcagcgagaa agtgaagctc 4440
 ggcaccaag ccctggctgg ccagtggctg gcctacggcg tgaccagatc cgtgaccaag 4500
 cggagcgtga tgacactggc ctatggcagc aaagagttcg gcttcggca gcagggtctg 4560
 gaagatacca tccagcctgc catcgacagc ggcaaggggc tgatgttcaac ccagcccaac 4620

ES 2 436 356 T3

caggccgctg gctacatggc caagctcata tgggagagcg tgtccgtgac agtggtggcc 4680
gccgtggagg ccatgaattg gctgaagtcc gccgccaaac tgctggccgc tgaagtgaag 4740
gacaaaaaga ccggcgaaat cctgcggaag agatgcgccg tgactgggt gacccccgat 4800
ggcttccccg tgtggcagga gtacaagaag cccatccaga ccgggtgaa cctgatgttc 4860
ctgggccagt tcagactgca gccaccatc aacaccaaca aggactccga gatcgacgcc 4920
cacaagcagg aaagcggcat tgcccccaac ttcgtgcaca gccaggacgg cagccacctg 4980
agaaagaccg tgggtgtgggc tcacgagaag tacggcatcg agagcttcgc cctgatccac 5040
gacagcttog gcaccattcc cgccgacgcc gccaacctgt tcaaggccgt gcgggagaca 5100
atggtggaca cctacgagag ctgcgacgtg ctggccgact tctacgacca gttcggccgac 5160
cagctgcacg agagccagct ggacaagatg cccgccctgc ccgccaaggg gaacctgaac 5220
ctgctgggaca tcctggaaag cgacttcgcc ttcgcctga 5259

<210> 40
<211> 1752
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia de proteína codificada por plásmido pD1R-T7ARNP

<400> 40

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

ES 2 436 356 T3

Glu Arg His Ile Phe Leu Asp Tyr Lys Lys Tyr Gly Ser Ser Ile Arg
 130 135 140

Leu Glu Leu Val Asn Leu Ile Gln Ala Lys Thr Lys Asn Phe Thr Ile
 145 150 155 160

Asp Phe Lys Leu Lys Tyr Phe Leu Gly Ser Gly Ala Gln Ser Lys Ser
 165 170 175

Ser Leu Leu His Ala Ile Asn His Pro Lys Ser Arg Pro Asn Thr Ser
 180 185 190

Leu Glu Ile Glu Phe Thr Pro Arg Asp Asn Glu Thr Val Pro Tyr Asp
 195 200 205

Glu Leu Ile Lys Glu Leu Thr Thr Leu Ser Arg His Ile Phe Met Ala
 210 215 220

Ser Pro Glu Asn Val Ile Leu Ser Pro Pro Ile Asn Ala Pro Ile Lys
 225 230 235 240

Thr Phe Met Leu Pro Lys Gln Asp Ile Val Gly Leu Asp Leu Glu Asn
 245 250 255

Leu Tyr Ala Val Thr Lys Thr Asp Gly Ile Pro Ile Thr Ile Arg Val
 260 265 270

Thr Ser Asn Gly Leu Tyr Cys Tyr Phe Thr His Leu Gly Tyr Ile Ile
 275 280 285

Arg Tyr Pro Val Lys Arg Ile Ile Asp Ser Glu Val Val Val Phe Gly
 290 295 300

Glu Ala Val Lys Asp Lys Asn Trp Thr Val Tyr Leu Ile Lys Leu Ile
 305 310 315 320

Glu Pro Val Asn Ala Ile Asn Asp Arg Leu Glu Glu Ser Lys Tyr Val
 325 330 335

Glu Ser Lys Leu Val Asp Ile Cys Asp Arg Ile Val Phe Lys Ser Lys
 340 345 350

Lys Tyr Glu Gly Pro Phe Thr Thr Thr Ser Glu Val Val Asp Met Leu
 355 360 365

Ser Thr Tyr Leu Pro Lys Gln Pro Glu Gly Val Ile Leu Phe Tyr Ser
 370 375 380

ES 2 436 356 T3

Lys Gly Pro Lys Ser Asn Ile Asp Phe Lys Ile Lys Lys Glu Asn Thr
 385 390 395 400
 Ile Asp Gln Thr Ala Asn Val Val Phe Arg Tyr Met Ser Ser Glu Pro
 405 410 415
 Ile Ile Phe Gly Glu Ser Ser Ile Phe Val Glu Tyr Lys Lys Phe Ser
 420 425 430
 Asn Asp Lys Gly Phe Pro Lys Glu Tyr Gly Ser Gly Lys Ile Val Leu
 435 440 445
 Tyr Asn Gly Val Asn Tyr Leu Asn Asn Ile Tyr Cys Leu Glu Tyr Ile
 450 455 460
 Asn Thr His Asn Glu Val Gly Ile Lys Ser Val Val Val Pro Ile Lys
 465 470 475 480
 Phe Ile Ala Glu Phe Leu Val Asn Gly Glu Ile Leu Lys Pro Arg Ile
 485 490 495
 Asp Lys Thr Met Lys Tyr Ile Asn Ser Glu Asp Tyr Tyr Gly Asn Gln
 500 505 510
 His Asn Ile Ile Val Glu His Leu Arg Asp Gln Ser Ile Lys Ile Gly
 515 520 525
 Asp Ile Phe Asn Glu Asp Lys Leu Ser Asp Val Gly His Gln Tyr Ala
 530 535 540
 Asn Asn Asp Lys Phe Arg Leu Asn Pro Glu Val Ser Tyr Phe Thr Asn
 545 550 555 560
 Lys Arg Thr Arg Gly Pro Leu Gly Ile Leu Ser Asn Tyr Val Lys Thr
 565 570 575
 Leu Leu Ile Ser Met Tyr Cys Ser Lys Thr Phe Leu Asp Asp Ser Asn
 580 585 590
 Lys Arg Lys Val Leu Ala Ile Asp Phe Gly Asn Gly Ala Asp Leu Glu
 595 600 605
 Lys Tyr Phe Tyr Gly Glu Ile Ala Leu Leu Val Ala Thr Asp Pro Asp
 610 615 620
 Ala Asp Ala Ile Ala Arg Gly Asn Glu Arg Tyr Asn Lys Leu Asn Ser
 625 630 635 640
 Gly Ile Lys Thr Lys Tyr Tyr Lys Phe Asp Tyr Ile Gln Glu Thr Ile

ES 2 436 356 T3

Tyr Glu Met Gly Glu Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu
 915 920 925

Lys Ala Gly Glu Val Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr
 930 935 940

Thr Leu Leu Pro Lys Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu
 945 950 955 960

Val Lys Ala Lys Arg Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln
 965 970 975

Glu Ile Lys Pro Glu Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu
 980 985 990

Ala Cys Leu Thr Ser Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser
 995 1000 1005

Ala Ile Gly Arg Ala Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile
 1010 1015 1020

Arg Asp Leu Glu Ala Lys His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln
 1025 1030 1035

Leu Asn Lys Arg Val Gly His Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln
 1040 1045 1050

Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu
 1055 1060 1065

Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp Ser Ile His Val Gly Val
 1070 1075 1080

Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr Gly Met Val Ser Leu
 1085 1090 1095

His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp Ser Glu Thr Ile
 1100 1105 1110

Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr Arg Ala Gly
 1115 1120 1125

Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val Val Pro
 1130 1135 1140

Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala Asn
 1145 1150 1155

ES 2 436 356 T3

Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala
 1160 1165 1170

Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala
 1175 1180 1185

Ile Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val
 1190 1195 1200

Leu Ala Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val
 1205 1210 1215

Glu Asp Ile Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro
 1220 1225 1230

Glu Asp Ile Asp Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg
 1235 1240 1245

Ala Ala Ala Ala Val Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg
 1250 1255 1260

Arg Ile Ser Leu Glu Phe Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala
 1265 1270 1275

Asn His Lys Ala Ile Trp Phe Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly
 1280 1285 1290

Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met
 1295 1300 1305

Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys Gly Lys Pro Ile Gly Lys
 1310 1315 1320

Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly Ala Asn Cys Ala Gly
 1325 1330 1335

Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys Phe Ile Glu Glu
 1340 1345 1350

Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro Leu Glu Asn
 1355 1360 1365

Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu Ala Phe
 1370 1375 1380

Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr Asn
 1385 1390 1395

ES 2 436 356 T3

Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln
 1400 1405 1410

His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val
 1415 1420 1425

Asn Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val
 1430 1435 1440

Ala Lys Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly
 1445 1450 1455

Thr Asp Asn Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu
 1460 1465 1470

Ile Ser Glu Lys Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln
 1475 1480 1485

Trp Leu Ala Tyr Gly Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val
 1490 1495 1500

Met Thr Leu Ala Tyr Gly Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln
 1505 1510 1515

Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly
 1520 1525 1530

Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys
 1535 1540 1545

Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr Val Val Ala Ala Val Glu
 1550 1555 1560

Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys Leu Leu Ala Ala Glu
 1565 1570 1575

Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg Lys Arg Cys Ala
 1580 1585 1590

Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp Gln Glu Tyr
 1595 1600 1605

Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu Gly Gln
 1610 1615 1620

Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu Ile
 1625 1630 1635

Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His

ES 2 436 356 T3

1640		1645		1650
Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His				
1655		1660		1665
Glu Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe				
1670		1675		1680
Gly Thr Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg				
1685		1690		1695
Glu Thr Met Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp				
1700		1705		1710
Phe Tyr Asp Gln Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp				
1715		1720		1725
Lys Met Pro Ala Leu Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp				
1730		1735		1740
Ile Leu Glu Ser Asp Phe Ala Phe Ala				
1745		1750		

<210> 41
 <211> 3588
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Marco abierto de lectura del plásmido pD12L-T7ARNP

<400> 41

atggaattcg acgagatcgt gaagaacatc cgcgagggca cccacgtgct gctgcccttc	60
tacgagacac tgcccagact gaacctgtcc ctgggcaagt cccccctgcc ctccctggaa	120
tacggcgcca actacttctt gcagatctcc agagtgaacg acctgaaccg gatgcccacc	180
gacatgctga agctgttcac ccacgacatc atgctgcccg agtccgacct ggacaaggtg	240
tacgagattc tgaagatcaa ctccgtgaag tactacggcc ggtccacaaa ggctgacgcc	300
gtggtggccg acctgtctgc ccggaacaag ctgttcaaga gagagcggga cgccatcaag	360
tccaacaacc acctgaccga gaacaacctg tacatctccg actacaagat gctgaccttc	420
gacgtgttcc gggccctggt cgacttcgtg aacgagaagt actgcatcat caagctgccc	480
accctgttcg gcagaggcgt gatcgacacc atgcggatct actgctccct gttcaagaac	540
gtgcggtctg tgaagtgcgt gtccgactcc tggctgaagg actccgcat catggtggcc	600
tccgacgtgt gcaagaagaa cctggacctg ttcattgccc acgtgaagtc cgtgaccaag	660
tcattccagct ggaaggacgt gaactccgtg cagttctcca tcctgaacaa ccccgaggac	720
accgagttca tcaacaagtt tctggaattt tccaaccggg tgtacgaggc cctgtactac	780

