

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 217**

51 Int. Cl.:

C07K 14/33 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/866 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2011 E 11702755 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2528940**

54 Título: **Métodos de conversión intracelular de proteínas de cadena sencilla en su forma dicadena**

30 Prioridad:

25.01.2010 US 286963 P

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

26.08.2014

73 Titular/es:

ALLERGAN, INC. (100.0%)
2525 Dupont Drive
Irvine, CA 92612, US

72 Inventor/es:

GHANSHANI, SANJIV;
LE, LINH Q.;
LIU, YI y
STEWART, LANCE E.

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 488 217 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

Métodos de conversión intracelular de proteínas de cadena sencilla en su forma dicadena.

La capacidad de las toxinas clostridiales, tal como, por ejemplo, neurotoxinas botulínicas (BoNTs), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F y BoNT/G, y neurotoxina tetánica (TeNT), para inhibir la transmisión neuronal se han explotado en una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas y cosméticas, véase por ejemplo, William J. Lipham, COSMETIC AND CLINICAL APPLICATIONS OF BOTULINUM TOXIN (Slack, Inc., 2004). Las toxinas clostridiales disponibles comercialmente como composiciones farmacéuticas incluyen, preparados de BoNT/A, tal como, por ejemplo, BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, CA), DYSPORT®/RELOXIN®, (Beaufour Ipsen, Porton Down, Inglaterra), NEURONOX® (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, Corea del Sur) BTX-A (Lanzhou Institute Biological Products, China) y XEOMIN® (Merz Pharmaceuticals, GmbH., Frankfurt, Alemania); y preparados de BoNT/B, tal como, por ejemplo, MYOBLOC™/NEUROBLOC™ (Elan Pharmaceuticals, San Francisco, CA). Como un ejemplo, BOTOX® está aprobado normalmente en uno o más países para las siguientes indicaciones: acalasia, espasticidad adulta, fisura anal, dolor de espalda, blefarospasmo, bruxismo, distonía cervical, temblor esencial, líneas glabellares o líneas faciales hiperkinéticas, dolor de cabeza, espasmo hemifacial, hiperactividad de la vejiga, hiperhidrosis, parálisis cerebral juvenil, esclerosis múltiple, trastornos mioclónicos, líneas nasolabiales, disfonía espasmódica, estrabismo y trastorno nervioso VII.

La utilidad terapéutica de toxinas clostridiales se ha expandido más allá de sus aplicaciones mio-relajantes habituales para tratar enfermedades basadas en nervio sensorial, tal como, por ejemplo, varias clases de dolor crónico, inflamación neurogénica y trastornos urogenitales, además de trastornos con base no neuronal, tal como, por ejemplo, pancreatitis. Una aproximación que se está explotando actualmente para expandir las terapias basadas en toxina clostridial implica modificar una toxina clostridial de manera que la toxina modificada tiene una capacidad de señalización celular alterada para una célula que no es diana de toxina clostridial. Esta capacidad re-dirigida se alcanza sustituyendo un dominio de señalización que se da de forma natural de una toxina clostridial con un dominio de señalización que muestra una actividad de unión selectiva por un receptor que no es de la toxina clostridial presente en una célula que no es diana de toxina clostridial. Dichas modificaciones a un dominio de señalización dan por resultado una toxina modificada que es capaz de unirse de forma selectiva a un receptor que no es de la toxina clostridial (receptor diana) presente en una célula que no es diana de toxina clostridial (re-dirigida). Una toxina clostridial re-dirigida con una actividad de señalización para una célula que no es diana de la toxina clostridial puede unirse a un receptor presente en la célula que no es diana de la toxina clostridial, translocarse en el citoplasma y ejercer su efecto proteolítico en el complejo SNARE de la célula que no es diana de la toxina clostridial.

Ejemplos no limitantes de toxinas clostridiales re-dirigidas con una actividad de señalización para una célula que no es diana de la toxina clostridial se describen en, por ejemplo, Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, Patente de EE.UU. 5.989.545; Clifford C. Shone et al., *Recombinant Toxin Fragments*, Patente de EE.UU. 6.461.617; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, Patente de EE.UU. 6.500.436; Conrad P. Quinn et al., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, Patente de EE.UU. 6.632.440; Lance E. Steward et al., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, Patente de EE.UU. 6.843.998; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, Patente de EE.UU. 7.419.676; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Patente de EE.UU. 7.514.088; Keith A. Foster et al., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, Publicación de Patente de EE.UU. 2003/0180289; y Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, Publicación de Patente Internacional WO 2005/023309. La capacidad para re-dirigir los efectos terapéuticos asociados con las toxinas clostridiales ha extendido enormemente el número de aplicaciones medicinales capaces de usar una terapia de toxina clostridial. Como un ejemplo no limitante, las toxinas clostridiales modificadas redirigidas a neuronas sensoras son útiles en el tratamiento de varias clases de dolor crónico, tal como, por ejemplo, hiperalgesia y alodinia, dolor neuropático y dolor inflamatorio, véase, por ejemplo, Foster, *supra*, (1999); y Donovan, *supra*, (2002); y Stephan Donovan, *Method For Treating Neurogenic Inflammation Pain with Botulinum Toxin and Substance P Components*, Patente de EE.UU. 7.022.329. Como otro ejemplo no limitante, las toxinas clostridiales modificadas redirigidas a células pancreáticas son útiles en el tratamiento de pancreatitis, véase, por ejemplo, Steward, *supra*, (2005).

Las toxinas clostridiales, si se dan de forma natural o modificada, se procesan en una forma dicadena para alcanzar la actividad total. Las toxinas clostridiales que se dan de forma natural se traducen cada una como un polipéptido de cadena sencilla de aproximadamente 150 kDa que se escinde posteriormente por escisión proteolítica en un bucle disulfuro mediante una proteasa que se da de forma natural (FIG. 1). Esta escisión se da en la región de bucle dicadena discreta creada entre dos residuos cisteína que forman un puente disulfuro. Este procesado post-traducciona da una molécula dicadena que comprende una cadena ligera de aproximadamente 50 kDa (CL), que comprende el dominio enzimático, y una cadena pesada de aproximadamente 100 kDa (CP), que comprende los dominios de translocación y unión celular, manteniéndose la CL y la CP juntas mediante el enlace disulfuro sencillo e interacciones no covalentes (FIG. 1). Las toxinas clostridiales producidas de forma recombinante sustituyen generalmente el sitio de escisión de proteasa del bucle dicadena que se da de forma natural con un sitio de escisión de proteasa exógena (FIG. 2). Véase, por ejemplo, Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, Patente de EE.UU. 7.419.676. Aunque las toxinas clostridiales re-dirigidas varían en su peso molecular total por el tamaño del resto de señalización, el proceso de activación y su dependencia de los sitios de escisión exógenos es

esencialmente el mismo que el de las toxinas clostridiales producidas de forma recombinante. Véase, por ejemplo, Steward, L.E. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, Publicación de Patente de EE.UU. 2009/0005313; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, Solicitud de Patente de EE.UU. 11/776.075; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity for Clostridial Toxin Target Cells*, Publicación de Patente de EE.UU. 2008/0241881.

Hasta la fecha, la conversión de la forma de cadena sencilla de una toxina clostridial producida de forma recombinante o toxina clostridial modificada en su forma dicadena requirió un proceso de activación in vitro. Primero, las células bacterianas usadas para producir de forma recombinante estas toxinas carecen de la proteasa que se da de forma natural presente en las cepas clostridiales que producen las toxinas nativas. Segundo, no ha habido gran necesidad de que las células bacterianas produzcan toxinas activadas de forma recombinante por preocupaciones de seguridad surgidas en el manejo de toxinas activadas. Véase, por ejemplo, Dolly, U.S. 7.419.676, *supra*, (2008). Sin embargo, si estas preocupaciones pudieran superarse, la producción de toxinas activadas producidas de forma recombinante modernizarían el proceso de fabricación de toxinas clostridiales producidas de forma recombinante o toxinas clostridiales modificadas. Por ejemplo, actualmente la fabricación de toxinas clostridiales producidas de forma recombinante o toxinas clostridiales modificadas implica las siguientes etapas de purificación: 1) cromatografía de afinidad por metales inmovilizados, 2) diálisis de intercambio de tampón, 3) reacción de escisión de proteasa, 4), cromatografía de intercambio iónico y 5) adición de PEG y congelación rápida por almacenamiento a -80°C. El uso de una célula bacteriana que puede escindir proteolíticamente la toxina clostridial recombinante de forma intracelular mientras está aún expresando la toxina puede reducir el número de etapas de purificación a las siguientes: 1) cromatografía de afinidad por metales inmovilizados, 2) diálisis de intercambio de tampón, 3) cromatografía de intercambio iónico y 4) adición de PEG y congelación rápida por almacenamiento a -80°C.

El documento US 2004/018589 describe un método intracelular para convertir una toxina clostridial de cadena sencilla que comprende una región de bucle dicadena en una forma dicadena que comprende la etapa de hacer crecer una célula *E. coli* que comprende una construcción con un MLA que codifica una toxina clostridial de cadena sencilla que tiene entre otros un sitio de escisión de proteasa Factor Xa, junto con una construcción que comprende un MLA que codifica una proteasa Factor Xa.

La presente memoria describe un método para convertir una proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle dicadena en su forma dicadena que no depende de un proceso in vitro para convertir la forma de cadena sencilla de la toxina en su forma dicadena. Esto se consigue mediante el uso de células que expresan tanto la proteína como la proteasa necesaria para convertirla a dicadena activa.

Así, aspectos de la presente memoria proporcionan, una construcción de expresión dual que incluye un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena y un marco de lectura abierta que codifica una proteasa que puede escindir proteolíticamente el sitio de escisión de proteasa exógena situada en la región de bucle dicadena. En aspectos adicionales, la proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena puede ser, por ejemplo, una toxina clostridial que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, una toxina clostridial modificada que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, o una proteína de cadena sencilla que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión que no es de toxina clostridial, y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. Los polinucleótidos, además de las toxinas clostridiales que comprenden una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena que codifican, se describen en, por ejemplo, Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, Patente de EE.UU. 7.132.259; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, Patente de EE.UU. 7.419.676. Los polinucleótidos, además de las proteínas que comprenden un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión que no es de toxina clostridial, y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena que codifican, se describen en, por ejemplo, Steward, L.E. et al., *Multivalent Clostridial Toxins*, Publicación de Patente de EE.UU. 2009/0048431; Steward, L.E. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, Publicación de Patente de EE.UU. 2009/0069238; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, Solicitud de Patente de EE.UU. 11/776.075; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells*, Publicación de Patente de EE.UU. 2008/0241881; Foster, K.A. et al., *Fusion Proteins*, Publicación de Patente de EE.UU. 2009/0035822; Foster, K.A. et al., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, Publicación de Patente de EE.UU. 2009/0162341; Steward, L.E. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, Publicación de Patente de EE.UU. 2008/0032931; Foster, K.A. et al., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, Publicación de Patente de EE.UU. 2008/0187960; Steward, L.E. et al., *Degradable Clostridial Toxins*, Publicación de Patente de EE.UU. 2008/0213830; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells*, Publicación de Patente de EE.UU. 2008/0241881; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, Patente de EE.UU. 7.419.676; y una solicitud de patente compañera de Ghanshani, et al., *Modified Clostridial Toxins Comprising an Integrated Protease Cleavage Site-Binding Domain*, Attorney Docket Núm. 18468 PROV (BOT).

Otros aspectos de la presente memoria proporcionan una célula que comprende una construcción de expresión dual que incluye un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena y un marco de lectura abierta que codifica una proteasa que puede escindir proteolíticamente el sitio de escisión de proteasa exógena situado en la región de bucle dicadena. En aspectos adicionales, la proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena puede ser, por ejemplo, una toxina clostridial que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, una toxina clostridial modificada que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, o una proteína de cadena sencilla que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión que no es de toxina clostridial, y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena como se describe en la presente memoria.

Aún otros aspectos de la presente memoria proporcionan un método intracelular para convertir una proteína de cadena sencilla en su forma dicadena, comprendiendo el método las etapas de a) hacer crecer una célula que comprende una construcción de expresión dual a una primera temperatura durante un cierto periodo de tiempo para alcanzar la máxima densidad celular, comprendiendo la construcción de expresión dual; i) un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; y ii) un marco de lectura abierta que codifica una proteasa; en donde la proteasa puede escindir el sitio de escisión de proteasa exógena situado en el bucle dicadena; b) hacer crecer la célula a una segunda temperatura durante un cierto periodo de tiempo para alcanzar la máxima inducción de expresión de proteína a partir del marco de lectura abierta que codifica la proteína de cadena sencilla, en donde el crecimiento en la etapa (b) induce la expresión de la proteína de cadena sencilla y la proteasa a partir de la construcción de expresión dual; y en donde la proteasa producida escinde la proteína de cadena sencilla en el sitio de escisión de proteasa exógena situada en la región de bucle dicadena, convirtiendo así la proteína de cadena sencilla en su forma dicadena.

Aún otros aspectos de la presente memoria proporcionan un método intracelular para convertir una toxina clostridial de cadena sencilla en su forma dicadena, comprendiendo el método las etapas de: a) hacer crecer una célula que comprende una construcción de expresión dual a 37°C durante aproximadamente 2 a aproximadamente 3,5 horas, comprendiendo la construcción de expresión dual; i) un marco de lectura abierta que codifica una toxina clostridial de cadena sencilla, comprendiendo la toxina clostridial de cadena sencilla un dominio enzimático, un dominio de translocación, un dominio de unión, y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; y ii) un marco de lectura abierta que codifica una proteasa; en donde la proteasa puede escindir el sitio de escisión de proteasa exógena situado en el bucle dicadena; b) hacer crecer al célula a 22°C durante aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas, en donde el crecimiento en la etapa (b) induce la expresión de la toxina clostridial de cadena sencilla y la proteasa a partir de la construcción de expresión dual; y en donde la proteasa producida escinde la toxina clostridial de cadena sencilla en el sitio de escisión de proteasa exógena situado en la región de bucle dicadena, convirtiendo así la toxina clostridial de cadena sencilla en su forma dicadena.