ES 2 436 356 T3

gtgcactccc tgctgtactc ctccatgacc tccgactcca agtccatcga gaacaaacat 840
 cagcgacggc tgggtcaagct gctgctgggg cccggcggag gcggaagtgg aggcggagga 900
 agcggagggg gaggatctgg cggcggaggc agcctcgaga acaccatcaa tctcgccaag 960
 aacgacttca gcgacatoga gctggccgcc atccctttca acaccctggc cgaccactat 1020
 ggcgagcggc tggccagaga acagctggcc ctggaacacg agagctacga aatgggagga 1080
 gcccgttcc ggaagatggt cgagagacag ctgaaggccg gcgaggtggc cgataatgcc 1140
 gccgctaagc ccctgatcac caccctgctg cccaagatga tgcgccggat caacgattgg 1200
 ttcgaggaag tgaaggccaa gcggggcaag aggccaccg ccttccagt tctgcaggaa 1260
 atcaagcccc aggcctgggc ctacatcacc atcaagacca cctggcctg cctgaccage 1320
 gccgacaata ccaccgtgca ggctgtcgt tctgccatcg gcagagccat cgaggacgag 1380
 gccagattcg gcagaatccg ggacctgaa gccaaagcact tcaagaaaaa cgtggaggaa 1440
 cagctgaaca agcgcgtggg ccacgtgtac aagaaagcct tcatgcaggt ggtggaggcc 1500
 gacatgctga gcaagggcct gctgggcgga gaagcctggt ccagctggca caaagaggac 1560
 agcatccacg tcggcgtgcy gtgcatcgag atgctgatcg agtcgaccgg catggtgtcc 1620
 ctgacacaggc agaatgccgg cgtgggtggc caggacagcg agacaatcga actggcccc 1680
 gagtatgccg aggccattgc cacaagagcc ggcgctctgg ccggcatcag ccccatgttc 1740
 cagccctgcy tgggtgcctcc taagccctgg acagggcatca caggcggcgg atactgggcc 1800
 aacggcagac gccctctggc tctgggtgcy acccacagca agaaagccct gatgcgctac 1860
 gaggacgtgt acatgcccg ggtgtacaag gccatcaaca ttgccagaa caccgcctgg 1920
 aagatcaaca agaaagtgct ggccgtggcc aatgtgatca ccaagtggaa gcactgcccc 1980
 gtggaggaca tccccgccat cgagcgggag gaactgcccc tgaagccccg ggacatcgac 2040
 atgaaccccc aggcctgac agcctggaaa agggcctg cgcctgtga ccggaaggac 2100
 aaggccccga agtccccgcy gatcagcctg gagttcatgc tggaacaggc caacaagttc 2160
 gccaacccaca aggcatttg gttcccttac aacatggact ggcggggcag agtgtacgcc 2220
 gtgagcatgt tcaatccaca aggcaacgac atgaccaagg ggctgctgac cctggccaag 2280
 ggcaagccca toggcaaaga gggctactac tggctgaaga tccacggcgc caactgcyct 2340
 ggcgtggaca aggtgcctt cccagagcgg atcaagttca tcgaggaaaa ccacgagaac 2400
 atcatggcct gcgccaaag ccctctagaa aacacttggg gggccgagca ggacagcccc 2460
 ttctgcttcc tggcctctg ctttgagtac gccggagtgc agcaccacgg cctgagctac 2520
 aactgcagcc tgcctctggc cttcgtggc agctgcagcy gcatccagca cttcagcgc 2580
 atgctgaggg acgaagtggg cggcagagcc gtgaatctgc tgccaagcga gacagtgcag 2640
 gacatctacg ggatcgtggc caagaaagtg aacgagatcc tgcaggccga cgcctcaac 2700

ES 2 436 356 T3

ggcaccgaca acgaggtggt gaccgtgacc gatgagaaca ccggcgagat cagcgagaaa 2760
 gtgaagctcg gcaccaaggc cctggctggc cagtggctgg cctacggcgt gaccagatcc 2820
 gtgaccaagc ggagcgtgat gacactggcc tatggcagca aagagtccgg cttccggcag 2880
 caggtgctgg aagataccat ccagcctgcc atcgacagcg gcaaggggct gatgttcacc 2940
 cagcccaacc aggccgctgg ctacatggcc aagctcatat gggagagcgt gtccgtgaca 3000
 gtggtggccg ccgtggagge catgaattgg ctgaagtccg ccgccaaact gctggccgct 3060
 gaagtgaagg acaaaaagac cggcgaaatc ctgcggaaga gatgcgccgt gcaactgggtg 3120
 acccccgatg gcttccccgt gtggcaggag tacaagaagc ccatccagac ccggctgaac 3180
 ctgatgttcc tgggcccagt cagactgcag cccaccatca acaccaaaa ggactccgag 3240
 atcgacgccc acaagcagga aagcggcatt gcccccaact tcgtgcacag ccaggacggc 3300
 agccacctga gaaagaccgt ggtgtgggct cagcagaagt acggcatcga gagcttcgcc 3360
 ctgatccacg acagcttcgg caccattccc gccgacgccc ccaacctggt caaggccgtg 3420
 cgggagacaa tgggtggacac ctacgagagc tgcgacgtgc tggccgactt ctacgaccag 3480
 ttcgccgacc agctgcacga gagccagctg gacaagatgc ccgccctgcc cgccaagggg 3540
 aacctgaacc tgcgggacat cctggaaagc gacttcgcct tcgcctga 3588

<210> 42
 <211> 1195
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de proteína codificada por plásmido pD12L-T7ARNP

10

<400> 42

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

ES 2 436 356 T3

Lys Ala Asp Ala Val Val Ala Asp Leu Ser Ala Arg Asn Lys Leu Phe
100 105 110

Lys Arg Glu Arg Asp Ala Ile Lys Ser Asn Asn His Leu Thr Glu Asn
115 120 125

Asn Leu Tyr Ile Ser Asp Tyr Lys Met Leu Thr Phe Asp Val Phe Arg
130 135 140

Pro Leu Phe Asp Phe Val Asn Glu Lys Tyr Cys Ile Ile Lys Leu Pro
145 150 155 160

Thr Leu Phe Gly Arg Gly Val Ile Asp Thr Met Arg Ile Tyr Cys Ser
165 170 175

Leu Phe Lys Asn Val Arg Leu Leu Lys Cys Val Ser Asp Ser Trp Leu
180 185 190

Lys Asp Ser Ala Ile Met Val Ala Ser Asp Val Cys Lys Lys Asn Leu
195 200 205

Asp Leu Phe Met Ser His Val Lys Ser Val Thr Lys Ser Ser Ser Trp
210 215 220

Lys Asp Val Asn Ser Val Gln Phe Ser Ile Leu Asn Asn Pro Val Asp
225 230 235 240

Thr Glu Phe Ile Asn Lys Phe Leu Glu Phe Ser Asn Arg Val Tyr Glu
245 250 255

Ala Leu Tyr Tyr Val His Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Met Thr Ser Asp
260 265 270

Ser Lys Ser Ile Glu Asn Lys His Gln Arg Arg Leu Val Lys Leu Leu
275 280 285

Leu Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
290 295 300

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys
305 310 315 320

Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu
325 330 335

Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu
340 345 350

His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu

ES 2 436 356 T3

355	360	365	
Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro 370 375 380			
Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp 385 390 395 400			
Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln 405 410 415			
Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys 420 425 430			
Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala 435 440 445			
Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly 450 455 460			
Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu 465 470 475 480			
Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln 485 490 495			
Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala 500 505 510			
Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys 515 520 525			
Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln 530 535 540			
Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro 545 550 555 560			
Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile 565 570 575			
Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly 580 585 590			
Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu 595 600 605			
Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr 610 615 620			

ES 2 436 356 T3

Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp
625 630 635 640

Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp
645 650 655

Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu
660 665 670

Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala
675 680 685

Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys
690 695 700

Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe
705 710 715 720

Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly
725 730 735

Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr
740 745 750

Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly
755 760 765

Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys
770 775 780

Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn
785 790 795 800

Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu
805 810 815

Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly
820 825 830

Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe
835 840 845

Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp
850 855 860

Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln
865 870 875 880

ES 2 436 356 T3

Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala
 885 890 895

Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu
 900 905 910

Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu
 915 920 925

Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg
 930 935 940

Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln
 945 950 955 960

Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly
 965 970 975

Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu
 980 985 990

Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met
 995 1000 1005

Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys
 1010 1015 1020

Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg Lys Arg Cys Ala Val His
 1025 1030 1035

Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp Gln Glu Tyr Lys Lys
 1040 1045 1050

Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu Gly Gln Phe Arg
 1055 1060 1065

Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu Ile Asp Ala
 1070 1075 1080

His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His Ser Gln
 1085 1090 1095

Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu Lys
 1100 1105 1110

Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr
 1115 1120 1125

ES 2 436 356 T3

Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr
 1130 1135 1140

Met Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr
 1145 1150 1155

Asp Gln Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met
 1160 1165 1170

Pro Ala Leu Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu
 1175 1180 1185

Glu Ser Asp Phe Ala Phe Ala
 1190 1195

5 <210> 43
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> SI04364381
 <400> 43
 cagcggttga agggcaagga a 21

15 <210> 44
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> SI04369344
 <400> 44

25 atgcggaatg gaagcacgtt a 21

30 <210> 45
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> SI04250162
 <400> 45
 atggtcgtgt ccggagctaa a 21

40 <210> 46
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> SI04354420
 <400> 46

50 cagcggcttc agcccaggtt a 21

ES 2 436 356 T3

<210> 47
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
5
<220>
<223> SI00055986
<400> 47
10 atggattaa agggcggcta a 21
<210> 48
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
15
<220>
<223> SI03021508
20
<400> 48
ttcaaggttc tatgaccgaa a 21
25 <210> 49
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
30 <220>
<223> SI00055972
<400> 49
35 cagggttggt aagttgtact a 21
<210> 50
<211> 21
<212> ADN
40 <213> Artificial
<220>
<223> SI00055979
45 <400> 50
taccatctgc agtattataa a 21

REIVINDICACIONES

1. Enzima híbrida que comprende:
- 5 - por lo menos un dominio catalítico procedente de una ARN trifosfatasa,
 - por lo menos un dominio catalítico procedente de una guanililtransferasa,
 - por lo menos un dominio catalítico procedente de una N⁷ guanina-metiltransferasa, y
 - por lo menos un dominio catalítico procedente de una ARN polimerasa dependiente de ADN.
- 10 2. Enzima híbrida según la reivindicación 1, caracterizada porque es una enzima híbrida citoplásmica.
3. Enzima híbrida según la reivindicación 1 o 2, en la que dicho dominio catalítico de una ARN polimerasa dependiente de ADN es un dominio catalítico procedente de una ARN polimerasa dependiente del ADN de bacteriófago.
- 15 4. Enzima híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que por lo menos uno de dichos dominios catalíticos seleccionado de entre el grupo constituido por:
- dicho dominio catalítico de una ARN trifosfatasa;
 - dicho dominio catalítico de una guanililtransferasa y
 - dicho dominio catalítico de una N⁷-guanina-metiltransferasa;
- 20 es un dominio catalítico procedente de una enzima que forma caperuza para virus.
5. Molécula aislada de ácido nucleico o un grupo de moléculas aisladas de ácido nucleico, codificando dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico una enzima híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 25 6. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 5, que está unida funcionalmente por lo menos a un activador seleccionado de entre el grupo constituido por:
- 30 - el activador para la ARN polimerasa II; y
 - el activador para dicha ARN polimerasa dependiente de ADN.
7. Vector, que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 5 o 6.
- 35 8. Célula anfitriona que comprende una molécula de ácido nucleico o un grupo de moléculas de ácido nucleico aisladas según la reivindicación 5 o 6 o un vector según la reivindicación 7.
9. Organismo eucariota no humano genéticamente modificado, que expresa una enzima híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 40 10. Utilización *in vitro* o *ex vivo* de una enzima híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la producción de la molécula de ARN con una caperuza m⁷GpppN en el terminal 5'.
- 45 11. Procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para la producción de una molécula de ARN con una caperuza m⁷GpppN en el terminal 5' codificada por una secuencia de ADN, en una célula anfitriona, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de expresar en la célula anfitriona una molécula de ácido nucleico o un grupo de moléculas de ácido nucleico aisladas según la reivindicación 5 o 6, en el que dicha secuencia de ADN está funcionalmente unida al activador para dicha ARN polimerasa dependiente de ADN.
- 50 12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicho procedimiento comprende además la etapa de inhibir la expresión de por lo menos una de las subunidades de la ARN polimerasa dependiente de ADN endógeno y/o de la enzima endógena que forma caperuza en dicha célula anfitriona.
- 55 13. Kit para la producción de una molécula de ARN con caperuza m⁷GpppN en el terminal 5', que comprende por lo menos una enzima híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y/o una molécula de ácido nucleico aislado y/o un grupo de moléculas aisladas de ácido nucleico según la reivindicación 5 o 6, y/o un vector según la reivindicación 7.
- 60 14. Composición farmacéutica que comprende una enzima híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y/o una molécula aislada de ácido nucleico y/o un grupo de moléculas aisladas de ácido nucleico según la reivindicación 5 o 6 y/o un vector según la reivindicación 7.
- 65 15. Composición farmacéutica según la reivindicación 14, que comprende además:
- por lo menos una secuencia de ADN de interés, en el que dicha secuencia de ADN está funcionalmente unida al activador para dicha ARN polimerasa dependiente de ADN.

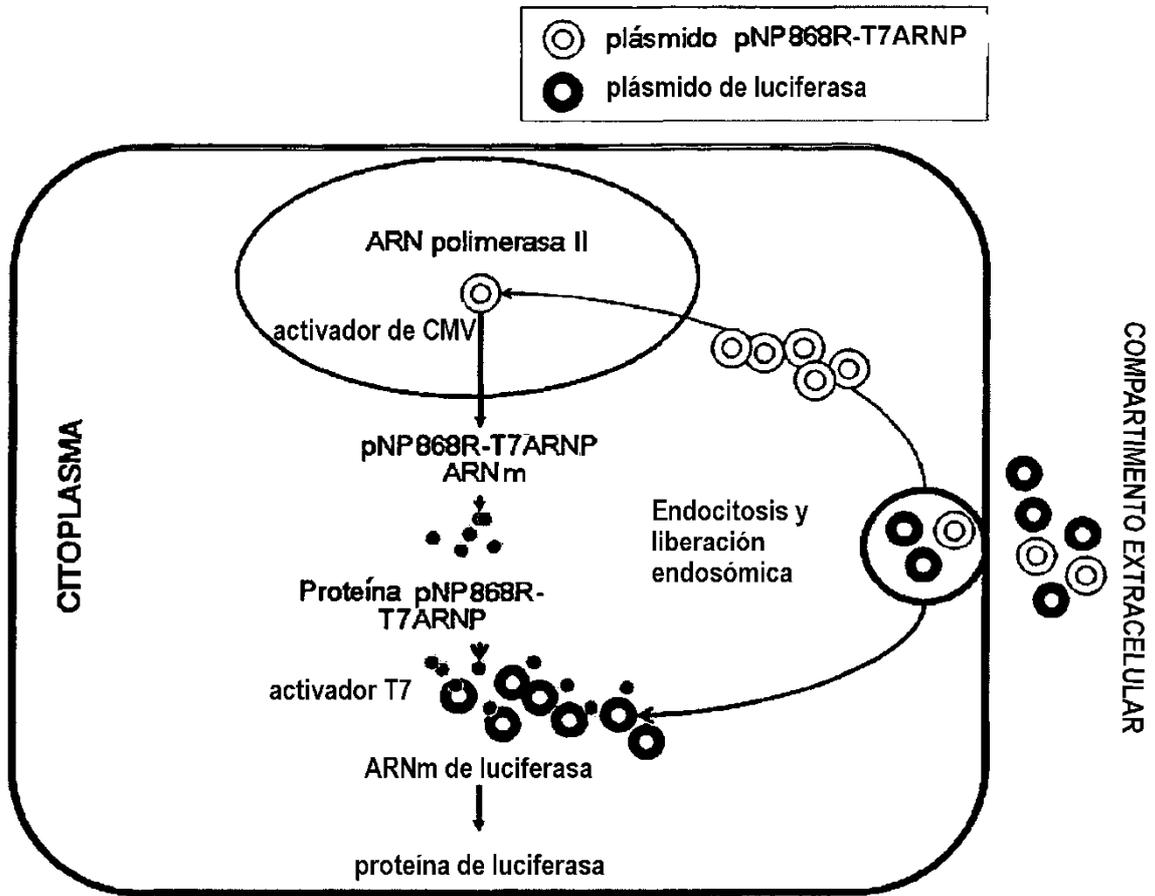


Figura 1

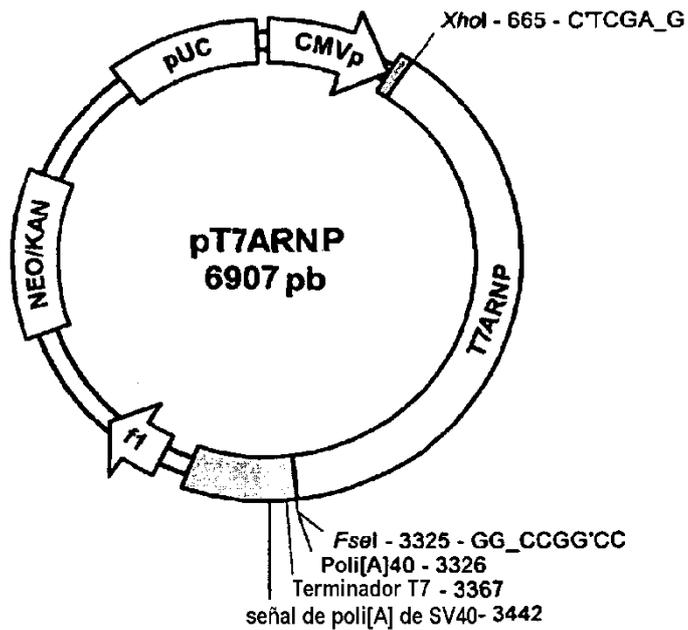


Figura 2 A

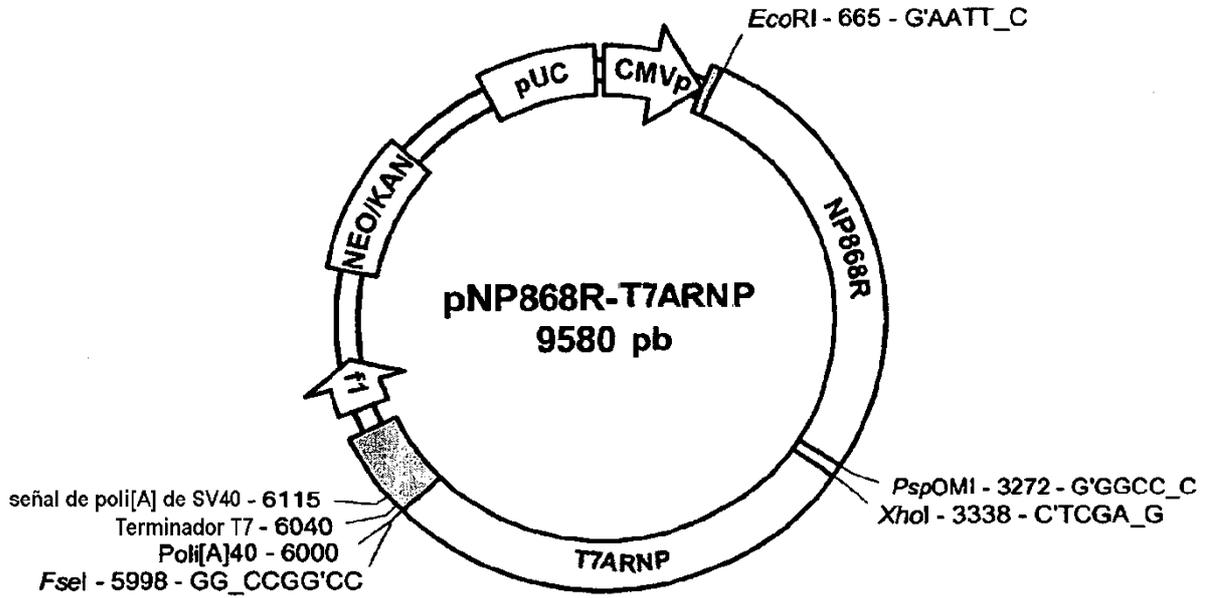


Figura 2 B

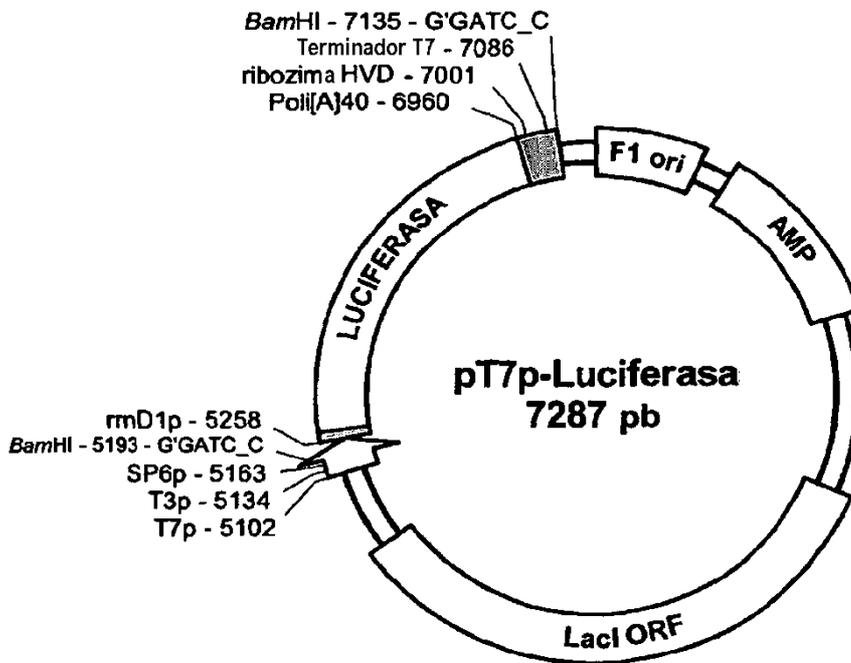
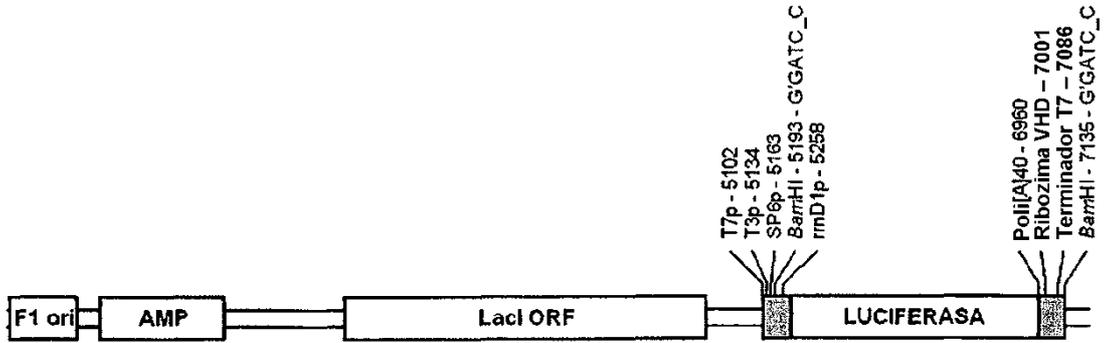