Aspectos adicionales de la presente memoria proporcionan un método intracelular para convertir una proteína de cadena sencilla en su forma dicadena, comprendiendo el método las etapas de a) hacer crecer una célula que comprende una construcción de expresión dual a 37°C durante aproximadamente 2 a aproximadamente 8 horas, comprendiendo la construcción de expresión dual; i) un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla, comprendiendo la proteína de cadena sencilla un dominio enzimático, un dominio de translocación y un dominio de unión opioide al sitio de escisión de proteasa TEV integrado; y ii) un marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV; b) hacer crecer la célula a aproximadamente 12 a aproximadamente 16°C durante aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas, en donde el crecimiento en la etapa (b) induce la expresión de la proteína de cadena sencilla y la proteasa TEV a partir de la construcción de expresión dual; y en donde la proteasa TEV producida escinde la proteína de cadena sencilla en el sitio de escisión de proteasa TEV situado en el dominio de unión opioide al sitio de escisión TEV integrado, convirtiendo así la proteína de cadena sencilla en su forma dicadena.

Aspectos adicionales de la presente memoria proporcionan un método intracelular para convertir una proteína de cadena sencilla en su forma dicadena, comprendiendo el método las etapas de a) hacer crecer una célula que comprende una construcción de expresión dual a 37°C durante aproximadamente 2 a aproximadamente 8 horas, comprendiendo la construcción de expresión dual; i) un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla, comprendiendo la proteína de cadena sencilla un dominio enzimático, un dominio de translocación, y un dominio de unión opioide al sitio de escisión de proteasa TEV integrado; y ii) un marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV; b) hacer crecer la célula a aproximadamente 20 a aproximadamente 24°C durante aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas, en donde el crecimiento en la etapa (b) induce la expresión de la proteína de cadena sencilla y la proteasa TEV a partir de la construcción de expresión dual; y en donde la proteasa TEV producida escinde la proteína de cadena sencilla en el sitio de escisión de proteasa TEV situada en el dominio de unión opioide al sitio de escisión TEV integrado, convirtiendo así la proteína de cadena sencilla en su forma dicadena.

Aspectos aún adicionales de la presente memoria proporcionan un método intracelular para convertir una proteína de cadena sencilla en su forma dicadena, comprendiendo el método las etapas de a) hacer crecer una célula que

comprende una construcción de expresión dual a 37°C durante aproximadamente 2 a aproximadamente 8 horas, comprendiendo la construcción de expresión dual; i) un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla, comprendiendo la proteína de cadena sencilla un dominio enzimático, un dominio de translocación, un dominio de unión que no es de toxina clostridial y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV; y ii) un marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV; b) hacer crecer la célula a aproximadamente 12 a aproximadamente 16°C durante aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas, en donde el crecimiento en la etapa (b) induce la expresión de la proteína de cadena sencilla y la proteasa TEV a partir de la construcción de expresión dual; y en donde la proteasa TEV producida escinde la proteína de cadena sencilla en el sitio de escisión de proteasa TEV situada en la región de bucle dicadena, convirtiendo así la proteína de cadena sencilla en su forma dicadena.

Aspectos aún adicionales de la presente memoria proporcionan un método intracelular para convertir una proteína de cadena sencilla en su forma dicadena, comprendiendo el método las etapas de a) hacer crecer una célula que comprende una construcción de expresión dual a 37°C durante aproximadamente 2 a aproximadamente 8 horas, comprendiendo la construcción de expresión dual; i) un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla, comprendiendo la proteína de cadena sencilla un dominio enzimático, un dominio de translocación, un dominio de unión que no es de toxina clostridial y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV; y ii) un marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV; b) hacer crecer la célula a aproximadamente 20 a aproximadamente 24°C durante aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas, en donde el crecimiento en la etapa (b) induce la expresión de la proteína de cadena sencilla y la proteasa TEV a partir de la construcción de expresión dual; y en donde la proteasa TEV producida escinde la proteína de cadena sencilla en el sitio de escisión de proteasa TEV situada en la región de bucle dicadena, convirtiendo así la proteína de cadena sencilla en su forma dicadena.

Otros aspectos de la presente memoria proporcionan, una construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. En aspectos adicionales, la proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena puede ser, por ejemplo, una toxina clostridial que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, una toxina clostridial modificada que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, o una proteína de cadena sencilla que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión que no es de toxina clostridial y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena como se describe en la presente memoria.

Otros aspectos de la presente memoria proporcionan, una construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierta que codifica una proteasa que puede escindir proteolíticamente el sitio de escisión de proteasa exógena situado en la región de bucle dicadena de una proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.

Otros aspectos de la presente memoria proporcionan una célula que comprende una construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena y otra construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierta que codifica una proteasa que puede escindir proteolíticamente el sitio de escisión de proteasa exógena situado en la región de bucle dicadena de una proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. En aspectos adicionales, la proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena puede ser, por ejemplo, una toxina clostridial que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, una toxina clostridial modificada que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena o una proteína de cadena sencilla que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión que no es de toxina clostridial y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena como se describe en la presente memoria.

Aún otros aspectos de la presente memoria proporcionan un método intracelular para convertir una proteína de cadena sencilla en su forma dicadena, comprendiendo el método las etapas de a) hacer crecer una célula que comprende i) una construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena y ii) otra construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierta que codifica una proteasa que puede escindir proteolíticamente el sitio de escisión de proteasa exógena situado en la región de bucle dicadena de una proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; b) hacer crecer la célula a una segunda temperatura durante un cierto periodo de tiempo para alcanzar la máxima inducción de expresión de proteína a partir del marco de lectura abierta que codifica la proteína de cadena sencilla, en donde el crecimiento en la etapa (b) induce la expresión de la proteína de cadena sencilla y la proteasa a partir de las construcciones de expresión; y en donde la proteasa producida escinde la proteína de cadena sencilla en el sitio de escisión de proteasa exógena situado en la región de bucle dicadena, convirtiendo así la proteína de cadena sencilla en su forma dicadena.

Aún otros aspectos de la presente memoria proporcionan un método intracelular para convertir una toxina clostridial de cadena sencilla en su forma dicadena, comprendiendo el método las etapas de: a) hacer crecer a 37°C durante aproximadamente 2 a aproximadamente 3,5 horas una célula, comprendiendo la célula i) una construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierta que codifica una toxina clostridial de cadena sencilla que comprende un dominio enzimático, un dominio de translocación, un dominio de unión y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena y ii) otra construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierta que codifica una proteasa que puede escindir proteolíticamente el sitio de escisión de proteasa exógena situado en la región de bucle dicadena de una proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; b) hacer crecer la célula a 22°C durante aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas, en donde el crecimiento en la etapa (b) induce la expresión de una toxina clostridial de cadena sencilla y la proteasa a partir de las construcciones de expresión; y en donde la proteasa producida escinde la toxina clostridial de cadena sencilla en el sitio de escisión de proteasa exógena situado en la región de bucle dicadena, convirtiendo así la toxina clostridial de cadena sencilla en su forma dicadena.

Aspectos adicionales de la presente memoria proporcionan un método intracelular para convertir una proteína de cadena sencilla en su forma dicadena, comprendiendo el método las etapas de a) hacer crecer a 37°C durante aproximadamente 2 a aproximadamente 8 horas una célula, comprendiendo la célula i) una construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla que comprende un dominio enzimático, un dominio de translocación y un dominio de unión opioide al sitio de escisión de proteasa TEV integrado y ii) otra construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierta que codifica la proteasa TEV; b) hacer crecer la célula a aproximadamente 12 a aproximadamente 16°C durante aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas, en donde el crecimiento en la etapa (b) induce la expresión de la proteína de cadena sencilla y la proteasa TEV a partir de las construcciones de expresión; y en donde la proteasa TEV producida escinde la proteína de cadena sencilla en el sitio de escisión de proteasa TEV situada en el dominio de unión opioide al sitio de escisión TEV integrado, convirtiendo así la proteína de cadena sencilla en su forma dicadena.

Aspectos adicionales de la presente memoria proporcionan un método intracelular para convertir una proteína de cadena sencilla en su forma dicadena, comprendiendo el método las etapas de a) hacer crecer a 37°C durante aproximadamente 2 a aproximadamente 8 horas una célula, comprendiendo la célula i) una construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla que comprende un dominio enzimático, un dominio de translocación y un dominio de unión opioide al sitio de escisión de proteasa TEV integrado y ii) otra construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierta que codifica la proteasa TEV; b) hacer crecer la célula a aproximadamente 20 a aproximadamente 24°C durante aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas, en donde el crecimiento en la etapa (b) induce la expresión de la proteína de cadena sencilla y la proteasa TEV a partir de las construcciones de expresión; y en donde la proteasa TEV producida escinde la proteína de cadena sencilla en el sitio de escisión de proteasa TEV situada en el dominio de unión opioide al sitio de escisión TEV integrado, convirtiendo así la proteína de cadena sencilla en su forma dicadena.

Aspectos aún adicionales de la presente memoria proporcionan un método intracelular para convertir una proteína de cadena sencilla en su forma dicadena, comprendiendo el método las etapas de a) hacer crecer a 37°C durante aproximadamente 2 a aproximadamente 8 horas una célula, comprendiendo la célula i) una construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla que comprende un dominio enzimático, un dominio de translocación y un dominio de unión que no es de toxina clostridial y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV y ii) otra construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierta que codifica la proteasa TEV; b) hacer crecer la célula a aproximadamente 12 a aproximadamente 16°C durante aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas, en donde el crecimiento en la etapa (b) induce la expresión de la proteína de cadena sencilla y la proteasa TEV a partir de las construcciones de expresión; y en donde la proteasa TEV producida escinde la proteína de cadena sencilla en el sitio de escisión de proteasa TEV situada en el dominio de unión opioide al sitio de escisión TEV integrado, convirtiendo así la proteína de cadena sencilla en su forma dicadena.

Aspectos aún adicionales de la presente memoria proporcionan un método intracelular para convertir una proteína de cadena sencilla en su forma dicadena, comprendiendo el método las etapas de a) hacer crecer a 37°C durante aproximadamente 2 a aproximadamente 8 horas una célula, comprendiendo la célula i) una construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla que comprende un dominio enzimático, un dominio de translocación y un dominio de unión que no es de toxina clostridial y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV y ii) otra construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierta que codifica la proteasa TEV; b) hacer crecer la célula a aproximadamente 20 a aproximadamente 24°C durante aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas, en donde el crecimiento en la etapa (b) induce la expresión de la proteína de cadena sencilla y la proteasa TEV a partir de las construcciones de expresión; y en donde la proteasa TEV producida escinde la proteína de cadena sencilla en el sitio de escisión de proteasa TEV situado en el dominio de unión opioide al sitio de escisión TEV integrado, convirtiendo así la proteína de cadena sencilla en su forma dicadena.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra la organización del dominio de toxinas clostridiales que se dan de forma natural. La forma de cadena sencilla representa la organización lineal de amino a carboxilo que comprende un dominio enzimático, un dominio de translocación y un dominio de unión H_C. La región del bucle dicadena situado entre los dominios de translocación y enzimático se representa por un corchete SS doble. Esta región comprende un sitio de escisión de proteasa de bucle dicadena endógeno que por escisión proteolítica con una proteasa que se da de forma natural, tal como, por ejemplo, una proteasa de toxina clostridial endógena o una proteasa que se da de forma natural producida en el medio, convierte la forma de cadena sencilla de la toxina en la forma dicadena.

La FIG. 2 muestra un esquema del paradigma habitual de liberación de neurotransmisor e intoxicación de toxina clostridial en una neurona central y periférica. La FIG. 2A muestra un esquema para el mecanismo de liberación de neurotransmisor de una neurona central y periférica. El proceso de liberación puede describirse como que comprende dos etapas: 1) acoplamiento a la vesícula, donde la proteína SNARE unida a la vesícula de una vesícula que contiene moléculas neurotransmisoras se asocia con las proteínas SNARE unidas a la membrana situadas en la membrana plasmática; y 2) liberación del neurotransmisor, donde la vesícula se funde con la membrana plasmática y las moléculas neurotransmisoras se exocitan. La FIG. 2B muestra un esquema de un mecanismo de intoxicación para la actividad de tétanos y toxina botulínica en una neurona central y periférica. El proceso de intoxicación puede describirse como que comprende cuatro etapas: 1) unión al receptor, donde una toxina clostridial se une a un sistema receptor clostridial e inicia el proceso de intoxicación; 2) internalización del complejo, donde después de la unión de la toxina, una vesícula que contiene el complejo toxina/sistema receptor se endocita en la célula; 3) translocación de cadena ligera, donde se cree que ocurren múltiples sucesos, incluyendo, por ejemplo, cambios en el pH interno de la vesícula, formación de un poro de canal que comprende el dominio H_N de la cadena pesada de la toxina clostridial, separación de la cadena ligera de la toxina clostridial de la cadena pesada y liberación de la cadena ligera activa y 4) modificación de la diana enzimática, donde la cadena ligera activa de toxina clostridial escinde proteolíticamente su sustrato SNARE diana, tal como, por ejemplo, SNAP-25, VAMP o Sintaxina, evitando así el acoplamiento de la vesícula y la liberación del neurotransmisor.

Las toxinas clostridia producidas por *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium baratii* y *Clostridium butyricum* son las usadas más ampliamente en tratamientos terapéuticos y cosméticos de seres humanos y otros mamíferos. Las cepas de *C. botulinum* producen siete tipos distintos antigénicamente de toxinas botulínicas (BoNTs), que se han identificado investigando los brotes de botulismo en el hombre (BoNT/A, /B, /E y /F), animales (BoNT/C1 y /D), o aisladas del suelo (BoNT/G). Los BoNT poseen aproximadamente el 35% de identidad de aminoácidos con cada una de las demás y comparten la misma organización del dominio funcional y toda la arquitectura estructural. Se reconoce por los expertos en la técnica que en cada tipo de toxina clostridial puede haber subtipos que difieren algo en su secuencia de aminoácidos, y además en los ácidos nucleicos que codifican estas proteínas. Por ejemplo, hay actualmente cuatro subtipos de BoNT/A, BoNT/A1, BoNT/A2, BoNT/A3 y BoNT/A4, con subtipos específicos que muestran aproximadamente el 89% de identidad de aminoácidos cuando se comparan con otro subtipo de BoNT/A. Mientras que todos los siete serotipos de BoNT tienen estructura y propiedades farmacológicas similares, cada uno presenta también características bacteriológicas heterogéneas. En contraste, la toxina del tétanos (TeNT) se produce mediante un grupo uniforme de *C. tetani*. Otras dos especies Clostridia, *C. baratii* y *C. butyricum*, producen toxinas, BaNT y BuNT, que son similares a BoNT/F y BoNT/E, respectivamente.