Figura 3 A



pT7p-luciferasa digerido con BamHI
7287 bp

Figura 3 B

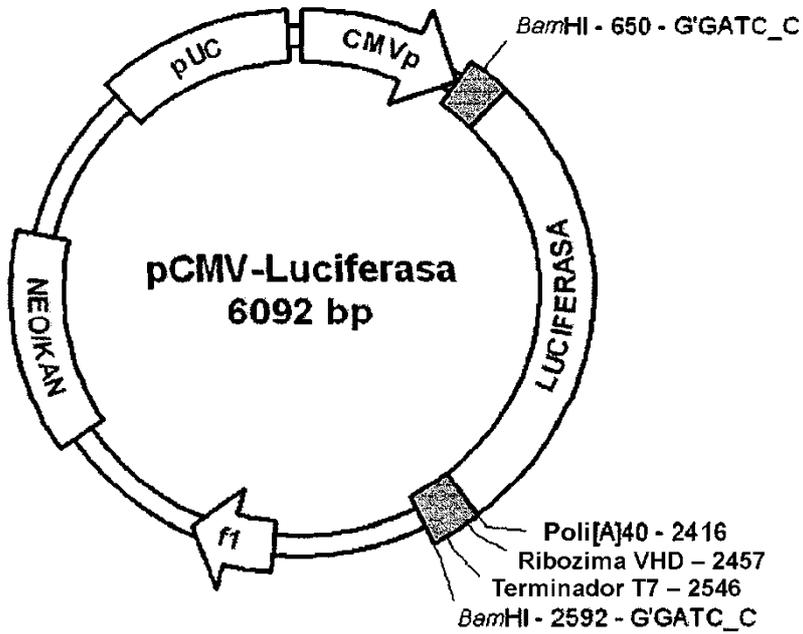


Figura 3 C

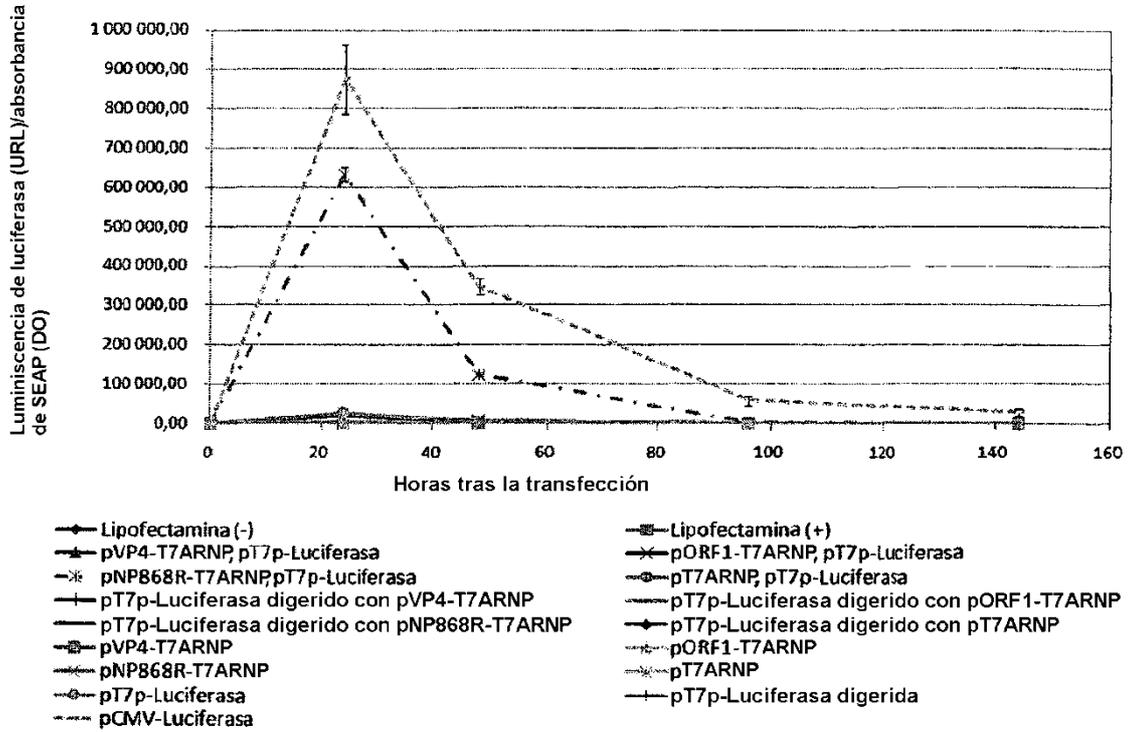


Figura 4 A

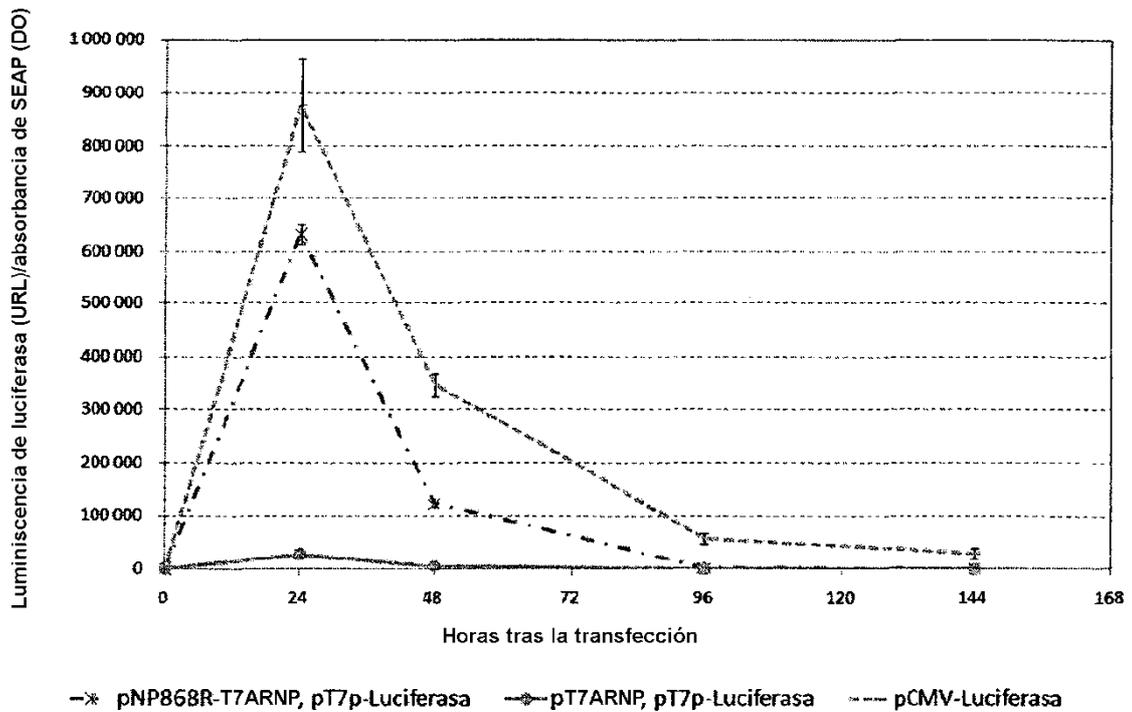


Figura 4 B

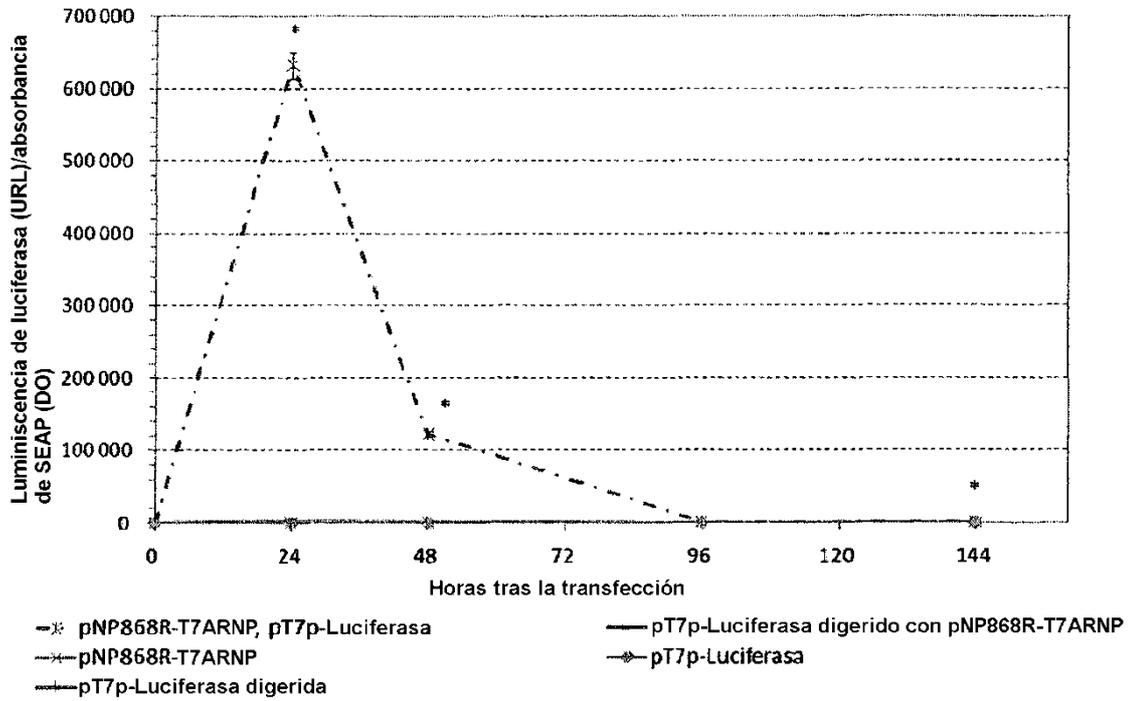


Figura 4 C

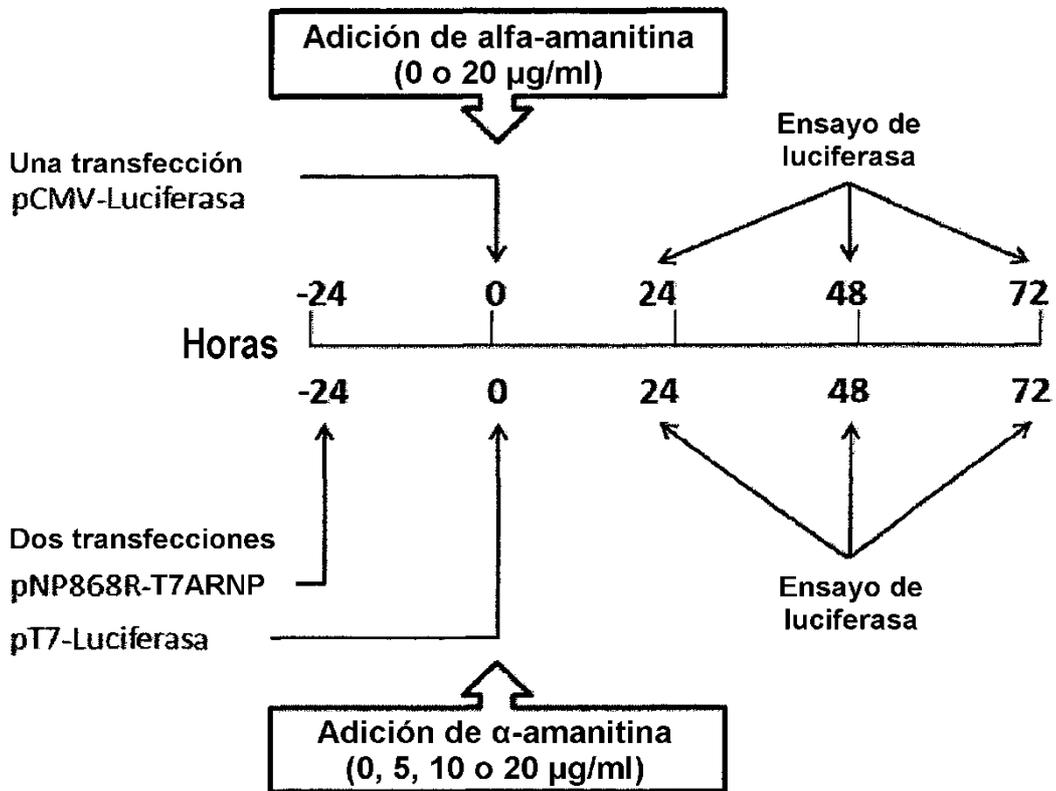


Figura 5 A

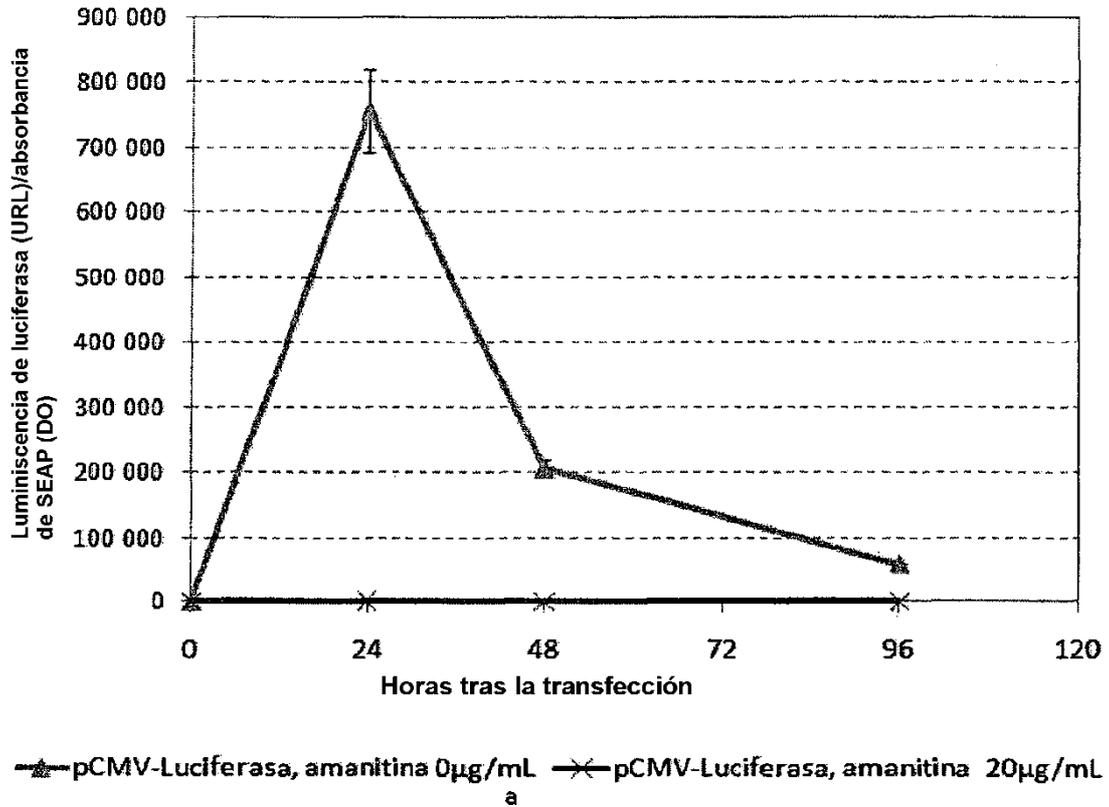


Figura 5 B

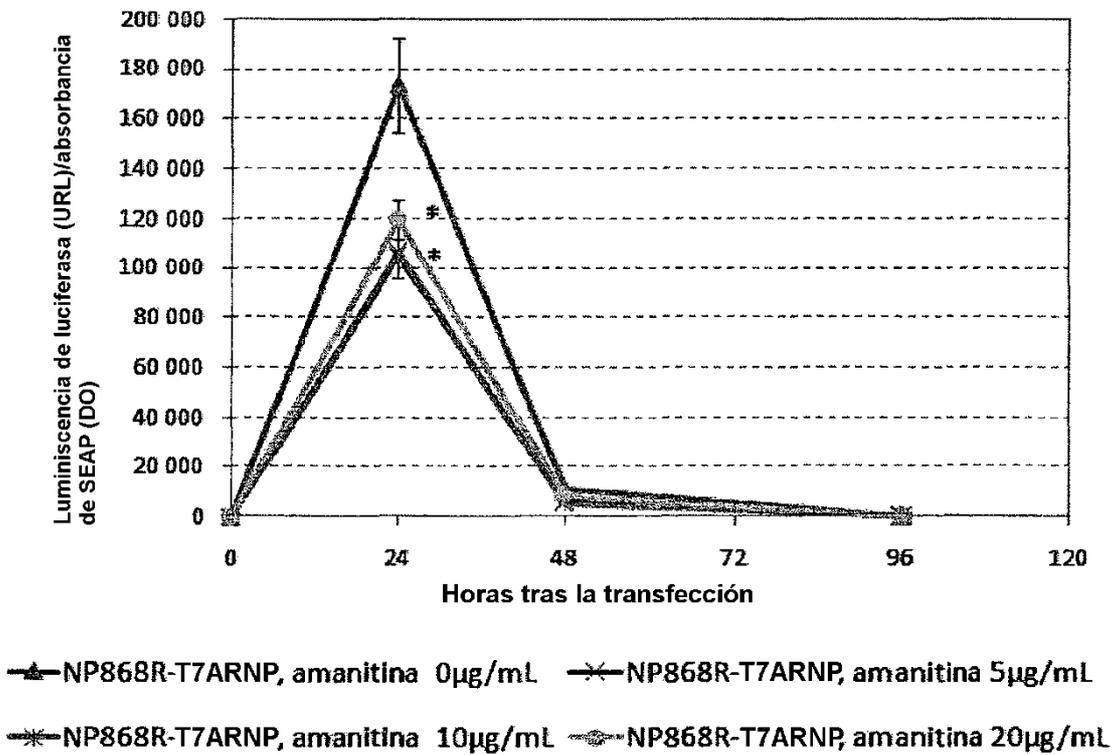


Figura 5 C

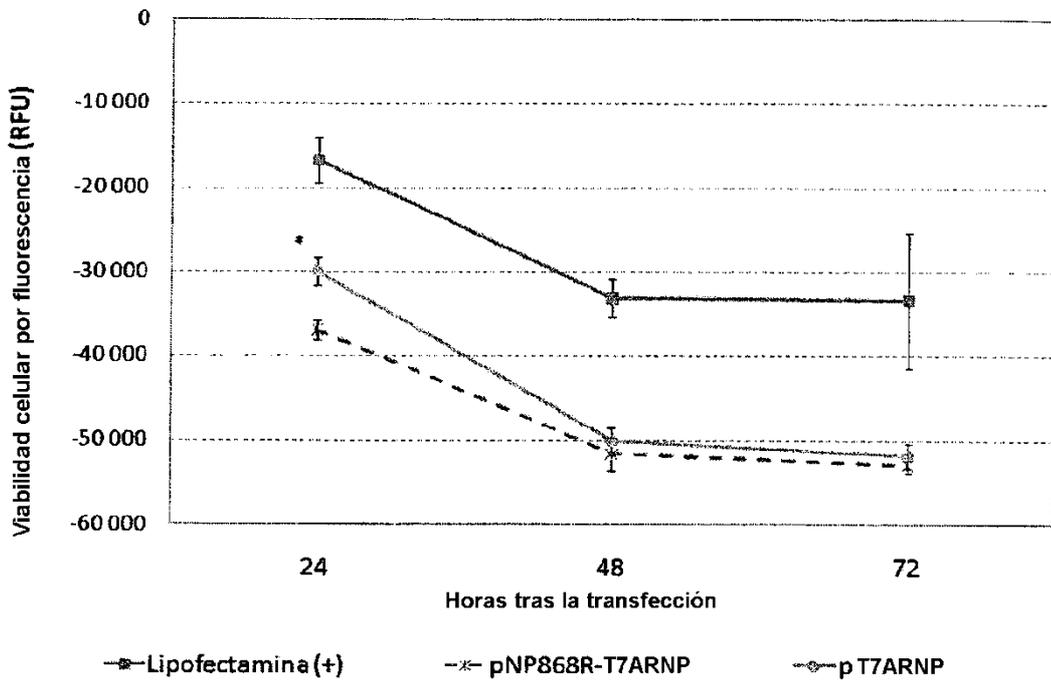


Figura 6 A

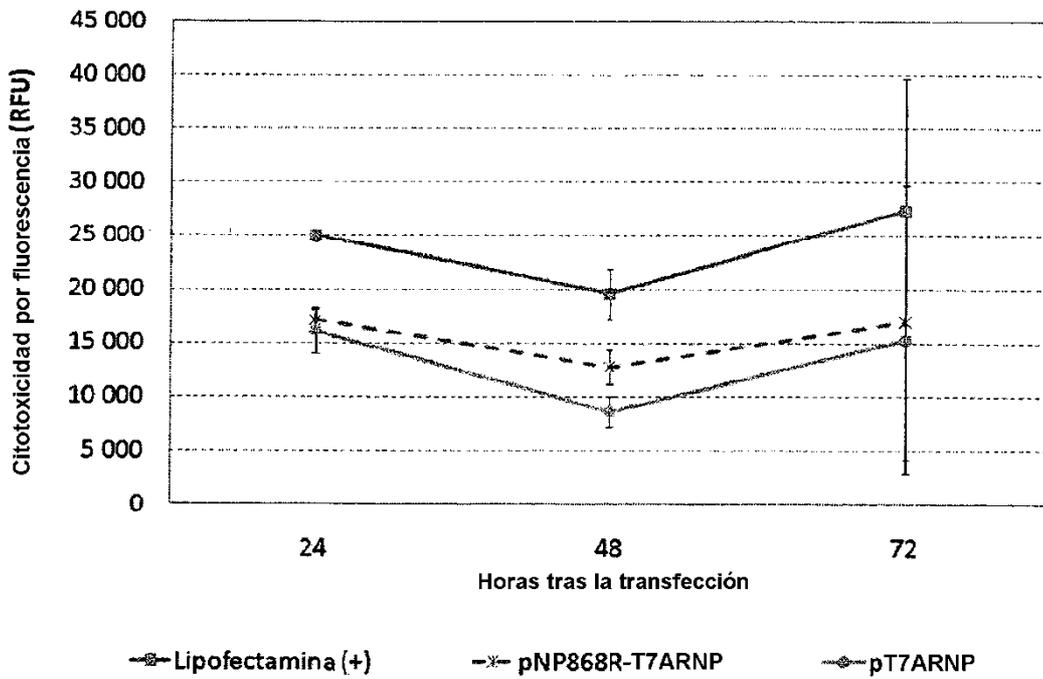


Figura 6 B

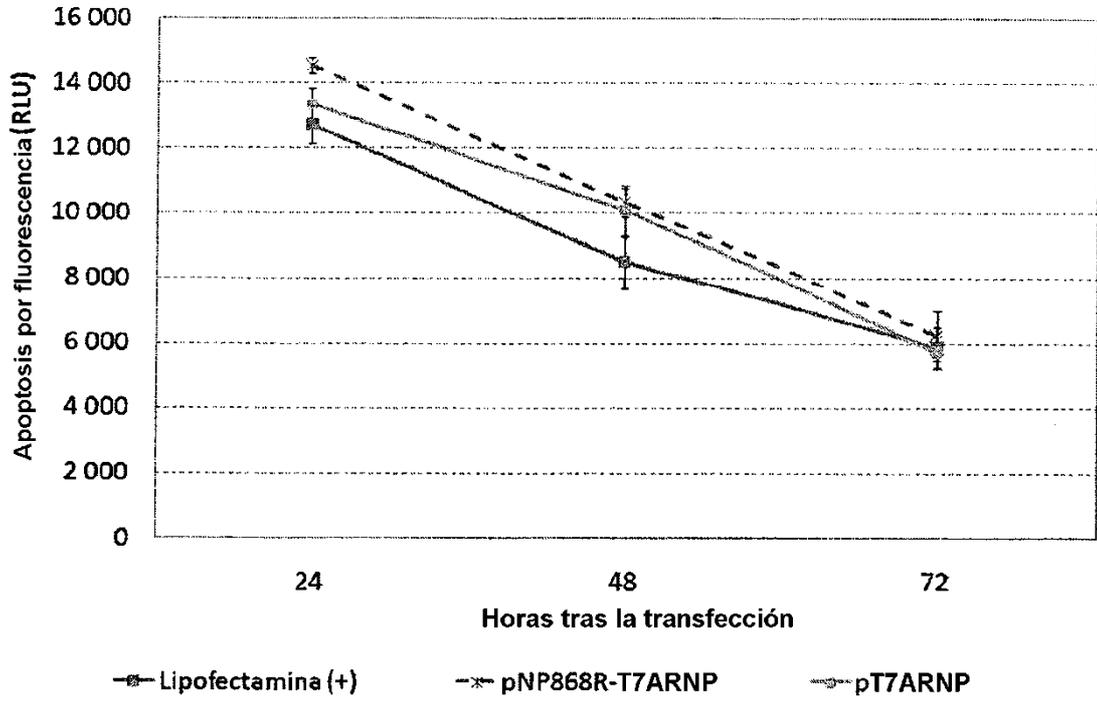


Figura 6 C

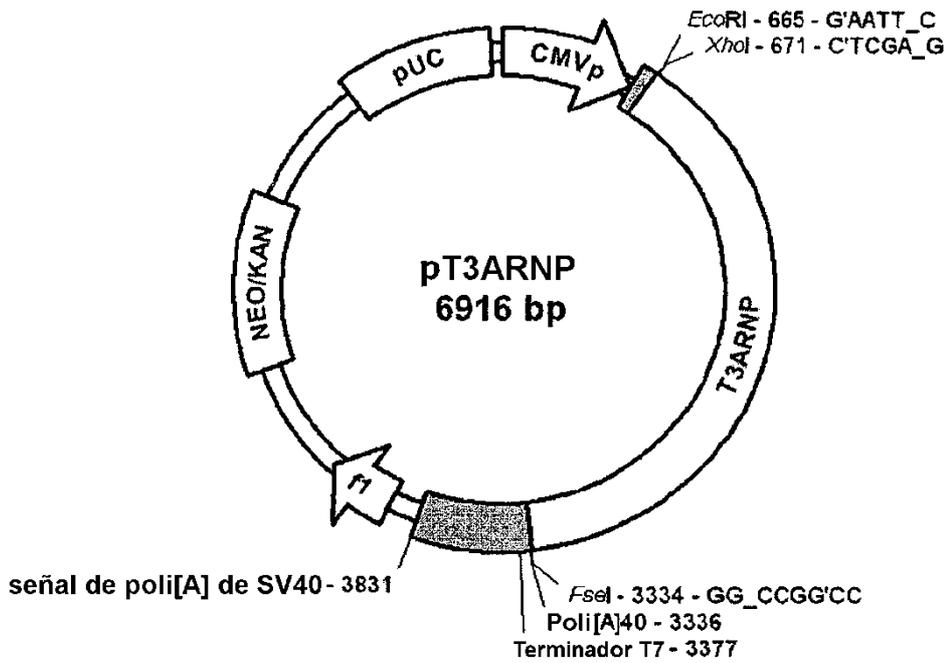