Cada molécula dicadena madura comprende tres dominios funcionalmente distintos: 1) un dominio enzimático situado en la CL que incluye una región metaloproteasa que contiene una actividad endopeptidasa dependiente de zinc que se dirige específicamente a componentes del núcleo del aparato de liberación del neurotransmisor; 2) un dominio de translocación (H_N) contenido en la mitad amino-terminal de la CP que facilita la liberación de la CL desde vesículas intracelulares en el citoplasma de la célula diana; y 3) un dominio de unión (H_C) encontrado en la mitad carboxilo-terminal de la CP que determina la actividad de unión y la especificidad de unión de la toxina en el complejo receptor situado en la superficie de la célula diana. El dominio H_C comprende dos características estructurales distintas de aproximadamente igual tamaño que indican la función y se designan los subdominios H_{CN} y H_{CC}. La Tabla 1 da regiones limítrofes aproximadas para cada dominio encontrado en toxinas clostridiales ejemplares.

Tabla 1. Secuencias y regiones de referencia de la toxina clostridial.

| Toxina | SEQ ID NO: | CL | H _N | H _C |
|---------|------------|---------|----------------|----------------|
| BoNT/A | 1 | M1-K448 | A449-K871 | N872-L1296 |
| BoNT/B | 2 | M1-K441 | A442-S858 | E859-E1291 |
| BoNT/C1 | 3 | M1-K449 | T450-N866 | N867-E1291 |
| BoNT/D | 4 | M1-R445 | D446-N862 | S863-E1276 |

| | | | | |
|--------|----|---------|-----------|------------|
| BoNT/E | 5 | M1-R422 | K423-K845 | R846-K1252 |
| BoNT/F | 6 | M1-K439 | A440-K864 | K865-E1274 |
| BoNT/G | 7 | M1-K446 | S447-S863 | N864-E1297 |
| TeNT | 8 | M1-A457 | S458-V879 | I880-D1315 |
| BaNT | 9 | M1-K431 | N432-I857 | I858-E1268 |
| BuNT | 10 | M1-R422 | K423-I847 | K848-K1251 |

La unión, translocación y actividad enzimática de estos tres dominios funcionales son todos necesarios para la toxicidad. Mientras todos los detalles de este proceso no se conocen aún de forma precisa, el mecanismo de intoxicación celular total por el cual las toxinas clostridiales entran en una neurona e inhiben la liberación del neurotransmisor es similar, independientemente del serotipo o subtipo. Aunque los solicitantes no tienen el deseo de estar limitados por la siguiente descripción, el mecanismo de intoxicación puede describirse como que comprende al menos cuatro etapas: 1) unión al receptor, 2) internalización del complejo, 3) translocación de la cadena ligera y 4) modificación de la diana enzimática (FIG. 3). El proceso se inicia cuando el dominio H_C de una toxina clostridial se une a un sistema receptor específico de la toxina situado en la superficie de la membrana plasmática de una célula diana. La especificidad de la unión de un complejo receptor se cree que se alcanza, en parte, por combinaciones específicas de gangliósidos y receptores de proteína que parecen comprender distintamente cada complejo receptor de toxina clostridial. Una vez unidos, los complejos toxina/receptor se internalizan por endocitosis y las vesículas internalizadas se clasifican por rutas intracelulares específicas. La etapa de translocación parece desencadenarse por la acidificación del compartimiento de la vesícula. Este proceso parece iniciar dos redistribuciones estructurales dependientes del pH importantes que aumentan la hidrofobicidad y promueven la formación de la forma dicadena de la toxina. Una vez activada, la endopeptidasa de la cadena ligera de la toxina se libera desde la vesícula intracelular en el citosol donde parece dirigirse específicamente a uno de tres componentes del núcleo conocidos del aparato de liberación del neurotransmisor. Estas proteínas del núcleo, proteína de membrana asociada a la vesícula (VAMP)/sinaptobrevina, proteína asociada sinaptosomal de 25 kDa (SNAP-25) y Sintaxina, son necesarias para el acoplamiento sináptico de la vesícula y la fusión al extremo del nervio y constituyen miembros de la familia del receptor de proteína de unión al factor sensible a la N-etilmaleimida soluble (SNARE). BoNT/A y BoNT/E escinden SNAP-25 en la región carboxilo terminal, liberando un segmento de nueve o veintiséis aminoácidos, respectivamente, y BoNT/C1 también escinde SNAP-25 cerca del extremo carboxilo. Los serotipos botulínicos BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F y BoNT/G, y la toxina del tétanos, actúan en la parte central conservada de VAMP, y liberan la parte amino terminal de VAMP en el citosol. BoNT/C1 escinde sintaxina en un único sitio cerca de la superficie de la membrana citosólica. La proteólisis selectiva de SNARE sináptica cuenta para el bloque de liberación del neurotransmisor provocada por las toxinas clostridiales *in vivo*. Las dianas de la proteína SNARE de las toxinas clostridiales son comunes a la exocitosis en una variedad de tipos no neuronales; en estas células, como en neuronas, la actividad peptidasa de cadena ligera inhibe la exocitosis, véase, por ejemplo, Yann Humeau et al., *How Botulinum and Tetanus Neurotoxins Block Neurotransmitter Release*, 82(5) *Biochimie*. 427-446 (2000); Kathryn Turton et al., *Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Structure, Function and Therapeutic Utility*, 27(11) *Trends Biochem. Sci.* 552-558. (2002); Giovanna Lalli et al., *The Journey of Tetanus and Botulinum Neurotoxins in Neurons*, 11(9) *Trends Microbiol.* 431-437, (2003).

En un aspecto de la memoria, una toxina clostridial modificada comprende, en parte, una toxina clostridial modificada de cadena sencilla y una toxina clostridial modificada dicadena. Como se trata anteriormente, una toxina clostridial, si se da de forma natural o se da de forma no natural, se sintetizan inicialmente como un polipéptido de cadena sencilla. Esta forma de cadena sencilla se escinde posteriormente en un sitio de escisión de proteasa situado en una región discreta de un bucle dicadena creado entre dos residuos de cisteína que forman un puente disulfuro por una proteasa. Este procesamiento post-traducciona da una molécula dicadena que comprende una cadena ligera (CL) y una cadena pesada. Como se usa en esta memoria, el término "región de bucle dicadena" se refiere a la región de bucle de una toxina clostridial que se da de forma natural o que no se da de forma natural formada por un puente disulfuro situado entre el dominio CL y el dominio CP. Como se usa en esta memoria, el término "toxina clostridial modificada de cadena sencilla" se refiere a cualquier toxina clostridial modificada descrita en la presente memoria que está en su forma de cadena sencilla, es decir, la toxina no se ha escindido en el sitio de escisión de proteasa situado en la región de bucle dicadena por su proteasa parecida. Como se usa en esta memoria, el término "toxina clostridial modificada dicadena" se refiere a cualquier toxina clostridial modificada descrita en la presente memoria que está en su forma dicadena, es decir, la toxina se ha escindido en el sitio de escisión de proteasa situado en la región de bucle dicadena por su proteasa parecida.

Aspectos de la presente memoria proporcionan, en parte, moléculas de polinucleótido. Como se usa en esta memoria, el término "molécula de polinucleótido" es sinónimo de "molécula de ácido nucleico" y significa una forma polimérica de nucleótidos, tal como, por ejemplo, ribonucleótidos y desoxiribonucleótidos, de cualquier longitud. Moléculas de polinucleótido útiles, incluyen, sin limitación, moléculas de ADN que se dan de forma natural y que no

se dan de forma natural y moléculas de ARN que se dan de forma natural y que no se dan de forma natural. Ejemplos no limitantes de moléculas de ADN que se dan de forma natural y que no se dan de forma natural incluyen moléculas de ADN de una sola hebra, moléculas de ADN de doble hebra, moléculas de ADN genómico, moléculas de ADNc, construcciones de vector, tales como, por ejemplo, construcciones de plásmido, construcciones de fagómico, construcciones de bacteriófago, construcciones retrovirales y construcciones de cromosoma artificial. Ejemplos no limitantes de moléculas de ARN que se dan de forma natural y que no se dan de forma natural incluyen ARN de una sola hebra, ARN de doble hebra y ARNm.

Técnicas de biología molecular bien establecidas que pueden ser necesarias para hacer una molécula de polinucleótido que codifica una toxina clostridial modificada descrita en la presente memoria incluyen, aunque no están limitadas a, procedimientos que implican amplificación de la reacción de cadena polimerasa (PCR), reacciones de enzima de restricción, electroforesis en gel de agarosa, ligación de ácido nucleico, transformación bacteriana, purificación de ácido nucleico, técnicas basadas en secuenciación y recombinación de ácido nucleico son rutinarias y bien conocidas en el alcance de un experto en la técnica y a partir de las enseñanzas en esta memoria. Ejemplos no limitantes de protocolos específicos necesarios para hacer una molécula de polinucleótido que codifica una toxina clostridial modificada se describen en, por ejemplo, *MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL*, *supra*, (2001); y *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (Frederick M. Ausubel et al., eds. John Wiley & Sons, 2004). Adicionalmente, una variedad de productos disponibles comercialmente útiles para hacer una molécula de polinucleótido que codifica una toxina clostridial modificada están ampliamente disponibles. Estos protocolos son procedimientos rutinarios bien en el alcance de un experto en la técnica y a partir de la enseñanza en esta memoria.

Los métodos descritos en la presente memoria incluyen, en parte, un marco de lectura abierto. Como se usa en esta memoria, el término "marco de lectura abierto" es sinónimo con "MLA" y significa cualquier molécula de polinucleótido que codifica una proteína, o una parte de una proteína. Un marco de lectura abierta normalmente comienza con un codón de inicio (representado como, por ejemplo, AUG para una molécula de ARN y ATG en una molécula de ADN en el código estándar) y se lee en codón-tripletes hasta que el marco finaliza con un codón STOP (representado como, por ejemplo, UAA, UGA o UAG para una molécula de ARN y TAA, TGA o TAG en una molécula de ADN en el código estándar). Como se usa en esta memoria, el término "codón" significa una secuencia de tres nucleótidos en una molécula de polinucleótido que especifica un aminoácido particular durante la síntesis de proteínas; también se denomina un triplete o codón-triplete.

Los métodos descritos en la presente memoria incluyen, en parte, una construcción de expresión. Una construcción de expresión comprende una molécula de polinucleótido que incluye un marco de lectura abierta descrito en la presente memoria unido de forma operable a un vector de expresión útil para expresar la molécula de polinucleótido en una célula o extracto libre de célula. Una amplia variedad de vectores de expresión pueden emplearse para expresar una molécula de polinucleótido descrita en la presente memoria, incluyendo, sin limitación, un vector de expresión viral; un vector de expresión procariótico; vectores de expresión eucarióticos, tales como, por ejemplo, un vector de expresión de levadura, un vector de expresión de insecto y un vector de expresión de mamífero; y un vector de expresión libre de células (*in vitro*). Se entiende además que los vectores de expresión útiles para practicar aspectos de estos métodos pueden incluir aquellos que expresan la molécula de polinucleótido bajo el control de un elemento promotor constitutivo, específico del tejido, específico de la célula o inducible, elemento mejorador o ambos. Ejemplos no limitantes de vectores de expresión, junto con reactivos y condiciones bien establecidos para hacer y usar una construcción de expresión a partir de dichos vectores de expresión están fácilmente disponibles a partir de vendedores comerciales que incluyen, sin limitación, BD Biosciences-Clontech, Palo Alto, CA; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA; Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA; EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI; QIAGEN, Inc., Valencia, CA; y Stratagene, La Jolla, CA. La selección, fabricación y uso de un vector de expresión apropiado son procedimientos rutinarios bien en el alcance de un experto en la técnica y a partir de las enseñanzas en esta memoria.

Las construcciones de expresión descritas en la presente memoria pueden comprender un marco de lectura abierta que codifica una proteína que incluye una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, en donde la escisión del sitio de escisión de proteasa exógena convierte la proteína de cadena sencilla en su forma dicadena. En aspectos de esta realización, un vector de expresión viral está unido de forma operable a una molécula de polinucleótido que codifica una proteína que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena situado en el bucle dicadena; un vector de expresión procariótico está unido de forma operable a una molécula de polinucleótido que codifica una proteína que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena situado en el bucle dicadena; un vector de expresión de levadura está unido de forma operable a una molécula de polinucleótido que codifica una proteína que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena situado en el bucle dicadena; un vector de expresión de insecto está unido de forma operable a una molécula de polinucleótido que codifica una proteína que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena situado en el bucle dicadena; y un vector de expresión de mamífero está unido de forma operable a una molécula de polinucleótido que codifica una proteína que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena situado en el bucle dicadena. En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión - adecuada para expresar una molécula de polinucleótido descrita en la presente memoria puede expresarse usando un extracto libre de células. En un aspecto de esta realización, un vector de expresión libre de células está unido de forma operable a una molécula de polinucleótido que codifica una proteína que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena situado en el bucle dicadena.

En una realización, una construcción de expresión descrita en la presente memoria puede comprender un marco de lectura abierta que codifica una toxina clostridial que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. En aspectos de esta realización, una construcción de expresión descrita en la presente memoria puede comprender un marco de lectura abierta que codifica una toxina clostridial que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión de toxina clostridial, y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. En aspectos de esta realización, la toxina clostridial de cadena sencilla comprende un orden amino a carboxilo lineal de 1) el dominio enzimático clostridial, la región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, el dominio de translocación clostridial y el dominio de unión clostridial; 2) el dominio enzimático clostridial, la región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, el dominio de unión clostridial y el dominio de translocación clostridial; 3) el dominio de unión clostridial, el dominio de translocación de toxina clostridial, la región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena y el dominio enzimático de toxina clostridial; 4) el dominio de unión clostridial, el dominio enzimático de toxina clostridial, la región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena y el dominio de translocación de toxina clostridial; 5) el dominio de translocación de toxina clostridial, la región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, el dominio enzimático de toxina clostridial y el dominio de unión clostridial; o 6) el dominio de translocación de toxina clostridial, la región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, el dominio de unión clostridial y el dominio enzimático de toxina clostridial.

En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica 1) un dominio enzimático de toxina BoNT/A, un dominio de translocación de BoNT/A, un dominio de unión de BoNT/A y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 2) un dominio enzimático de BoNT/B, un dominio de translocación de BoNT/B, un dominio de unión de BoNT/B y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 3) un dominio enzimático de BoNT/C1, un dominio de translocación de BoNT/C1, un dominio de unión de BoNT/C1 y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 4) un dominio enzimático de BoNT/D, un dominio de translocación de BoNT/D, un dominio de unión de BoNT/D y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 5) un dominio enzimático de BoNT/E, un dominio de translocación de BoNT/E, un dominio de unión de BoNT/E y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 6) un dominio enzimático de BoNT/F, un dominio de translocación de BoNT/F, un dominio de unión de BoNT/F y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 7) un dominio enzimático de BoNT/G, un dominio de translocación de BoNT/G, un dominio de unión de BoNT/G y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 8) un dominio enzimático de TeNT, un dominio de translocación de TeNT, un dominio de unión de TeNT y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 9) un dominio enzimático de BaNT, un dominio de translocación de BaNT, un dominio de unión de BaNT y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 10) un dominio enzimático de BuNT, un dominio de translocación de BuNT, un dominio de unión de BuNT y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.

En otros aspectos adicionales de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica 1) un dominio enzimático de toxina BoNT/A, un dominio de translocación de BoNT/A, un dominio de unión de BoNT/A y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV; 2) un dominio enzimático de BoNT/B, un dominio de translocación de BoNT/B, un dominio de unión de BoNT/B y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV; 3) un dominio enzimático de BoNT/C1, un dominio de translocación de BoNT/C1, un dominio de unión de BoNT/C1 y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV; 4) un dominio enzimático de BoNT/D, un dominio de translocación de BoNT/D, un dominio de unión de BoNT/D y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV; 5) un dominio enzimático de BoNT/E, un dominio de translocación de BoNT/E, un dominio de unión de BoNT/E y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV; 6) un dominio enzimático de BoNT/F, un dominio de translocación de BoNT/F, un dominio de unión de BoNT/F y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV; 7) un dominio enzimático de BoNT/G, un dominio de translocación de BoNT/G, un dominio de unión de BoNT/G y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV; 8) un dominio enzimático de TeNT, un dominio de translocación de TeNT, un dominio de unión de TeNT y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV; 9) un dominio enzimático de BaNT, un dominio de translocación de BaNT, un dominio de unión de BaNT y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV; 10) un dominio enzimático de BuNT, un dominio de translocación de BuNT, un dominio de unión de BuNT y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV.

Ejemplos de dichas toxinas clostridiales que comprenden una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena se describen en, por ejemplo, J. Oliver Dolly, et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, Patente de EE.UU. 7.132.529; J. Oliver Dolly, et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, Patente de EE.UU. 7.419.676; Lance Steward, et al., *Leucine-Based Motifs and Clostridial Neurotoxins*, Patente de EE.UU. 6.903.187; Lance Steward, et al., *Leucine-Based Motifs and Clostridial Neurotoxins*, Patente de EE.UU. 7.393.925; Wei-Jen Lin, et al., *Neurotoxins with Enhanced Target Specificity*, Patente de EE.UU. 7.273.722; Lance Steward, et al., *Modified Botulinum Neurotoxins*, Patente de EE.UU. 7.491.799; Lance E. Steward, et al., *Optimized Expression*

of Active Botulinum Toxin Type E, Publicación de Patente de EE.UU. 2008/0138893; Esther Fernández-Salas, et al., *Optimized Expression of Active Botulinum Toxin Type A*, Publicación de patente de EE.UU. 2008/0057575.

5 En otra realización, una construcción de expresión descrita en la presente memoria puede comprender un marco de lectura abierta que codifica una proteína que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión que no es de toxina clostridial y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. En aspectos de esta realización, la proteína de cadena sencilla comprende un orden amino a carboxilo lineal de 1) el dominio enzimático clostridial, la región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, el dominio de translocación clostridial y el dominio de unión que no es clostridial; 2) el dominio enzimático clostridial, la región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, el dominio de unión que no es clostridial y el dominio de translocación clostridial; 3) el dominio de unión que no es clostridial, el dominio de translocación de toxina clostridial, la región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena y el dominio enzimático de toxina clostridial; 4) el dominio de unión que no es clostridial, el dominio enzimático de toxina clostridial, la región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena y el dominio de translocación de toxina clostridial; 5) el dominio de translocación de toxina clostridial, la región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, el dominio enzimático de toxina clostridial y el dominio de unión que no es clostridial; o 6) el dominio de translocación de toxina clostridial, la región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, el dominio de unión que no es clostridial y el dominio enzimático de toxina clostridial.

20 En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión opioide y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. En aspectos adicionales de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica 1) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión de encefalina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 2) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión de péptido adrenomedular bovino 22 (BAM22) y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 3) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión de endomorfina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 4) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión de endorfina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 5) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión de dinorfina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 6) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión de nociceptina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 7) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión de hemorfina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; u 8) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión de rimorfina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.

40 En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión de péptido melanocortina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. En aspectos adicionales de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica 1) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a hormona estimulante de melanocito y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 2) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a adrenocorticotropina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; o 3) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a lipotropina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.

50 En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a péptido galanina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. En aspectos adicionales de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica 1) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a galanina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; o 2) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a péptido asociado al mensaje de galanina (GMAP) y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.

60 En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a péptido granina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. En aspectos adicionales de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta

- En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a péptido activina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.
- 5 En aspectos adicionales de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica 1) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a activina A y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 2) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a activina B y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 3) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a activina C y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 4) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a activina E y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; o 5) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a inhibina A y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.
- 10
- 15 En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a péptido de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.
- 20 En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a péptido de factor de crecimiento de insulina (IGF) y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. En aspectos adicionales de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica 1) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a IGF-1 y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; o 2) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a IGF-2 y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.
- 25
- 30 En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a péptido de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.
- 35 En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a péptido de hormona tipo glucagón y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. En aspectos adicionales de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica 1) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a secretina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; o 2) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a péptido tipo glucagón y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.
- 40
- 45 En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a péptido que activa la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.
- 50 En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a péptido de hormona que libera la hormona de crecimiento (GHRH) y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.
- 55 En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a péptido intestinal vasoactivo (VIP) y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. En aspectos adicionales de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica 1) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a VIP1 y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; o 2) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial,

un dominio de unión a VIP2 y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.

5 En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a péptido de polipéptido inhibidor gástrico (GIP) y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.

10 En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a péptido de intestino de péptidos relacionados con calcitonina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. En aspectos adicionales de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica 1) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a gastrina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 2) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a péptido que libera gastrina y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; o 3) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a colescistoquinina (CCK) y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.

20 En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a péptido receptor activado de proteasa (PAR) y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. En aspectos adicionales de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica 1) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión de PAR1 y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 2) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a PAR2 y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; 3) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a PAR3 y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; o 4) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a PAR3 y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.

30 Ejemplos de dichas proteínas que comprenden una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena se describen en, por ejemplo, J. Oliver Dolly, et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, Patente de EE.UU. 7.132.529; J. Oliver Dolly, et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, Patente de EE.UU. 7.419.676; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Patente de EE.UU. 7.514.088; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, Publicación de Patente Internacional WO 2005/023309; Lance E. Steward, et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, Publicación de Patente de EE.UU. 2008/0032930; Lance E. Steward, et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, Publicación de Patente de EE.UU. 2008/0032931; Lance E. Steward, et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, Publicación de Patente de EE.UU. 2008/0161226; Lance E. Steward, et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, Publicación de Patente de EE.UU. 2008/0221012; Lance E. Steward, et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, Publicación de Patente de EE.UU. 2009/0004224; Lance E. Steward, et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, Publicación de Patente de EE.UU. 2009/0005313; Lance E. Steward, et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, Publicación de Patente de EE.UU. 2009/0018081; Lance E. Steward, et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, Publicación de Patente de EE.UU. 2009/0069238; y Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Publicación de Patente de EE.UU. 2009/0048431.

45 En otra realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica una proteína que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial y un dominio de unión al sitio de escisión de proteasa integrado. En aspectos de esta realización, la proteína de cadena sencilla comprende un orden amino a carboxilo lineal de 1) un dominio de unión al sitio de escisión de proteasa integrado, un dominio de translocación de toxina clostridial y un dominio enzimático de toxina clostridial; 2) un dominio de unión al sitio de escisión de proteasa integrado, un dominio enzimático de toxina clostridial y un dominio de translocación de toxina clostridial; 3) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de unión al sitio de escisión de proteasa integrado y un dominio de translocación de toxina clostridial; 4) un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión al sitio de escisión de proteasa integrado y un dominio enzimático de toxina clostridial; 5) un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio enzimático de toxina clostridial y un dominio de unión al sitio de escisión de proteasa integrado; y 6) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial y un dominio de unión al sitio de escisión de proteasa integrado.

60 En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión opioide al sitio de escisión de proteasa TEV integrado. En aspectos adicionales de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierta que codifica 1) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a encefalina al sitio de escisión de

proteasa TEV integrado; 2) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión adrenomedular bovina-22 (BAM22) al sitio de escisión de proteasa TEV integrado; 3) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a endomorfina al sitio de escisión de proteasa TEV integrado; 4) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a endorfina al sitio de escisión de proteasa TEV integrado; 5) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a dinorfina al sitio de escisión de proteasa TEV integrado; 6) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a nociceptina al sitio de escisión de proteasa TEV integrado; 7) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a hemorfina al sitio de escisión de proteasa TEV integrado; u 8) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a rimorfina al sitio de escisión de proteasa TEV integrado.

Ejemplos de dichas proteínas que comprenden dominio de unión al sitio de escisión de proteasa integrado se describen en, por ejemplo, una solicitud de patente compañera de Sanjiv Ghanshani, et al., Modified Clostridial Toxins Comprising an Integrated Protease Cleavage Site-Binding Domain.

Las construcciones de expresión descritas en la presente memoria pueden comprender un marco de lectura abierta que codifica una proteasa. En aspectos de esta realización, un vector de expresión viral se une de forma operable a una molécula de polinucleótido que codifica una proteasa; un vector de expresión procariótico se une de forma operable a una molécula de polinucleótido que codifica una proteasa; un vector de expresión de levadura se une de forma operable a una molécula de polinucleótido que codifica una proteasa; un vector de expresión de insecto se une de forma operable a una molécula de polinucleótido que codifica una proteasa; y un vector de expresión de mamífero se une de forma operable a una molécula de polinucleótido que codifica una proteasa. En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión que es adecuada para expresar una molécula de polinucleótido descrita en la presente memoria puede expresarse usando un extracto libre de células. En un aspecto de esta realización, un vector de expresión de extracto libre de células se une de forma operable a una molécula de polinucleótido que codifica una proteasa.

En un aspecto de esta realización, una construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierta codifica una enteroquinasa, una proteasa de rinovirus humano 3C, una proteasa de enterovirus humano 3C, una proteasa de virus del grabado del tabaco (TEV), una proteasa del virus del moteado de las venas de tabaco (TVMV), una proteasa de subtilisina, o una proteasa de caspasa 3. Ejemplos de proteasas de enteroquinasa y las moléculas de polinucleótido que las codifican se describen en, por ejemplo, Edward R. LaVallie, *Cloning of Enterokinase and Method of Use*, Patente de EE.UU. 5.665.566; Edward R. LaVallie, *Cloning of Enterokinase and Method of Use*, Patente de EE.UU. 6.746.859. Ejemplos de proteasas de subtilisina y las moléculas de polinucleótido que las codifican se describen en, por ejemplo, Donn N. Rubingh, et al., *Subtilisin Protease Variants having Amino Acid Deletions and Substitutions in Defined Epitope Regions*, Patente de EE.UU. 6.586.224.

En otro aspecto de esta realización, una enteroquinasa es SEQ ID NO: 11. En otro aspecto de esta realización, una enteroquinasa comprende aminoácidos 239-1035 de SEQ ID NO: 11. En aún otro aspecto de esta realización, una enteroquinasa es una variante de enteroquinasa que se da de forma natural, tal como, por ejemplo, una isoforma de enteroquinasa. En aún otro aspecto de esta realización, una enteroquinasa es una variante de enteroquinasa que no se da de forma natural, tal como, por ejemplo, un variante de enteroquinasa conservativa, una variante de enteroquinasa no conservativa, una enteroquinasa quimérica, un fragmento de enteroquinasa activa o cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto de esta realización, una enteroquinasa es una descrita en la Patente de EE.UU. 5.665.566 o Patente de EE.UU. 6.746.859. En otro aspecto de esta realización, una enteroquinasa, una variante de enteroquinasa que se da de forma natural, o una variante de enteroquinasa que no se da de forma natural se obtiene a partir de una especie de mamífero tal como, por ejemplo, un ser humano, una vaca o un roedor.

En otros aspectos de esta realización, una enteroquinasa comprende un polipéptido que tiene una identidad de aminoácido de, por ejemplo, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% a SEQ ID NO: 11; o como mucho 70%, como mucho 75%, como mucho 80%, como mucho 85%, como mucho 90% o como mucho 95% a SEQ ID NO: 11. En aún otros aspectos de esta realización, una enteroquinasa comprende un polipéptido que tiene, por ejemplo, supresiones, adiciones y/o sustituciones de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos no contiguos respecto a SEQ ID NO: 11; o supresiones, adiciones y/o sustituciones de como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos no contiguos respecto a SEQ ID NO: 11. En aún otros aspectos de esta realización, una enteroquinasa comprende un polipéptido que tiene, por ejemplo, supresiones, adiciones y/o sustituciones de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos respecto a SEQ ID NO: 11; o supresiones, adiciones y/o sustituciones de como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos respecto a SEQ ID NO: 11.