Figura 7 A

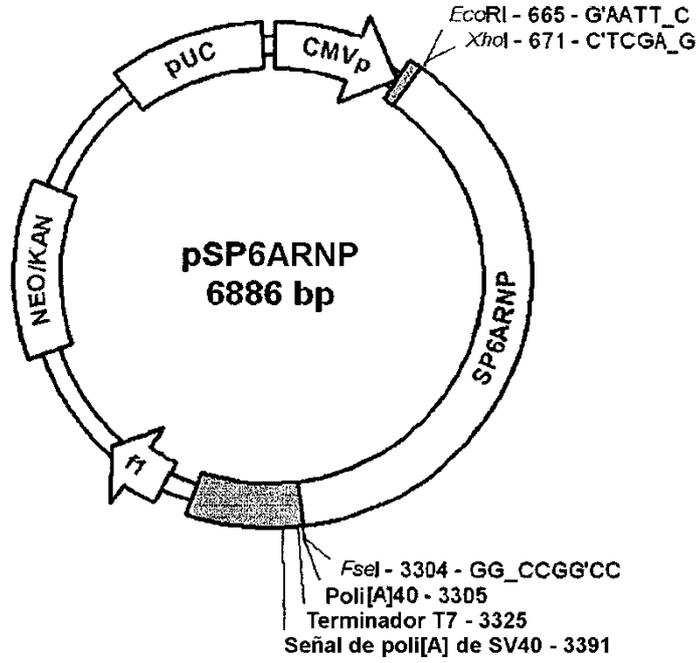


Figura 7 B

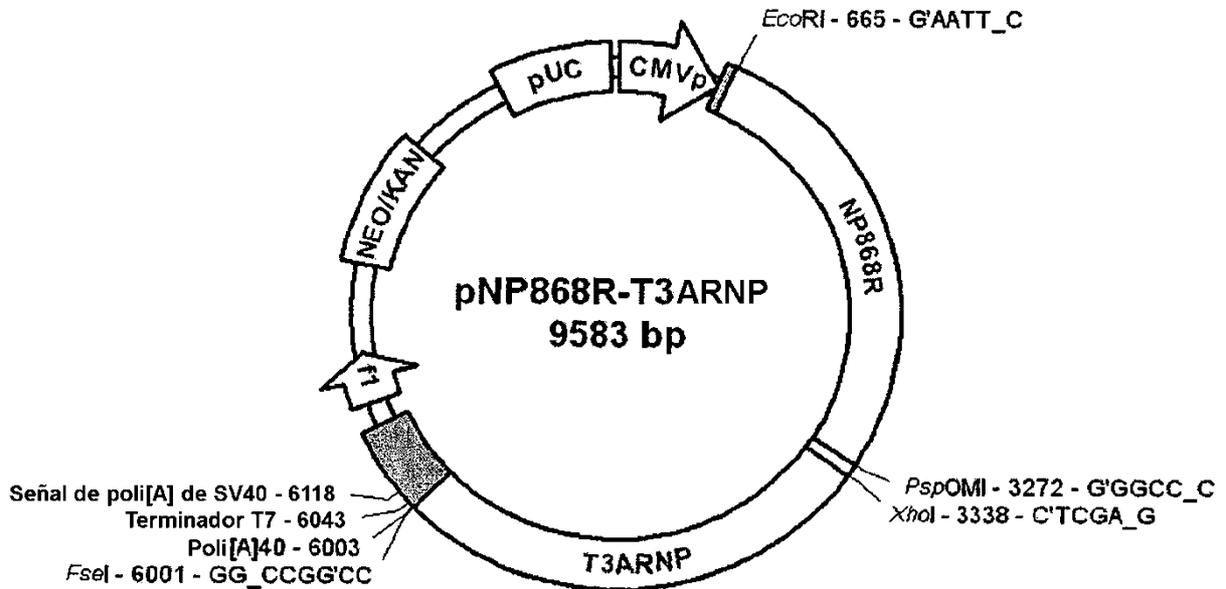


Figura 7 C

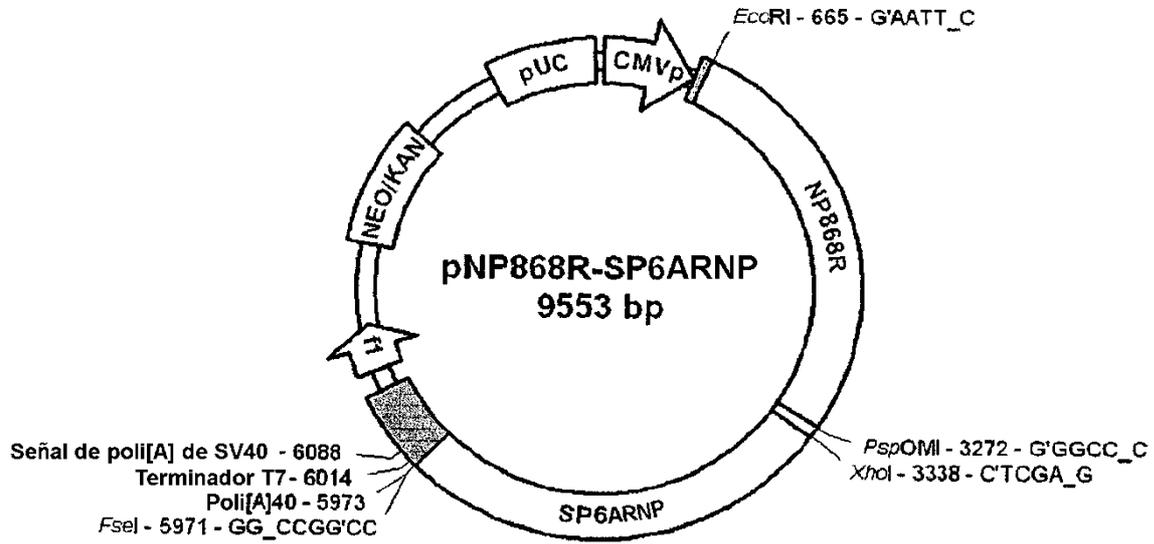


Figura 7 D

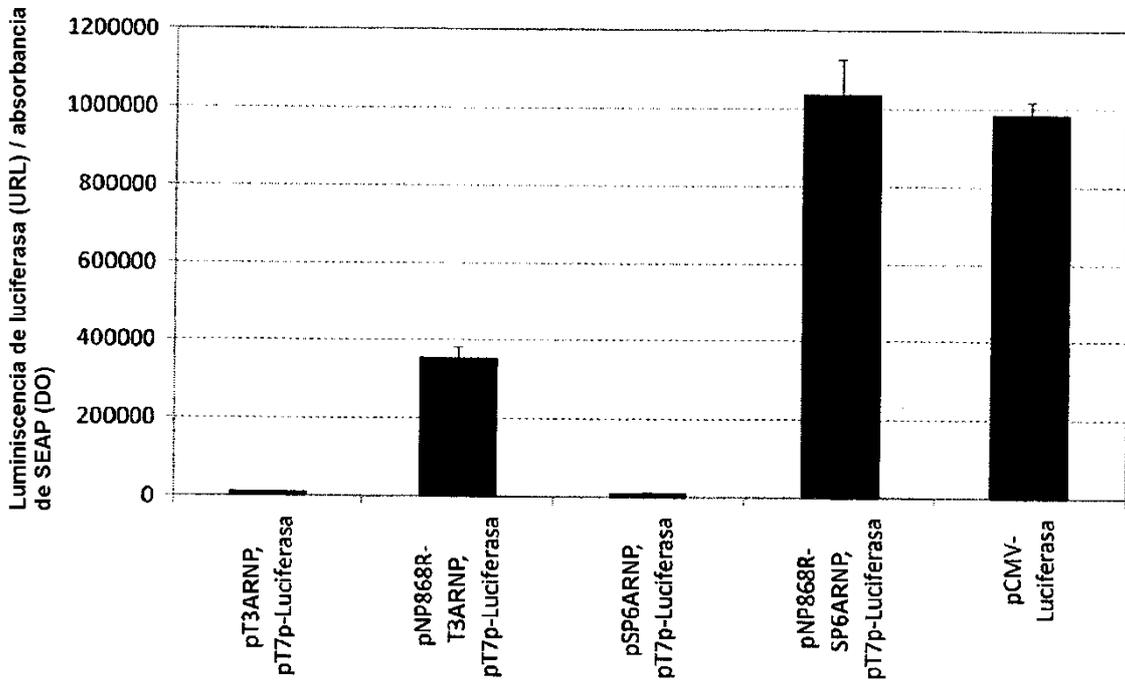


Figura 8

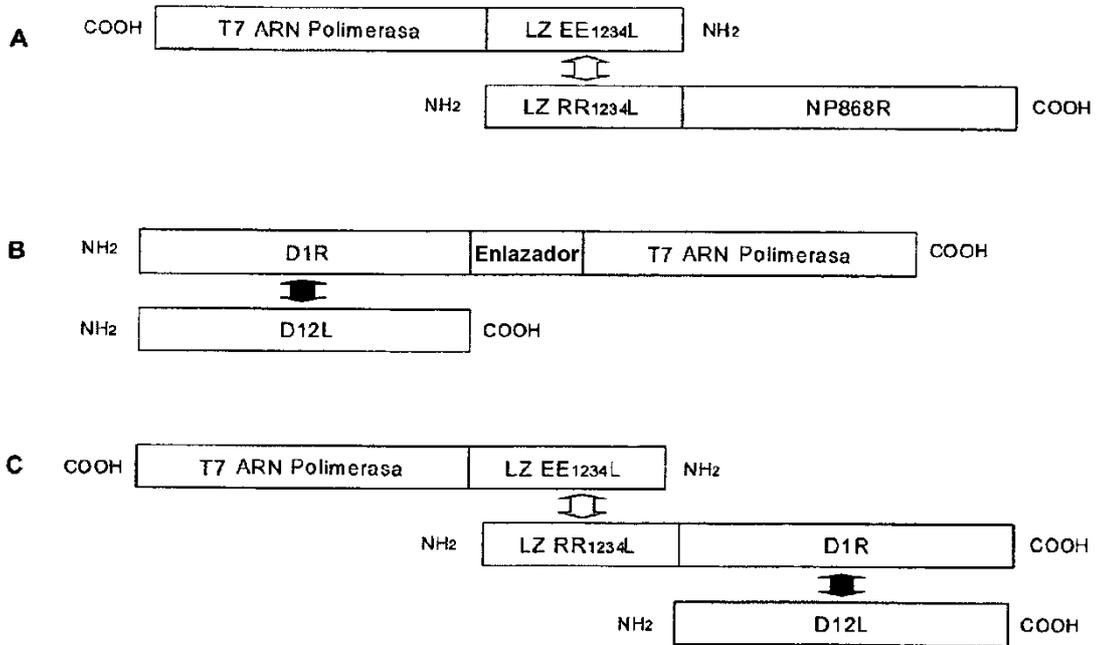


Figura 9

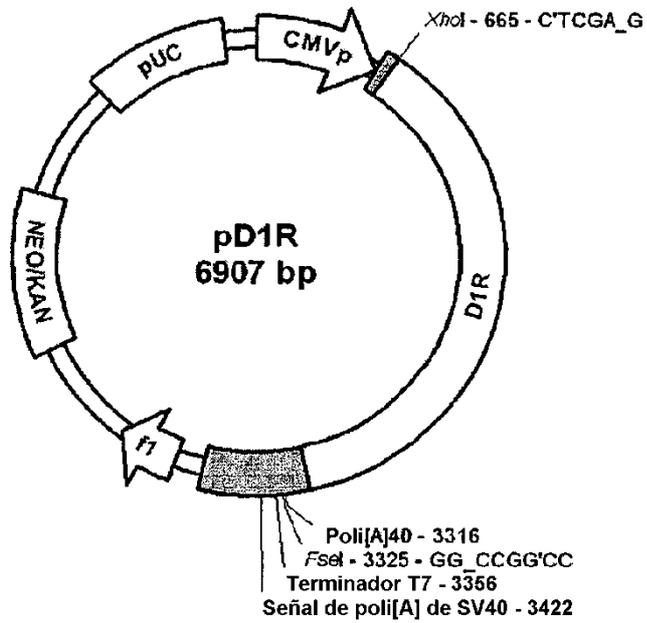


Figura 10 A