En otro aspecto de esta realización, una proteasa de rinovirus humano 3C es SEQ ID NO: 12. En aún otro aspecto de esta realización, una proteasa de rinovirus humano 3C es una variante de proteasa de rinovirus humano 3C que se da de forma natural, tal como, por ejemplo, una isoforma de proteasa de rinovirus humano 3C. En aún otro aspecto de esta realización, una proteasa de rinovirus humano 3C es una variante de proteasa de rinovirus humano 3C que no se da de forma natural, tal como, por ejemplo, una variante de proteasa de rinovirus humano 3C

conservativo, una variante de proteasa de rinovirus humano 3C no conservativo, una proteasa de rinovirus humano 3C quimérica, un fragmento de proteasa de rinovirus humano 3C activo o cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto de esta realización, una proteasa de rinovirus humano 3C, una variante de proteasa de rinovirus humano 3C que se da de forma natural, o una variante de proteasa de rinovirus humano 3C que no se da de forma natural se obtiene de una especie de rinovirus.

En otros aspectos de esta realización, una proteasa de rinovirus humano 3C comprende un polipéptido que tiene una identidad de aminoácido de, por ejemplo, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% a SEQ ID NO: 12; o como mucho 70%, como mucho 75%, como mucho 80%, como mucho 85%, como mucho 90% o como mucho 95% a SEQ ID NO: 12. En aún otros aspectos de esta realización, una proteasa de rinovirus humano 3C comprende un polipéptido que tiene, por ejemplo, supresiones, adiciones y/o sustituciones de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos no contiguos respecto a SEQ ID NO: 12; o supresiones, adiciones y/o sustituciones de como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos no contiguos respecto a SEQ ID NO: 12. En aún otros aspectos de esta realización, una proteasa de rinovirus humano 3C comprende un polipéptido que tiene, por ejemplo, supresiones, adiciones y/o sustituciones de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos respecto a SEQ ID NO: 12; o supresiones, adiciones y/o sustituciones de como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos respecto a SEQ ID NO: 12.

En otro aspecto de esta realización, una proteasa de enterovirus humano 3C es SEQ ID NO: 13. En aún otro aspecto de esta realización, una proteasa de enterovirus humano 3C es una variante de proteasa de enterovirus humano 3C que se da de forma natural, tal como, por ejemplo, una isoforma de proteasa de enterovirus humano 3C. En aún otro aspecto de esta realización, una proteasa de enterovirus humano 3C es una variante de proteasa de enterovirus humano 3C que no se da de forma natural, tal como, por ejemplo, una variante de proteasa de enterovirus humano 3C conservativo, una variante de proteasa de enterovirus humano 3C no conservativo, una proteasa de enterovirus humano 3C quimérica, un fragmento de proteasa de enterovirus humano 3C activo o cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto de esta realización, una proteasa de enterovirus humano 3C, una variante de proteasa de enterovirus humano 3C que se da de forma natural, o una variante de proteasa de enterovirus humano 3C que no se da de forma natural, se obtiene de una especie de enterovirus.

En otros aspectos de esta realización, una proteasa de enterovirus humano 3C comprende un polipéptido que tiene una identidad de aminoácido de, por ejemplo, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% a SEQ ID NO: 13; o como mucho 70%, como mucho 75%, como mucho 80%, como mucho 85%, como mucho 90% o como mucho 95% a SEQ ID NO: 13. En aún otros aspectos de esta realización, una proteasa de enterovirus humano 3C comprende un polipéptido que tiene, por ejemplo, supresiones, adiciones y/o sustituciones de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos no contiguos respecto a SEQ ID NO: 13; o supresiones, adiciones y/o sustituciones de como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos no contiguos respecto a SEQ ID NO: 13. En aún otros aspectos de esta realización, una proteasa de enterovirus humano 3C comprende un polipéptido que tiene, por ejemplo, supresiones, adiciones y/o sustituciones de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos respecto a SEQ ID NO: 13; o supresiones, adiciones y/o sustituciones de como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos respecto a SEQ ID NO: 13.

En otro aspecto de esta realización, una proteasa TEV es SEQ ID NO: 14. En otro aspecto de esta realización, una proteasa TEV comprende aminoácidos 2038-2270 de SEQ ID NO: 14. En otro aspecto de esta realización, una proteasa TEV comprende SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23. En aún otro aspecto de esta realización, una proteasa TEV es una variante de proteasa TEV que se da de forma natural, tal como, por ejemplo, una isoforma de proteasa TEV. En aún otro aspecto de esta realización, una proteasa TEV es una variante de proteasa TEV que no se da de forma natural, tal como, por ejemplo, un variante de proteasa TEV conservativa, una variante de proteasa TEV no conservativa, una proteasa TEV quimérica, un fragmento de proteasa TEV activa o cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto de esta realización, una proteasa TEV, una variante de proteasa TEV que se da de forma natural, o una variante de proteasa TEV que no se da de forma natural, se obtiene a partir de especie de Potyvirus.

En otros aspectos de esta realización, una proteasa TEV comprende un polipéptido que tiene una identidad de aminoácido de, por ejemplo, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% a SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23; o como mucho 70%, como mucho 75%, como mucho 80%, como mucho 85%, como mucho 90% o como mucho 95% a SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23. En aún otros aspectos de esta realización, una proteasa TEV comprende un polipéptido que tiene, por ejemplo, supresiones, adiciones y/o sustituciones de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos no contiguos respecto a SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23; o supresiones, adiciones y/o sustituciones de como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos no contiguos respecto a SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23. En aún otros aspectos de esta realización, una proteasa TEV comprende un

5 polipéptido que tiene, por ejemplo, supresiones, adiciones y/o sustituciones de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos respecto a SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23; o supresiones, adiciones y/o sustituciones de como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos respecto a SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23.

10 En otro aspecto de esta realización, una proteasa TVMV es SEQ ID NO: 24. En otro aspecto de esta realización, una proteasa TEV comprende aminoácidos 2002-2236 de SEQ IS NO: 24. En aún otro aspecto de esta realización, una proteasa TVMV es una variante de proteasa TVMV que se da de forma natural, tal como, por ejemplo, una isoforma de proteasa TVMV. En aún otro aspecto de esta realización, una proteasa TVMV es una variante de proteasa TVMV que no se da de forma natural, tal como, por ejemplo, una variante de proteasa TVMV conservativa, una variante de proteasa TVMV no conservativa, una proteasa TVMV quimérica, un fragmento de proteasa TVMV activa o cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto de esta realización, una proteasa TVMV, una variante de proteasa TVMV que se da de forma natural, o una variante de proteasa TVMV que no se da de forma natural, se obtiene a partir de una especie de Potyvirus.

20 En otros aspectos de esta realización, una proteasa TVMV comprende un polipéptido que tiene una identidad de aminoácido de, por ejemplo, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% a SEQ ID NO: 24 o aminoácidos 2002-2236 de SEQ IS NO: 24; o como mucho 70%, como mucho 75%, como mucho 80%, como mucho 85%, como mucho 90% o como mucho 95% a SEQ ID NO: 24 o aminoácidos 2002-2236 de SEQ IS NO: 24. En aún otros aspectos de esta realización, una proteasa TVMV comprende un polipéptido que tiene, por ejemplo, supresiones, adiciones y/o sustituciones de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos no contiguos respecto a SEQ ID NO: 24 o aminoácidos 2002-2236 de SEQ IS NO: 24; o supresiones, adiciones y/o sustituciones de como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos no contiguos respecto a SEQ ID NO: 24 o aminoácidos 2002-2236 de SEQ IS NO: 24. En aún otros aspectos de esta realización, una proteasa TVMV comprende un polipéptido que tiene, por ejemplo, supresiones, adiciones y/o sustituciones de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos respecto a SEQ ID NO: 24 o aminoácidos 2002-2236 de SEQ IS NO: 24; o supresiones, adiciones y/o sustituciones de como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos respecto a SEQ ID NO: 24 o aminoácidos 2002-2236 de SEQ IS NO: 24.

30 En otro aspecto de esta realización, una proteasa subtilisina es SEQ ID NO: 25. En otro aspecto de esta realización, una proteasa subtilisina comprende aminoácidos 107-365 de SEQ IS NO: 25. En aún otro aspecto de esta realización, una proteasa subtilisina es una variante de proteasa subtilisina que se da de forma natural, tal como, por ejemplo, una isoforma de proteasa subtilisina. En aún otro aspecto de esta realización, una proteasa subtilisina es una variante de proteasa subtilisina que no se da de forma natural, tal como, por ejemplo, un variante de proteasa subtilisina conservativa, una variante de proteasa subtilisina no conservativa, una proteasa subtilisina quimérica, un fragmento de proteasa subtilisina activa o cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto de esta realización, una proteasa subtilisina, una variante de proteasa subtilisina que se da de forma natural o una variante de proteasa subtilisina que no se da de forma natural, se obtiene a partir de una especie de Bacillus.

40 En otros aspectos de esta realización, una proteasa subtilisina comprende un polipéptido que tiene una identidad de aminoácido de, por ejemplo, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% a SEQ ID NO: 25 o aminoácidos 107-365 de SEQ IS NO: 25; o como mucho 70%, como mucho 75%, como mucho 80%, como mucho 85%, como mucho 90% o como mucho 95% a SEQ ID NO: 25 o aminoácidos 107-365 de SEQ IS NO: 25. En aún otros aspectos de esta realización, una proteasa subtilisina comprende un polipéptido que tiene, por ejemplo, supresiones, adiciones y/o sustituciones de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos no contiguos respecto a SEQ ID NO: 25 o aminoácidos 107-365 de SEQ IS NO: 25; o supresiones, adiciones y/o sustituciones de como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos no contiguos respecto a SEQ ID NO: 25 o aminoácidos 107-365 de SEQ IS NO: 25. En aún otros aspectos de esta realización, una proteasa subtilisina comprende un polipéptido que tiene, por ejemplo, supresiones, adiciones y/o sustituciones de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos respecto a SEQ ID NO: 25 o aminoácidos 107-365 de SEQ IS NO: 25; o supresiones, adiciones y/o sustituciones de como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos respecto a SEQ ID NO: 25 o aminoácidos 107-365 de SEQ IS NO: 25.

55 En otro aspecto de esta realización, una proteasa caspasa 3 es SEQ ID NO: 26. En aún otro aspecto de esta realización, una proteasa caspasa 3 es una variante de proteasa caspasa 3 que se da de forma natural, tal como, por ejemplo, una isoforma de proteasa caspasa 3. En aún otro aspecto de esta realización, una proteasa caspasa 3 es una variante de proteasa caspasa 3 que no se da de forma natural, tal como, por ejemplo, un variante de proteasa caspasa 3 conservativa, una variante de proteasa caspasa 3 no conservativa, una proteasa caspasa 3 quimérica, un fragmento de proteasa caspasa 3 activa o cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto de esta realización, una proteasa caspasa 3, una variante de proteasa caspasa 3 que se da de forma natural, o una variante de proteasa caspasa 3 que no se da de forma natural, se obtiene a partir de una especie de mamífero tal como, por ejemplo, un ser humano, una vaca o un roedor.

En otros aspectos de esta realización, una proteasa caspasa 3 comprende un polipéptido que tiene una identidad de aminoácido de, por ejemplo, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% a SEQ ID NO: 26; o como mucho 70%, como mucho 75%, como mucho 80%, como mucho 85%, como mucho 90% o como mucho 95% a SEQ ID NO: 26. En aún otros aspectos de esta realización, una proteasa caspasa 3 comprende un polipéptido que tiene, por ejemplo, supresiones, adiciones y/o sustituciones de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos no contiguos respecto a SEQ ID NO: 26; o supresiones, adiciones y/o sustituciones de como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos respecto a SEQ ID NO: 26; o supresiones, adiciones y/o sustituciones de como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos respecto a SEQ ID NO: 26.

Los métodos descritos en la presente memoria incluyen, en parte, una construcción de expresión dual. Una construcción de expresión dual comprende dos moléculas de polinucleótido, que incluye cada una un marco de lectura abierta descrito en la presente memoria unido de forma operable a un vector de expresión útil para expresar ambas moléculas de polinucleótido en una célula o extracto libre de célula. Una amplia variedad de vectores de expresión duales pueden emplearse para expresar una molécula de polinucleótido descrita en la presente memoria, incluyendo, sin limitación, un vector de expresión dual viral; un vector de expresión dual procariótico; un vector de expresión dual eucariótico, tal como, por ejemplo, un vector de expresión dual de levadura, un vector de expresión dual de insecto y un vector de expresión dual de mamífero; y un vector de expresión dual de extracto libre de células. Se entiende además que los vectores de expresión dual útiles para aspectos prácticos de estos métodos pueden incluir aquellos que expresan las moléculas de polinucleótido bajo el control de un elemento promotor constitutivo, específico del tejido, específico de la célula o inducible, elemento mejorador o ambos. Ejemplos no limitantes de vectores de expresión dual, junto con reactivos bien establecidos y condiciones para hacer y usar una construcción de expresión a partir de dichos vectores de expresión están fácilmente disponibles a partir de vendedores comerciales que incluyen, sin limitación, EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI. La selección, fabricación y uso de un vector de expresión dual apropiado son procedimientos rutinarios bien en el alcance de un experto en la técnica y a partir de las enseñanzas en esta memoria.

Las construcciones de expresión dual descritas en la presente memoria pueden comprender un marco de lectura abierta que codifica una proteína que incluye una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena y otro marco de lectura abierta que codifica una proteasa que puede escindir el sitio de escisión de proteasa exógena situado en el bucle dicadena, convirtiendo así la proteína de cadena sencilla en su forma dicadena.

Así, en una realización, una construcción de expresión dual comprende un marco de lectura abierta que codifica una proteína que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena como se describe en la presente memoria y otro marco de lectura abierta que codifica una proteasa que puede escindir el sitio de escisión de proteasa exógena situado en el bucle dicadena como se describe en la presente memoria.

En un aspecto de esta realización, una construcción de expresión dual puede comprender un marco de lectura abierta que codifica una toxina clostridial que incluye una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV y otro marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV. En otro aspecto de esta realización, una construcción de expresión dual puede comprender un marco de lectura abierta que codifica una toxina clostridial que incluye un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a toxina clostridial y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV y otro marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV. En aún otro aspecto de esta realización, una construcción de expresión dual puede comprender un marco de lectura abierta que codifica una toxina clostridial que incluye un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a toxina clostridial, una región de bucle dicadena y un sitio de escisión de proteasa TEV, en donde el sitio de escisión de proteasa TEV está situado en la región de bucle dicadena y otro marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV.

En un aspecto de esta realización, una construcción de expresión dual comprende un marco de lectura abierta que codifica una proteína que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión que no es de toxina clostridial, una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena y otro marco de lectura abierta que codifica una proteasa que puede escindir el sitio de escisión de proteasa exógena situado en la región de bucle dicadena. En otro aspecto de esta realización, una construcción de expresión dual puede comprender un marco de lectura abierta que codifica una proteína que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión que no es de toxina clostridial y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV y otro marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV. En aún otro aspecto de esta realización, una construcción de expresión dual puede comprender un marco de lectura abierta que codifica una proteína que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión que no es de toxina clostridial, una región de bucle dicadena y un sitio de escisión de proteasa

TEV, en donde el sitio de escisión de proteasa TEV está situado en la región de bucle dicadena y otro marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV.

En un aspecto de esta realización, una construcción de expresión dual comprende un marco de lectura abierta que codifica una proteína que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial y un dominio de unión al sitio de escisión de proteasa integrado. En otro aspecto de esta realización, una construcción de expresión dual puede comprender un marco de lectura abierta que codifica una proteína que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión al sitio de escisión de proteasa TEV integrado y otro marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV. En aún otro aspecto de esta realización, una construcción de expresión dual puede comprender un marco de lectura abierta que codifica una proteína que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial y un dominio de unión al sitio de escisión de proteasa TEV integrado, en donde el sitio de escisión de proteasa TEV está situado en la región de bucle dicadena y otro marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV.

La posición de uno de los marcos de lectura abierta contenidos en la construcción de expresión dual puede estar en cualquier orden respecto a la posición del otro marco de lectura abierta, con la condición de que la transcripción a partir de ambos marcos de lectura abierta pueda aún darse. Cuando se fabrica una construcción de expresión dual, la iniciación transcripcional a partir de la primera región promotora transcribe típicamente ambos marcos de lectura abierta, mientras, la iniciación transcripcional a partir de la segunda región promotora típicamente transcribe solo uno de los marcos de lectura abierta. Así, dependiendo de la posición del marco de lectura abierta respecto a la primera y segunda región promotora, pueden hacerse el doble de transcripciones a partir de uno de los marcos de lectura abierta.

Así, en una realización, el marco de lectura abierta que codifica una proteasa está bajo el control de la primera región promotora mientras el marco de lectura abierta que codifica una proteína que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena está bajo el control de las regiones tanto del primer promotor como del segundo promotor. En un aspecto de esta realización, el marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV está bajo el control de la primera región promotora mientras el marco de lectura abierta que codifica una toxina clostridial que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV situado en la región de bucle dicadena está bajo el control de las regiones tanto del primer promotor como del segundo promotor. En otro aspecto de esta realización, el marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV está bajo el control de la primera región promotora mientras el marco de lectura abierta que codifica una proteína que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión que no es de toxina clostridial, y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV está bajo el control de las regiones tanto del primer promotor como del segundo promotor. En aún otro aspecto de esta realización, el marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV está bajo el control de la primera región promotora mientras el marco de lectura abierta que codifica una proteína que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial y un dominio de unión al sitio de escisión de proteasa TEV integrado está bajo el control de las regiones tanto del primer promotor como del segundo promotor.

En otra realización, el marco de lectura abierta que codifica una proteína que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena está bajo el control de la primera región promotora mientras el marco de lectura abierta que codifica una proteasa está bajo el control de las regiones tanto del primer promotor como del segundo promotor. En un aspecto de esta realización, el marco de lectura abierta que codifica una toxina clostridial que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV está bajo el control de la primera región promotora mientras el marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV está bajo el control de las regiones tanto del primer promotor como del segundo promotor. En otro aspecto de esta realización, el marco de lectura abierta que codifica una proteína que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión que no es de toxina clostridial, y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV está bajo el control de la primera región promotora mientras el marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV está bajo el control de las regiones tanto del primer promotor como del segundo promotor. En aún otro aspecto de esta realización, el marco de lectura abierta que codifica una proteína que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial y un dominio de unión al sitio de escisión de proteasa TEV integrado está bajo el control de la primera región promotora mientras el marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV está bajo el control de las regiones tanto del primer promotor como del segundo promotor.

La orientación 5'-3' de uno de los marcos de lectura abierta contenidos en la construcción de expresión dual puede estar en cualquier dirección respecto a la orientación 5'-3' del otro marco de lectura abierta, con la condición de que la transcripción a partir de ambos marcos de lectura abierta pueda aún darse. En una realización, la orientación 5'-3' de uno de los marcos de lectura abierta está en la misma dirección que la orientación 5'-3' del otro marco de lectura abierta. En otra realización, la orientación 5'-3' de uno de los marcos de lectura abierta está en la dirección contraria que la orientación 5'-3' del otro marco de lectura abierta. En un aspecto de esta realización, la orientación 5'-3' de uno de los marcos de lectura abierta es convergente respecto a la orientación 5'-3' del otro marco de lectura abierta. En un aspecto de esta realización, la orientación 5'-3' de uno de los marcos de lectura abierta es divergente respecto a la orientación 5'-3' del otro marco de lectura abierta.

Los métodos descritos en la presente memoria incluyen, en parte, una proteína que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. Como se usa en esta memoria, el término "región de bucle dicadena" significa la secuencia de aminoácidos de una toxina clostridial que contiene un sitio de escisión de proteasa usado para convertir la forma de cadena sencilla de una toxina clostridial en la forma dicadena.

5 Ejemplos no limitantes de una región de bucle dicadena de toxina clostridial, incluyen, una región de bucle dicadena de BoNT/A que comprende aminoácidos 430-454 de SEQ ID NO: 1; una región de bucle dicadena de BoNT/B que comprende aminoácidos 437-446 de SEQ ID NO: 2; una región de bucle dicadena de BoNT/C1 que comprende aminoácidos 437-453 de SEQ ID NO: 3; una región de bucle dicadena de BoNT/D que comprende aminoácidos 437-450 de SEQ ID NO: 4; una región de bucle dicadena de BoNT/E que comprende aminoácidos 412-426 de SEQ ID NO: 5; una región de bucle dicadena de BoNT/F que comprende aminoácidos 429-445 de SEQ ID NO: 6; una región de bucle dicadena de BoNT/G que comprende aminoácidos 436-450 de SEQ ID NO: 7; una región de bucle dicadena de TeNT que comprende aminoácidos 439-467 de SEQ ID NO: 8; una región de bucle dicadena de BaNT que comprende aminoácidos 421-435 de SEQ ID NO: 9; y una región de bucle dicadena de BuNT que comprende aminoácidos 412-426 de SEQ ID NO: 10 (Tabla 2).

15 Tabla 2. Región de bucle dicadena de toxinas clostridiales

| Toxina | Región de cadena ligera | Región de bucle dicadena que contiene el sitio de escisión de proteasa que se da de forma natural | Región de cadena pesada |
|---------|-------------------------|---|-------------------------|
| BoNT/A | NMNFTKLNFTGLFEFYKLL | CVRGIITSKTKSLDKGYNK*----ALNDLC | IKVNNWDL |
| BoNT/B | KQAYEEISKEHLAVYKIQM | CKSVK*-----APGIC | IDVDNEDL |
| BoNT/C1 | PALRKVNPENMLYLFTKF | CHKAIDGRSLYK*-----TLDC | RELLVKNTDL |
| BoNT/D | PALQKLSSSESVVDLFTKV | CLRLTKNSR*-----DDSTC | IKVKNRDL |
| BoNT/E | PRIITPITGRGLVKKIIRF | CKNIVSVKGIR*-----KSIC | IEINNGEL |
| BoNT/F | PKIIDSIPDKGLVEKIVKF | CKSVIPRKGTK*-----APRLC | IRVNNSEL |
| BoNT/G | KEAYEEISLEHLVIYRIAM | CKPVMYKNTGK*-----SEQC | IIVNNEDL |
| TeNT | TNAFRNVDGSLVSKLIGL | CKKIIPPTNIRENLYNRTA*SLTDLGGELC | IKIKNEDL |
| BaNT | SRIVGPIPDNGLVERFVGL | CKS-IVSKKGTK*-----NSLC | IKVNNRDL |
| BuNT | PRIITPITGRGLVKKIIRF | CKN-IVSVKGIR*-----KSIC | IEINNGEL |

La secuencia de aminoácidos presentada son como sigue: BoNT/A, residuos 410-462 de SEQ ID No: 1; BoNT/B, residuos 418-454 de SEQ ID No: 2; BoNT/C1, residuos 419-463 de SEQ ID No: 3; BoNT/D, residuos 419-458 de SEQ ID No: 4; BoNT/E, residuos 393-434 de SEQ ID No: 5; BoNT/F, residuos 410-453 de SEQ ID No: 6; BoNT/G, residuos 419-458 de SEQ ID No: 7; TeNT, residuos 422-475 de SEQ ID No: 8; BaNT, residuos 402-443 de SEQ ID No: 9; y BuNT, residuos 393-434 de SEQ ID No: 10. Un asterisco (*) indica el enlace peptídico que se escinde mediante una proteasa de toxina clostridial.

Como se menciona anteriormente, las toxinas clostridiales se traducen como un polipéptido de cadena sencilla de aproximadamente 150 kDa que se escinde posteriormente por escisión proteolítica en un bucle disulfuro mediante una proteasa que se da de forma natural. Este procesado post-traducciona da una molécula dicadena que comprende una cadena ligera de aproximadamente 50 kDa (CL) y una cadena pesada (CP) de aproximadamente 100 kDa unidas mediante un enlace disulfuro sencillo e interacciones no covalentes. Mientras la identidad de la proteasa se desconoce normalmente, el sitio de escisión de proteasa del bucle dicadena para muchas toxinas clostridiales se ha determinado. En BoNTs, la escisión en K448-A449 convierte la forma polipeptídica sencilla de BoNT/A en la forma dicadena; la escisión en K441-A442 convierte la forma polipeptídica sencilla de BoNT/B en la forma dicadena; la escisión en K449-T450 convierte la forma polipeptídica sencilla de BoNT/C1 en la forma dicadena; la escisión en R445-D446 convierte la forma polipeptídica sencilla de BoNT/D en la forma dicadena; la escisión en R422-K423 convierte la forma polipeptídica sencilla de BoNT/E en la forma dicadena; la escisión en K439-A440 convierte la forma polipeptídica sencilla de BoNT/F en la forma dicadena; y la escisión en K446-S447 convierte la forma polipeptídica sencilla de BoNT/G en la forma dicadena. La escisión proteolítica de la forma polipeptídica sencilla de TeNT a A457-S458 da por resultado la forma dicadena. La escisión proteolítica de la forma polipeptídica sencilla de BaNT a K4317-N432 da por resultado la forma dicadena. La escisión proteolítica de la forma polipeptídica sencilla de BuNT a R422-K423 da por resultado la forma dicadena. Dicho sitio de escisión de proteasa de bucle dicadena está unido de forma operable en el marco a una toxina clostridial modificada como una proteína de fusión. Sin embargo, debería notarse también que los sitios de escisión adicionales en el bucle dicadena también

parecen escindirse dando por resultado la generación de un pequeño fragmento peptídico que se pierde. Como un ejemplo no limitante, la escisión de un polipéptido de cadena sencilla BoNT/A da por resultado en última instancia la pérdida de un fragmento de diez aminoácidos en el bucle dicadena.

Se concibe que cualquier molécula que comprende una región de bucle dicadena puede modificarse para incluir un sitio de escisión de proteasa exógena útil para los métodos descritos. Ejemplos de moléculas que pueden tener el bucle dicadena modificado para incluir un sitio de escisión de proteasa exógena útil para los métodos descritos incluyen, por ejemplo, Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, Patente de EE.UU. 5.989.545; Clifford C. Shone et al., *Recombinant Toxin Fragments*, Patente de EE.UU. 6.461.617; Conrad P. Quinn et al., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, Patente de EE.UU. 6.632.440; Lance E. Steward et al., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, Patente de EE.UU. 6.843.998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, Patente de EE.UU. 7.244.437; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, Patente de EE.UU. 7.413.742; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, Patente de EE.UU. 7.425.338.

Una región de bucle dicadena se modifica por la adición de un sitio de escisión de proteasa exógena. Como se usa en esta memoria, el término "sitio de escisión de proteasa exógena" es sinónimo de un "sitio de escisión de proteasa que no se da de forma natural" o "sitio de escisión de proteasa no nativa" y se refiere a un sitio de escisión de proteasa que no está presente normalmente en una región de bucle dicadena de una toxina clostridial que se da de forma natural. Se concibe que cualquiera y todos los sitios de escisión de proteasa exógena que pueden usarse para convertir la forma polipeptídica de cadena sencilla de una toxina clostridial en la forma dicadena son útiles. Ejemplos no limitantes de sitios de escisión de proteasa exógena incluyen, por ejemplo, un sitio de escisión de proteasa enteroquinas, un sitio de escisión de proteasa de rinovirus humano 3C, un sitio de escisión de proteasa de enterovirus humano 3C, un sitio de escisión de proteasa de virus del grabado del tabaco (TEV), un sitio de escisión de proteasa del virus del moteado de las venas del tabaco (TVMV), un sitio de escisión de proteasa subtilisina o un sitio de escisión de proteasa caspasa 3.

Se concibe que un sitio de escisión de proteasa exógena de cualquiera y todas las longitudes pueda ser útil con la condición de que el sitio de escisión de proteasa exógena sea capaz de escindirse por su respectiva proteasa. Así, en aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa exógena puede tener una longitud de, por ejemplo, al menos 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 o 60 aminoácidos; o como mucho 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 o 60 aminoácidos.