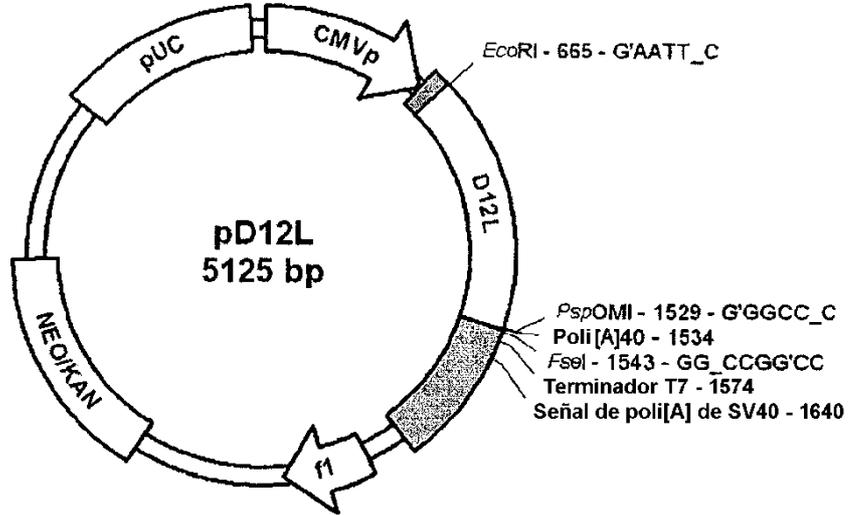


Figura 10 B

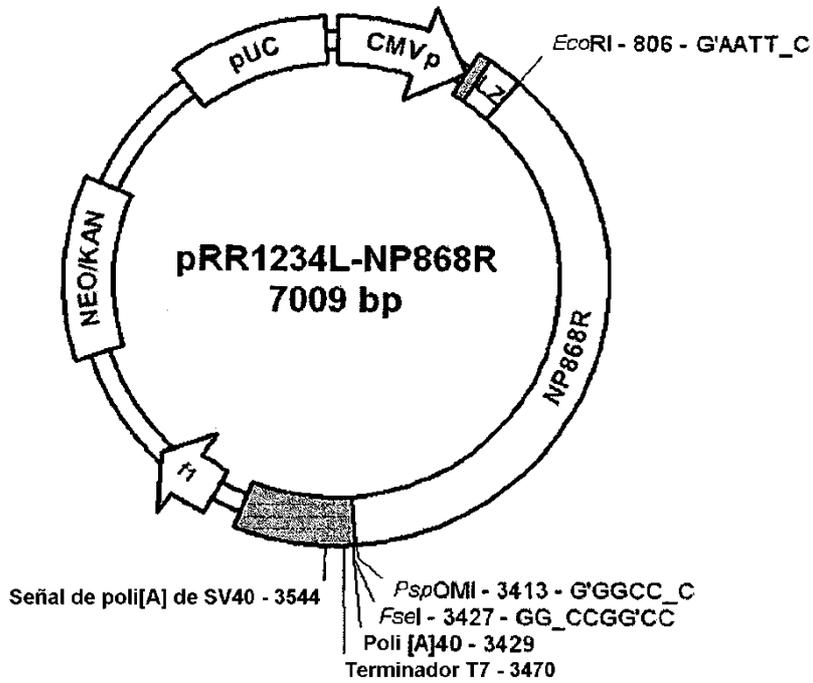


Figura 10 C

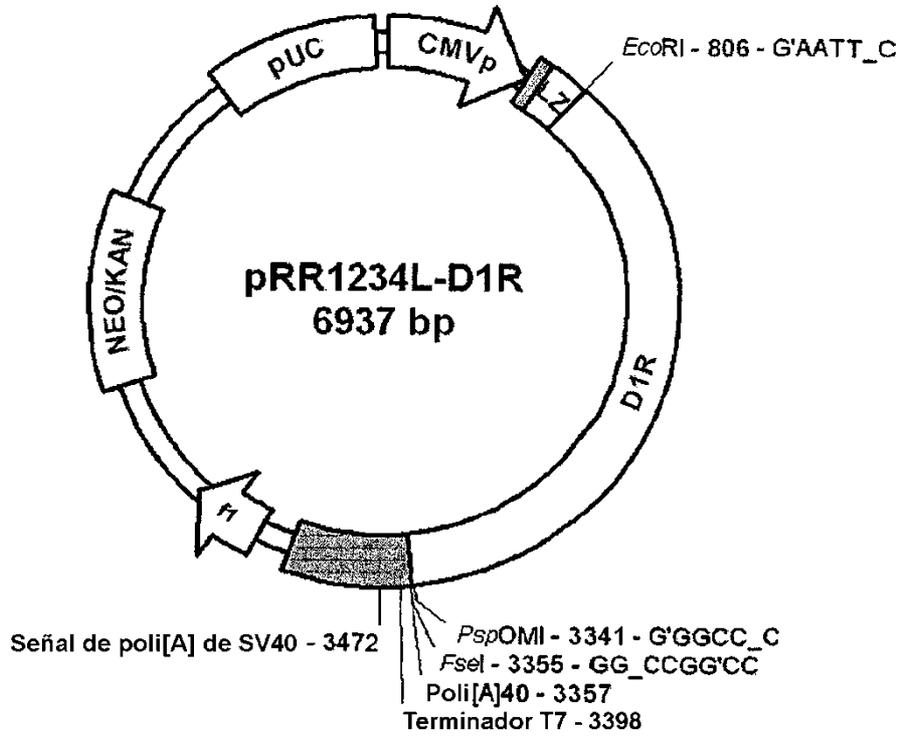


Figura 10 D

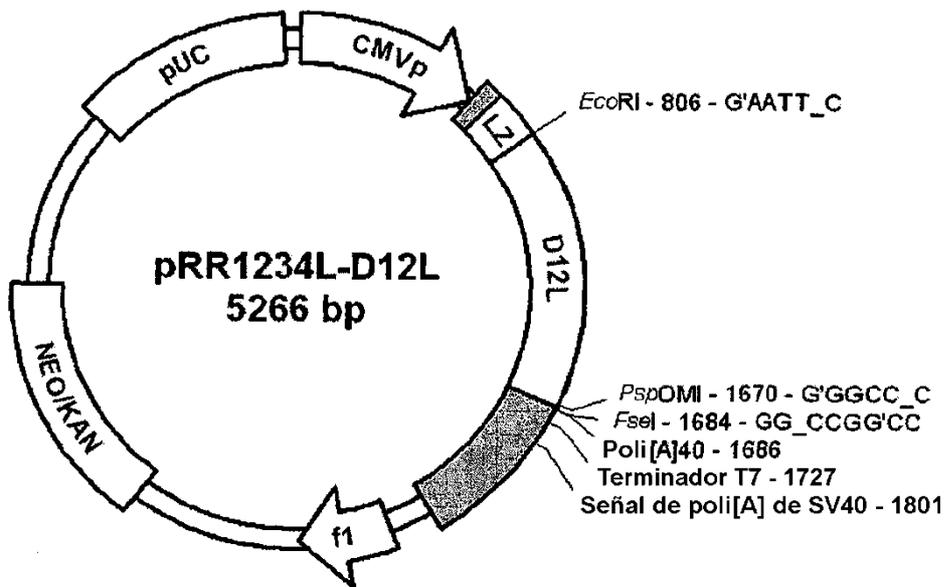


Figura 10 E

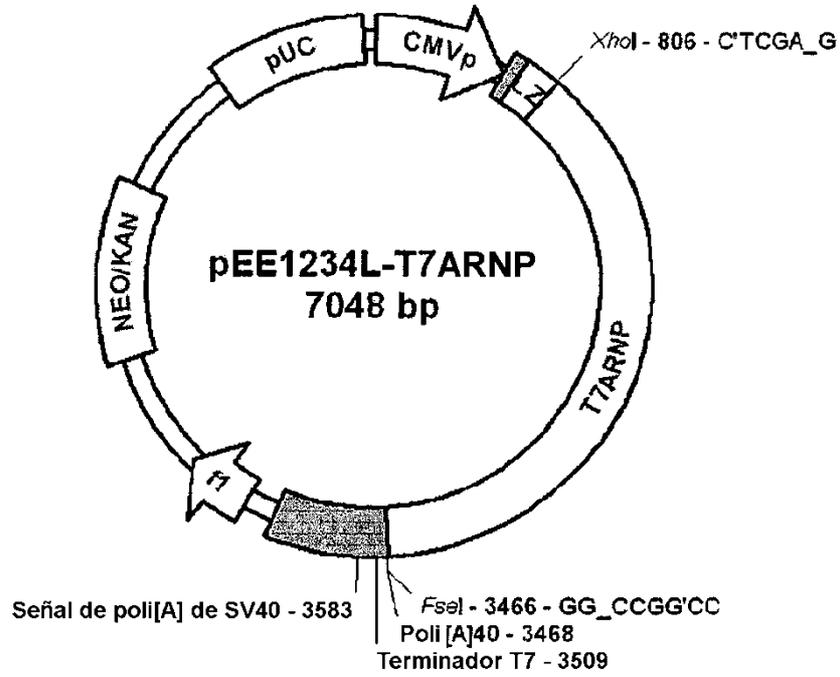


Figura 10 F

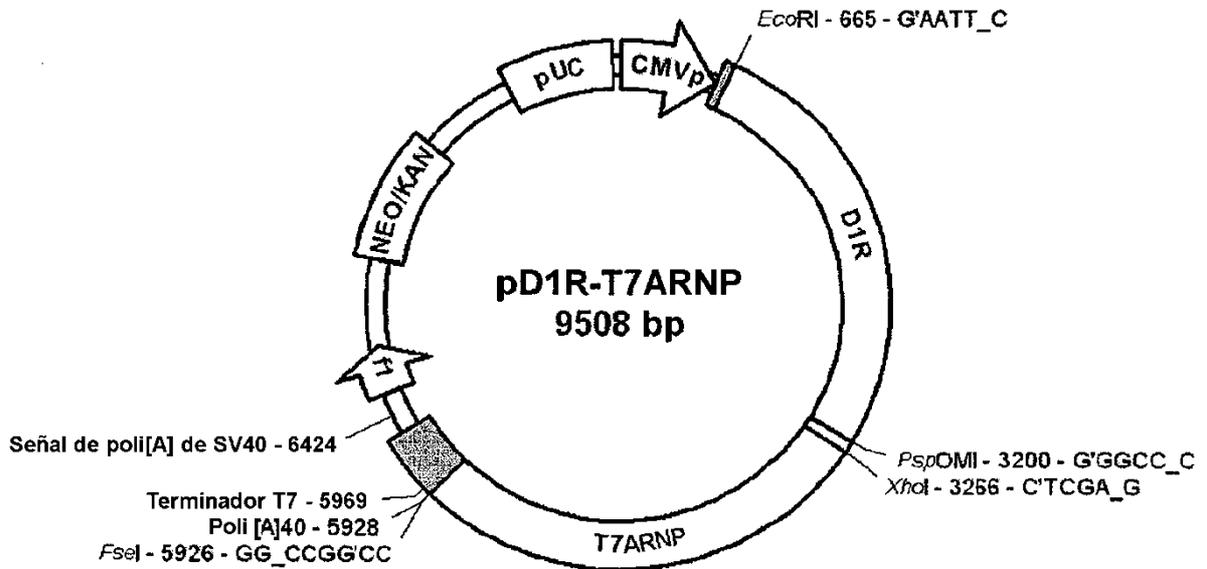