En una realización, una región de bucle dicadena comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. En aspectos de esta realización, se modifica una región de bucle dicadena para comprender, por ejemplo, un sitio de escisión de proteasa enteroquinas, un sitio de escisión de proteasa de virus del grabado del tabaco, un sitio de escisión de proteasa del virus del moteado de las venas del tabaco, un sitio de escisión de proteasa de rinovirus humano 3C, un sitio de escisión de proteasa de enterovirus humano 3C, un sitio de escisión de subtilisina y un sitio de escisión de caspasa 3. En otros aspectos de esta realización, el sitio de escisión de proteasa exógena está situado en el bucle dicadena de, por ejemplo, un BoNT/A, un BoNT/B, un BoNT/C1, un BoNT/D, un BoNT/E, un BoNT/F, un BoNT/G, un TeNT, un BaNT o un BuNT. En otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa exógena está situado en el bucle dicadena de una proteína descrita en, por ejemplo, Patente de EE.UU. 5.989.545; Patente de EE.UU. 6.461.617; Patente de EE.UU. 6.632.440; Patente de EE.UU. 6.843.998; Patente de EE.UU. 7.244.437; Patente de EE.UU. 7.413.742 y Patente de EE.UU. 7.425.338.

En un aspecto de esta realización, una región de bucle dicadena comprende un sitio de escisión de proteasa de virus de grabado del tabaco que tiene la secuencia de consenso E-P5-P4-Y-P2-Q*-G (SEQ ID NO: 27) o E-P5-P4-Y-P2-Q*-S (SEQ ID NO: 28), donde P2, P4 y P5 pueden ser cualquier aminoácido. En otros aspectos de la realización, una región de bucle dicadena comprende un sitio de escisión de proteasa de virus de grabado de tabaco que comprende SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38. En aún otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa de virus de grabado de tabaco está situado en el bucle dicadena de, por ejemplo, un BoNT/A, un BoNT/B, un BoNT/C1, un BoNT/D, un BoNT/E, un BoNT/F, un BoNT/G, un TeNT, un BaNT o un BuNT. En otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa de virus de grabado de tabaco está situado en el bucle dicadena de una proteína descrita en, por ejemplo, Patente de EE.UU. 5.989.545; Patente de EE.UU. 6.461.617; Patente de EE.UU. 6.632.440; Patente de EE.UU. 6.843.998; Patente de EE.UU. 7.244.437; Patente de EE.UU. 7.413.742 y Patente de EE.UU. 7.425.338.

En otro aspecto de esta realización, una región de bucle dicadena comprende un sitio de escisión de proteasa de virus de moteado de las venas del tabaco que tiene la secuencia de consenso P6-P5-V-R-F-Q*-G (SEQ ID NO: 39) o P6-P5-V-R-F-Q*-S (SEQ ID NO: 40), donde P5 y P6 pueden ser cualquier aminoácido. En otros aspectos de la realización, una región de bucle dicadena comprende un sitio de escisión de proteasa de virus de moteado de las venas del tabaco que comprende SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44. En aún otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa de virus de moteado de las venas del tabaco está situado en el bucle dicadena de, por ejemplo, un BoNT/A, un BoNT/B, un BoNT/C1, un BoNT/D, un BoNT/E, un BoNT/F, un BoNT/G, un TeNT, un BaNT o un BuNT. En otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de

proteasa de virus de moteado de las venas del tabaco está situado en el bucle dicadena de una proteína descrita en, por ejemplo, Patente de EE.UU. 5.989.545; Patente de EE.UU. 6.461.617; Patente de EE.UU. 6.632.440; Patente de EE.UU. 6.843.998; Patente de EE.UU. 7.244.437; Patente de EE.UU. 7.413.742 y Patente de EE.UU. 7.425.338.

5 En aún otro aspecto de esta realización, una región de bucle dicadena comprende un sitio de escisión de proteasa de rinovirus humano 3C que tiene la secuencia de consenso P5-P4-L-F-Q*-G-P (SEQ ID NO: 45), donde P4 es G, A, V, L, I, M, S o T y P5 puede ser cualquier aminoácido con D o E preferidos. En otros aspectos de la realización, una región de bucle dicadena comprende un sitio de escisión de proteasa de rinovirus humano 3C que comprende SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 o SEQ ID NO: 51. En aún otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa de rinovirus humano 3C está situado en el bucle dicadena de, por ejemplo, un BoNT/A, un BoNT/B, un BoNT/C1, un BoNT/D, un BoNT/E, un BoNT/F, un BoNT/G, un TeNT, un BaNT o un BuNT. En otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa de rinovirus humano 3C está situado en el bucle dicadena de una proteína descrita en, por ejemplo, Patente de EE.UU. 5.989.545; Patente de EE.UU. 6.461.617; Patente de EE.UU. 6.632.440; Patente de EE.UU. 6.843.998; Patente de EE.UU. 7.244.437; Patente de EE.UU. 7.413.742 y Patente de EE.UU. 7.425.338.

15 En aún otro aspecto de esta realización, una región de bucle dicadena comprende un sitio de escisión de proteasa subtilisina que tiene la secuencia de consenso P6-P5-P4-P3-H*-Y (SEQ ID NO: 52) o P6-P5-P4-P3-Y-H* (SEQ ID NO: 53), donde P3, P4 y P5 y P6 pueden ser cualquier aminoácido. En otros aspectos de la realización, una región de bucle dicadena comprende un sitio de escisión de proteasa subtilisina que comprende SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 56. En aún otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa subtilisina está situado en el bucle dicadena de, por ejemplo, un BoNT/A, un BoNT/B, un BoNT/C1, un BoNT/D, un BoNT/E, un BoNT/F, un BoNT/G, un TeNT, un BaNT o un BuNT. En otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa subtilisina está situado en el bucle dicadena de una proteína descrita en, por ejemplo, Patente de EE.UU. 5.989.545; Patente de EE.UU. 6.461.617; Patente de EE.UU. 6.632.440; Patente de EE.UU. 6.843.998; Patente de EE.UU. 7.244.437; Patente de EE.UU. 7.413.742 y Patente de EE.UU. 7.425.338.

25 En un aspecto adicional de esta realización, una región de bucle dicadena comprende un sitio de escisión de proteasa caspasa 3 que tiene la secuencia de consenso D-P3-P2-D*P1' (SEQ ID NO: 57), donde P3 puede ser cualquier aminoácido, con E preferido, P2 puede ser cualquier aminoácido y P1' puede ser cualquier aminoácido, con G o S preferidos. En otros aspectos de la realización, una región de bucle dicadena comprende un sitio de escisión de proteasa caspasa 3 que comprende SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 o SEQ ID NO: 63. En aún otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa caspasa 3 está situado en el bucle dicadena de, por ejemplo, un BoNT/A, un BoNT/B, un BoNT/C1, un BoNT/D, un BoNT/E, un BoNT/F, un BoNT/G, un TeNT, un BaNT o un BuNT. En otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa caspasa 3 está situado en el bucle dicadena de una proteína descrita en, por ejemplo, Patente de EE.UU. 5.989.545; Patente de EE.UU. 6.461.617; Patente de EE.UU. 6.632.440; Patente de EE.UU. 6.843.998; Patente de EE.UU. 7.244.437; Patente de EE.UU. 7.413.742 y Patente de EE.UU. 7.425.338.

40 En aún otro aspecto de esta realización, una región de bucle dicadena comprende un sitio de escisión de proteasa enteroquinasa que tiene la secuencia de consenso DDDDK (SEQ ID NO: 64). En otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa enteroquinasa está situado en el bucle dicadena de, por ejemplo, un BoNT/A, un BoNT/B, un BoNT/C1, un BoNT/D, un BoNT/E, un BoNT/F, un BoNT/G, un TeNT, un BaNT o un BuNT. En aún otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa enteroquinasa está situado en el bucle dicadena de una proteína descrita en, por ejemplo, Patente de EE.UU. 5.989.545; Patente de EE.UU. 6.461.617; Patente de EE.UU. 6.632.440; Patente de EE.UU. 6.843.998; Patente de EE.UU. 7.244.437; Patente de EE.UU. 7.413.742 y Patente de EE.UU. 7.425.338.

45 Una región de bucle dicadena se modifica para sustituir un sitio de escisión de proteasa de bucle dicadena que se da de forma natural por un sitio de escisión de proteasa exógena. En esta modificación, el sitio de escisión de proteasa de bucle dicadena que se da de forma natural se hace inoperable y así no puede escindirse por su proteasa. Solo el sitio de escisión de proteasa exógena puede escindirse por su proteasa exógena correspondiente. En este tipo de modificación, el sitio de proteasa exógena se une de forma operable en el marco a una toxina clostridial modificada como una proteína de fusión y el sitio puede escindirse por su respectiva proteasa exógena. La sustitución de un sitio de escisión de proteasa de bucle dicadena endógeno con un sitio de escisión de proteasa exógena puede ser una sustitución de los sitios donde el sitio exógeno se construye en la posición que se aproxima a la posición del sitio de escisión del sitio endógeno. La sustitución de un sitio de escisión de proteasa de bucle dicadena endógeno con un sitio de escisión de proteasa exógena puede ser la adición de un sitio exógeno donde el sitio exógeno se construye en una posición diferente de la posición del sitio de escisión del sitio endógeno, construyéndose el sitio endógeno para ser inoperable.

55 Un sitio de escisión de proteasa que se da de forma natural contenido en la región de bucle dicadena pueden hacerse inoperable alterando al menos los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante la proteasa de bucle dicadena que se da de forma natural. Pueden hacerse alteraciones más extensas, con la condición de que los dos residuos de cisteína de la región del bucle dicadena permanezcan intactos y la región pueda aún formar un puente disulfuro. Ejemplos no limitantes de una alteración de aminoácidos incluyen la supresión de un aminoácido o la sustitución del aminoácido original con un aminoácido diferente. Así, en una

60

realización, un sitio de escisión de proteasa que se da de forma natural contenido en la región de bucle dicadena se hace inoperable alterando los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural. En otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa que se da naturalmente contenido en la región del bucle dicadena se hace inoperable alterando, por ejemplo, al menos tres aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido por una proteasa que se da de forma natural; al menos cuatro aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; al menos cinco aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; al menos seis aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; al menos siete aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; al menos ocho aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; al menos nueve aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; al menos diez aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; al menos 15 aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; o al menos 20 aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural.

En aún otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa de dicadena que se da de forma natural contenido en la región del bucle dicadena se hace inoperable alterando, por ejemplo, como mucho tres aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; como mucho cuatro aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; como mucho cinco aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; como mucho seis aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; como mucho siete aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; como mucho ocho aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; como mucho nueve aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; como mucho diez aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; como mucho 15 aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; o como mucho 20 aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural.

Los métodos descritos en la presente memoria incluyen, en parte, una célula. Se concibe que cualquiera y todas las células pueden usarse. Así, aspectos de esta realización incluyen, sin limitación, células procarióticas que incluyen, sin limitación, cepas de células bacterianas aeróbicas, microaerofílicas, capnofílicas, facultativas, anaeróbicas, gram negativas y gram positivas como las derivadas de, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridia perfringens*, *Clostridia difficile*, *Caulobacter crescentus*, *Lactococcus lactis*, *Methylobacterium extorquens*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Salmonella typhimurium*; y células eucarióticas que incluyen, sin limitación, cepas de levadura, tal como, por ejemplo, las derivadas de *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia angusta*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*; células de insecto y líneas celulares derivadas de insectos, tales como, por ejemplo, las derivadas de *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*, *Drosophila melanogaster* y *Manduca sexta*; y células de mamífero y líneas celulares derivadas de células de mamífero, tal como, por ejemplo, las derivadas de ratón, rata, hámster, porcinos, bovinas, equinas, de primate y ser humano. Las líneas celulares pueden obtenerse a partir de la Colección de Cultivo Tipo Americano, Colección Europea de Cultivos Celulares y la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares. Ejemplos no limitantes de protocolos específicos para seleccionar, fabricar y usar una línea celular apropiada se describen en por ejemplo, INSECT CELL CULTURE ENGINEERING (Mattheus F. A. Goosen et al. eds., Marcel Dekker, 1993); INSECT CELL CULTURES: FUNDAMENTAL AND APPLIED ASPECTS (J. M. Vlak et al. eds., Kluwer Academic Publishers, 1996); Maureen A. Harrison e Ian F. Rae, GENERAL TECHNIQUES OF CELL CULTURE (Cambridge University Press, 1997); CELL AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES (Alan Doyle et al eds., John Wiley and Sons, 1998); R. Ian Freshney, CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE (Wiley-Liss, 4ª ed. 2000); ANIMAL CELL CULTURE: A PRACTICAL APPROACH (John R. W. Masters ed., Oxford University Press, 3ª ed. 2000); MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL, supra, (2001); BASIC CELL CULTURE: A PRACTICAL APPROACH (John M. Davis, Oxford Press, 2ª ed. 2002); y CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, supra, (2004). Estos protocolos son procedimientos rutinarios en el alcance de un experto en la técnica y a partir de la enseñanza en esta memoria.

Los métodos descritos en la presente memoria incluyen, en parte, introducir en una célula una construcción de expresión o construcción de expresión dual como se describe en la presente memoria. Una construcción de expresión o construcción de expresión dual introducida en una célula puede mantenerse de forma temporal o estable por esa célula. Las construcciones de expresión mantenidas de forma estable o las construcciones de expresión dual pueden ser extra-cromosómicas y replicarse de forma autónoma, o pueden integrarse en el material

5 cromosómico de la célula y replicarse de forma no autónoma. Se concibe que puede usarse cualquiera y todos los métodos para introducir una construcción de expresión o una construcción de expresión dual descritos en la presente memoria en una célula. Métodos útiles para introducir una construcción de expresión o una construcción de expresión dual en una célula incluyen, sin limitación, la transfección mediada por un compuesto químico tal como, por ejemplo, mediado por fosfato de calcio, mediado por dietil-aminoetil (DEAE) dextrano, mediado por lípido, mediado por polietilenimina (PEI), mediado por polilisina y mediado por polibreno; transfección mediada por medios físicos, tal como, por ejemplo, reparto biolístico de partículas, microinyección, fusión de protoplasto y electroporación; y transfección mediada por virus, tal como por ejemplo, transfección mediada por retrovirus, véase, por ejemplo, *Introducing Cloned Genes into Cultured Mammalian Cells*, págs. 16.1-16.62 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3ª ed. 2001). Un experto en la técnica entiende que la selección de un método específico para introducir una construcción de expresión o una construcción de expresión dual en una célula dependerá, en parte, o si la célula contendrá temporalmente la construcción de expresión o construcción de expresión dual, o si la célula contendrá de forma estable la construcción de expresión o la construcción de expresión dual. Estos protocolos son procedimientos rutinarios en el alcance de un experto en la técnica y a partir de la enseñanza en esta memoria.