Figura 10 G

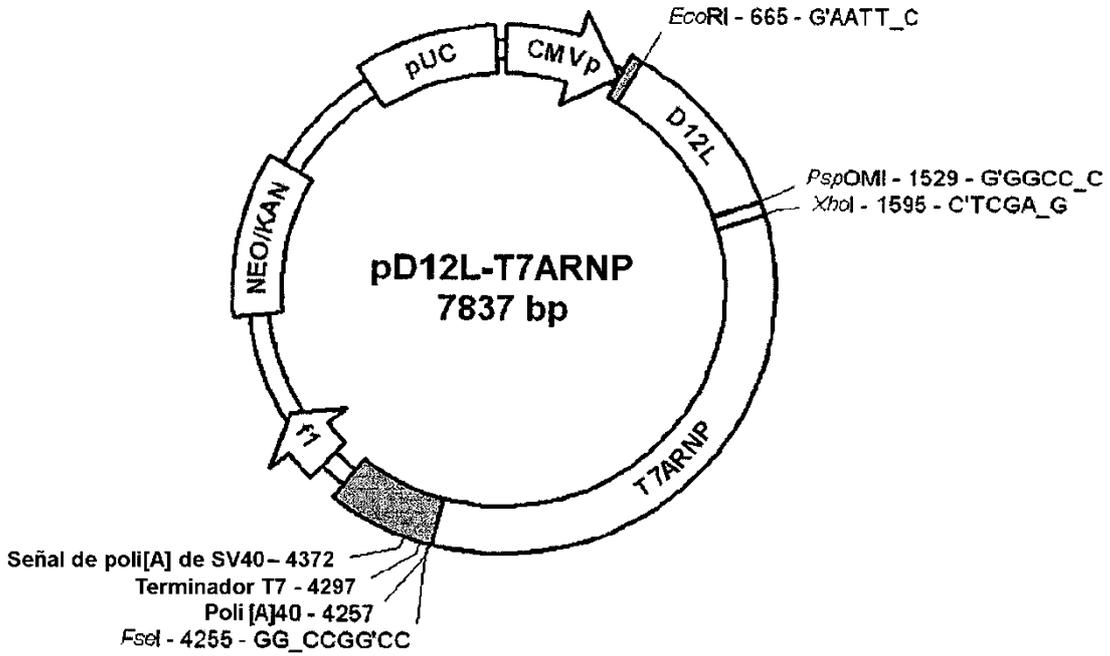


Figura 10 H

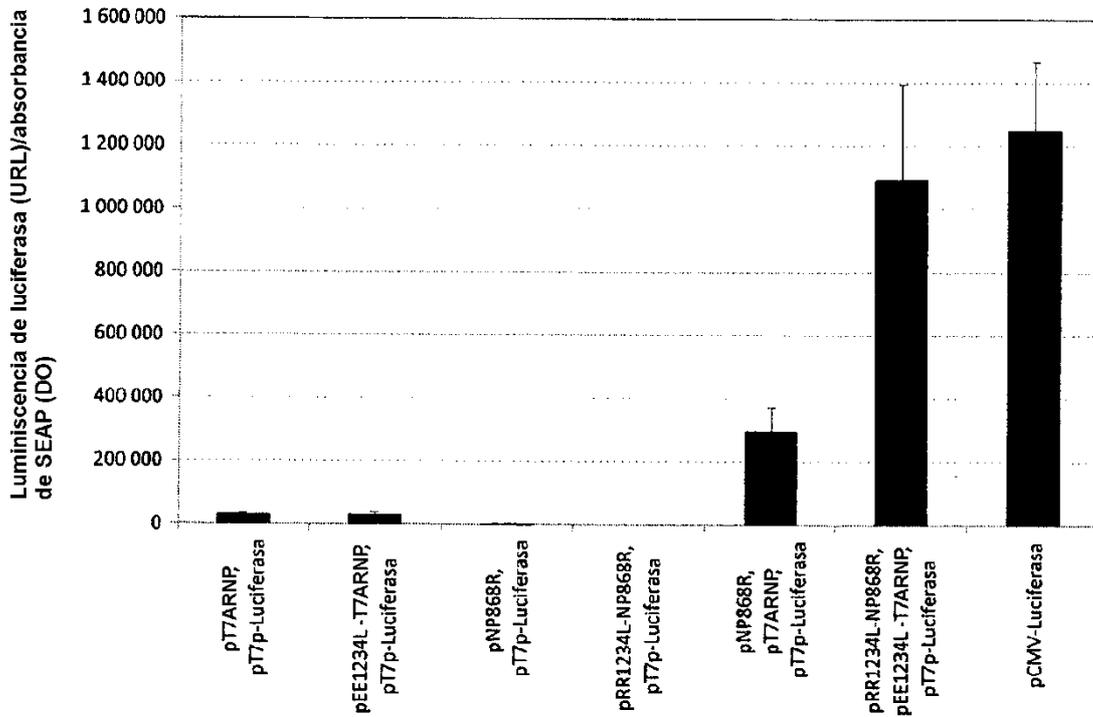


Figura 11

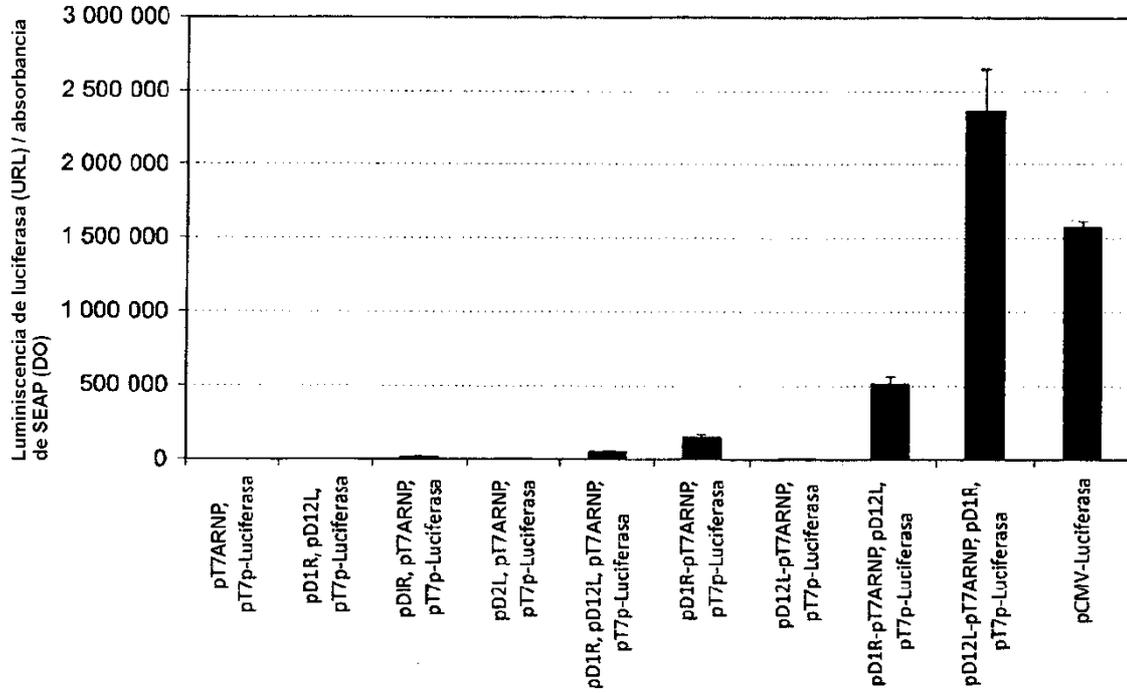


Figura 12

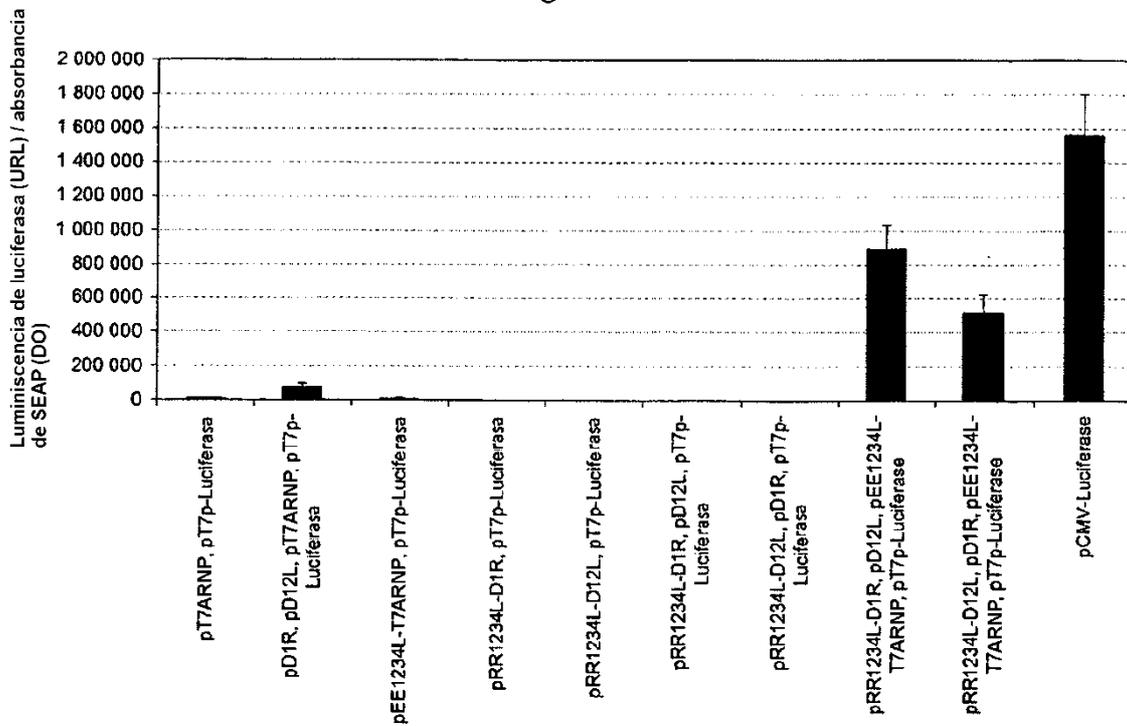


Figura 13

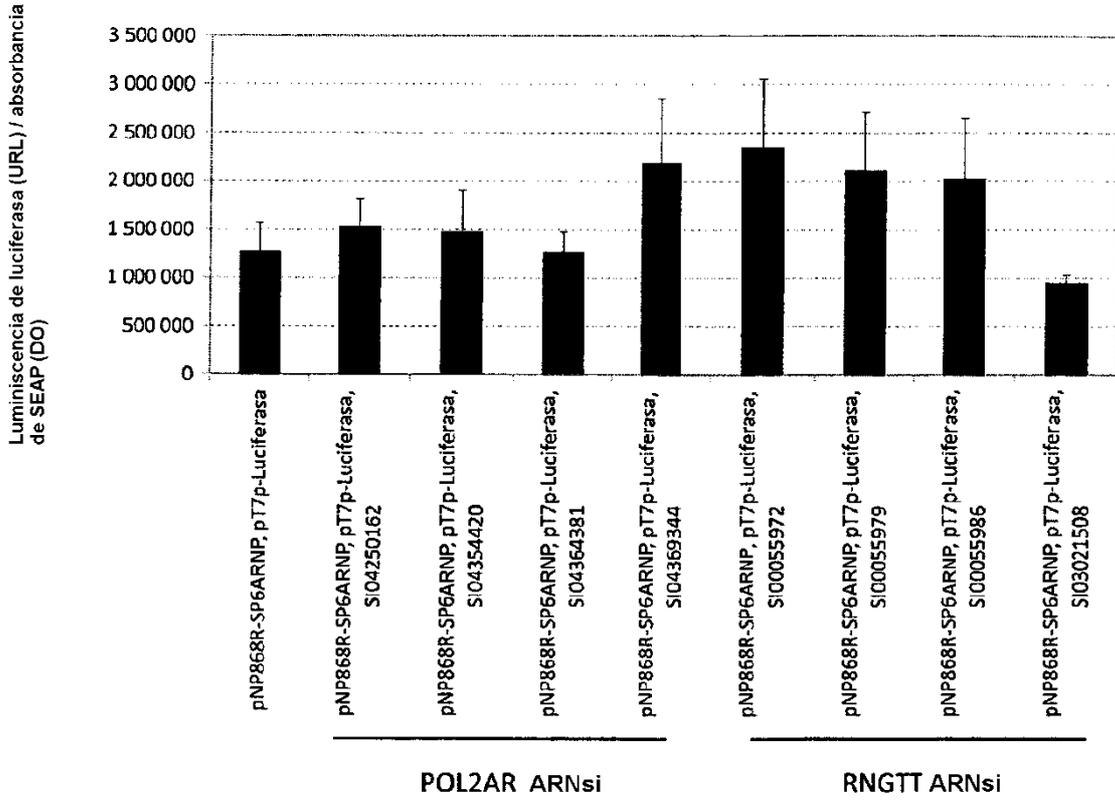


Figura 14

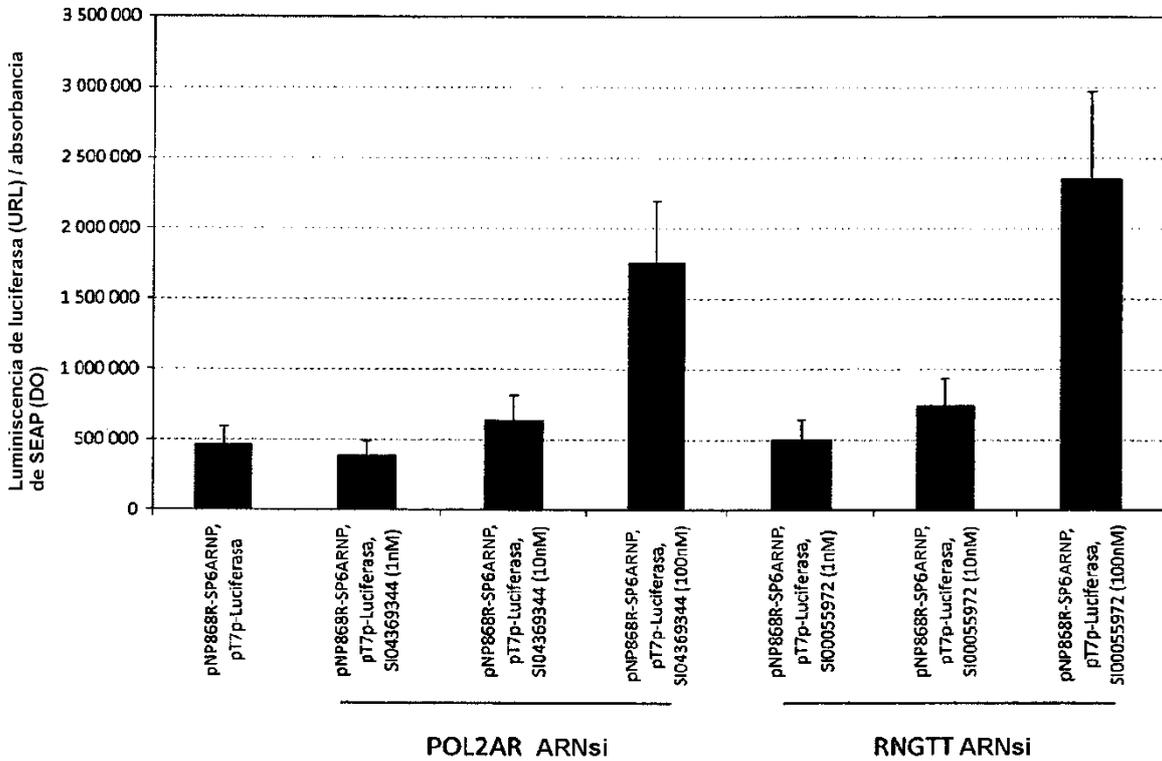


Figura 15