15 En un aspecto de esta memoria, un método mediado por compuesto químico, denominado transfección, se usa para introducir una construcción de expresión o una construcción de expresión dual descrita en la presente memoria en una célula. En métodos mediados por compuesto químico de transfección el reactivo químico forma un complejo con la construcción de expresión o construcción de expresión dual que facilita su absorción en las células. Dichos reactivos químicos incluyen, sin limitación, los mediados por fosfato de calcio, véase, por ejemplo, Martin Jordan y Florian Worm, *Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate*, 33(2) Methods 136-143 (2004); mediados por dietil-aminoetil (DEAE) dextrano, mediado por lípido, mediado por polímero catiónico como mediado por polietilenimina (PEI) y mediado por polilisina y mediado por polibreno, véase, por ejemplo, Chun Zhang et al., *Polyethylenimine strategies for plasmid delivery to brain-derived cells*, 33(2) Methods 144-150 (2004). Dichos sistemas de reparto mediados por compuestos químicos pueden prepararse por métodos estándar y están disponibles comercialmente, véase, por ejemplo, Equipo de Transfección CellPfect (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); Equipo de Transfección de Mamíferos, Fosfato de Calcio y DEAE Dextrano, (Stratagene, Inc., La Jolla, CA); Reactivo de Transfección Lipofectamine™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA); Equipo de Transfección ExGen 500 (Fermentas, Inc., Hanover, MD), y Equipos de Transfección SuperFect y Effectene (Qiagen, Inc., Valencia, CA).

20 En otro aspecto de esta realización, un método mediado físicamente se usa para introducir una construcción de expresión o una construcción de expresión dual descrita en la presente memoria en una célula. Las técnicas físicas incluyen, sin limitación, electroporación, biolística y microinyección. Las técnicas biolísticas y de microinyección perforan la pared celular para introducir la construcción de expresión o construcción de expresión dual en la célula, véase, por ejemplo, Jeike E. Biewenga et al., *Plasmid-mediated gene transfer in neurons using the biolistics technique*, 71(1) J. Neurosci. Methods. 67-75 (1997); y John O'Brien y Sarah C. R. Lummis, *Biolistic and diolistic transfection: using the gene gun to deliver DNA and lipophilic dyes into mammalian cells*, 33(2) Methods 121-125 (2004). La electroporación, también denominada electroporación, usa pulsos eléctricos, breves, de alto voltaje, para crear poros temporales en la membrana a través de los que las moléculas de polinucleótido entran y pueden usarse efectivamente para transfecciones estables y temporales de todos los tipos de células, véase, por ejemplo, M. Golzio et al., *In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression*, 33(2) Methods 126-135 (2004); y Oliver Greschet al., *New non-viral method for gene transfer into primary cells*, 33(2) Methods 151-163 (2004).

35 En otro aspecto de esta realización, un método mediado por virus, denominado transducción, se usa para introducir una construcción de expresión o una construcción de expresión dual descrita en la presente memoria en una célula. En métodos mediados por virus de transducción temporal, el proceso por el que las partículas virales infectan y replican en una célula huésped se ha manipulado para usar este mecanismo para introducir la construcción de expresión o construcción de expresión dual en la célula. Los métodos mediados por virus se han desarrollado a partir de una amplia variedad de virus que incluyen, sin limitación, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus simple del herpes, picornavirus, alfavirus y baculovirus, véase, por ejemplo, Armin Blesch, *Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer*, 33(2) Methods 164-172 (2004); y Maurizio Federico, *From lentiviruses to lentiviral vectors*, 229 Methods Mol. Biol. 3-15 (2003); E. M. Poeschla, *Non-primate lentiviral vectors*, 5(5) Curr. Opin. Mol. Ther. 529-540 (2003); Karim Benihoud et al., *Adenovirus vectors for gene delivery*, 10(5) Curr. Opin. Biotechnol. 440-447 (1999); H. Bueler, *Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy*, 380(6) Biol. Chem. 613-622 (1999); Chooi M. Lai et al., *Adenovirus and adeno-associated virus vectors*, 21(12) DNA Cell Biol. 895-913 (2002); Edward A. Burton et al., *Gene delivery using herpes simplex virus vectors*, 21(12) DNA Cell Biol. 915-936 (2002); Paola Grandi et al., *Targeting HSV amplicon vectors*, 33(2) Methods 179-186 (2004); Ilya Frolov et al., *Alphavirus-based expression vectors: strategies and applications*, 93(21) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 11371-11377 (1996); Markus U. Ehrenguber, *Alphaviral gene transfer in neurobiology*, 59(1) Brain Res. Bull. 13-22 (2002); Thomas A. Kost y J. Patrick Condreay, *Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors*, 20(4) Trends Biotechnol. 173-180 (2002); y A. Huser y C. Hofmann, *Baculovirus vectors: novel mammalian cell gene-delivery vehicles and their applications*, 3(1) Am. J. Pharmacogenomics 53-63 (2003).

Los adenovirus, que son virus de ADN de doble hebra, no encapsulados, se seleccionan a menudo para la transducción de células de mamíferos porque los adenovirus manejan moléculas de polinucleótido relativamente grandes de aproximadamente 36 kb, se producen a altos títulos, y pueden infectar eficientemente una amplia variedad de células que se dividen y que no se dividen, véase por ejemplo, Wim T. J. M. C. Hermens et al., *Transient gene transfer to neurons and glia: analysis of adenoviral vector performance in the CNS and PNS*, 71(1) *J. Neurosci. Methods* 85-98 (1997); y Hiroyuki Mizuguchi et al., *Approaches for generating recombinant adenovirus vectors*, 52(3) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 165-176 (2001). La transducción que usa sistema con base adenoviral no soporta la expresión de proteína prolongada porque la molécula de ácido nucleico se porta en un episoma en el núcleo celular, más que estar integrado en el cromosoma de la célula huésped. Los sistemas de vector adenoviral y los protocolos específicos para como usar dichos vectores se describen en, por ejemplo, Sistema de Expresión Adenoviral VIRAPOWERTM (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y Manual de Instrucción del Sistema de Expresión Adenoviral VIRAPOWERTM 25-0543 versión A, Invitrogen, Inc., (15 de Jul., 2002); y Sistema de Vector Adenoviral ADEASYTM (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) y Manual de Instrucción del Sistema del Vector Adenoviral ADEASYTM 064004f, Stratagene, Inc.

La introducción de una construcción de expresión o construcción de expresión dual descrita en la presente memoria en una célula puede alcanzarse también usando retrovirus de ARN de hebra sencilla, tal como, por ejemplo, oncoretrovirus y lentivirus. La transducción mediada por retrovirus a menudo producen eficiencias de transducción cerca de 100%, pueden controlar fácilmente el número de copias proviral variando la multiplicidad de infección (MOI) y pueden usarse para transducir células de forma temporal o estable, véase, por ejemplo, Tiziana Tonini et al., *Transient production of retroviral- and lentiviral-based vectors for the transduction of Mammalian cells*, 285 *Methods Mol. Biol.* 141-148 (2004); Armin Blesch, *Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer*, 33(2) *Methods* 164-172 (2004); Félix Recillas-Targa, *Gene transfer and expression in mammalian cell lines and transgenic animals*, 267 *Methods Mol. Biol.* 417-433 (2004); y Roland Wolkowicz et al., *Lentiviral vectors for the delivery of DNA into mammalian cells*, 246 *Methods Mol. Biol.* 391-411 (2004). Las partículas retrovirales consisten en un genoma de ARN empaquetado en un cápside de proteína, rodeado por una cápsula de lípido. El retrovirus infecta una célula huésped inyectando su ARN en el citoplasma junto con la enzima de transcriptasa inversa. El templado de ARN se transcribe de forma inversa entonces a un ADNc de doble hebra, lineal, que se replica a sí mismo integrándose en el genoma de la célula huésped. Las partículas virales se extienden tanto verticalmente (desde la célula parental a las células hijas por medio del provirus) además de horizontalmente (de célula a célula por medio de viriones). Esta estrategia de replicación permite la expresión persistente a largo plazo ya que las moléculas de ácido nucleico de interés están integradas de forma estable en un cromosoma de la célula huésped, permitiendo así la expresión a largo plazo de la proteína. Por ejemplo, estudios animales han mostrado que los vectores lentivirales inyectados en una variedad de tejidos produjeron expresión de proteína sostenida durante más de 1 año, véase por ejemplo, Luigi Naldini et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of non-dividing cells by a lentiviral vector*, 272(5259) *Science* 263-267 (1996). Los sistemas de vector derivados de oncoretrovirus, tal como, por ejemplo, virus de leucemia murina Moloney (MoMLV), se usan ampliamente e infectan muchas células que no se dividen diferentes. Los lentivirus pueden infectar además muchos tipos diferentes de células, que incluyen células que se dividen y que no se dividen y poseen proteínas de envuelta complejas, que permite la señalización celular altamente específica.

Los vectores retrovirales y protocolos específicos para como usar dichos vectores se describen en, por ejemplo, Manfred Gossen y Hermann Bujard, *Tight control of gene expression in eukaryotic cells by tetracycline-responsive promoters*, Patente de EE. UU. 5.464.758, Hermann Bujard y Manfred Gossen, *Methods for regulating gene expression*, Patente de EE.UU. 5.814.618, David S. Hogness, *Polynucleotides encoding insect steroid hormone receptor polypeptides and cells transformed with same*, Patente de EE.UU. 5.514.578, y David S. Hogness, *Polynucleotide encoding insect ecdysone receptor*, Patente de EE.UU. 6.245.531; Elisabetta Vegeto et al., *Progesterone receptor having C. terminal hormone binding domain truncations*, Patente de EE.UU. 5.364.791, Elisabetta Vegeto et al., *Mutated steroid hormone receptors, methods for their use and molecular switch for gene therapy*, Patente de EE.UU. 5.874.534, y Elisabetta Vegeto et al., *Mutated steroid hormone receptors, methods for their use and molecular switch for gene therapy*, Patente de EE.UU. 5.935.934. Además, dichos sistemas de reparto viral pueden prepararse por métodos estándar y están disponibles comercialmente, véase, por ejemplo, Sistemas de Expresión Génica BD™ Tet-Off y Tet-On (BD Biosciences-Clonotech, Palo Alto, CA) y Manual de Usuario de Sistemas de Expresión Génica BD™ Tet-Off and Tet-On, PT3001-1, BD Biosciences Clonotech, (14 de Mar., 2003), Sistema GENESWITCH™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y Sistema GENESWITCH™ Un Sistema de Expresión Regulado por Mifepristona para Células de Mamífero versión D, 25-0313, Invitrogen, Inc., (4 de Nov., 2002); Sistema de Expresión Lentiviral VIRAPOWERTM (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y Manual de Instrucción del Sistema de Expresión Lentiviral VIRAPOWERTM 25-0501 versión E, Invitrogen, Inc., (8 de Dic., 2003); y Sistema de Expresión de Mamífero Inducible por Retrovirus COMPLETE CONTROL® (Stratagene, La Jolla, CA) y Manual de Instrucción del Sistema de Expresión de Mamíferos Inducible por Retrovirus COMPLETE CONTROL®, 064005e.

Los métodos descritos en la presente memoria incluyen, en parte, expresar una construcción de expresión o construcción de expresión dual descrita en la presente memoria. Se concibe que cualquiera de una variedad de sistemas de expresión puede ser útil para expresar una construcción de expresión o una construcción de expresión dual descrita en la presente memoria, incluyendo, sin limitación, sistemas basados en células y sistemas de expresión libre de células. Los sistemas basados en células que incluyen, sin limitación, sistemas de expresión viral,

sistemas de expresión procarióticas, sistemas de expresión de levadura, sistemas de expresión baculovirales, sistemas de expresión de insectos y sistemas de expresión de mamíferos. Los sistemas libres de células incluyen, sin limitación, extractos de germen de trigo, extractos de reticulocito de conejo y extractos de *E. coli* y generalmente son equivalentes al método descrito en esta memoria. La expresión de una construcción de expresión o construcción de expresión dual usando un sistema de expresión puede incluir cualquiera de una variedad de características que incluyen, sin limitación, expresión inducible, expresión no inducible, expresión constitutiva, expresión mediada por virus, expresión integrada de forma estable y expresión temporal. Los sistemas de expresión que incluyen vectores bien caracterizados, reactivos, condiciones y células están bien establecidos y están fácilmente disponibles a partir de vendedores comerciales que incluyen, sin limitación, Ambion, Inc. Austin, TX; BD Biosciences-Clontech, Palo Alto, CA; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA; Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA; QIAGEN, Inc., Valencia, CA; Roche Applied Science, Indianápolis, IN; y Stratagene, La Jolla, CA. Ejemplos no limitantes en la selección y uso de sistemas de expresión heterólogos apropiados se describen en, por ejemplo, PROTEIN EXPRESSION. A PRACTICAL APPROACH (S. J. Higgins y B. David Hames eds., Oxford University Press, 1999); Joseph M. Fernández y James P. Hoefler, GENE EXPRESSION SYSTEMS. USING NATURE FOR THE ART OF EXPRESSION (Academic Press, 1999); y Meena Rai y Harish Padh, Expression Systems for Production of Heterologous Proteins, 80(9) CURRENT SCIENCE 1121-1128, (2001). Estos protocolos son procedimientos rutinarios bien en el alcance de un experto en la técnica y a partir de la enseñanza en esta memoria.

Una variedad de procedimientos de expresión basados en células son útiles para expresar una construcción de expresión o una construcción de expresión dual descrita en la presente memoria. Los ejemplos incluyen, sin limitación, sistemas de expresión viral, sistemas de expresión procariótica, sistemas de expresión de levadura, sistemas de expresión baculoviral, sistemas de expresión de insectos y sistemas de expresión de mamíferos. Los sistemas de expresión viral incluyen, sin limitación, el VIRAPOWERTM Lentiviral (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), los Sistemas de Expresión Adenoviral (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), el Sistema de Vector Adenoviral ADEASYTM XL (Stratagene, La Jolla, CA) y el Sistema de Expresión Génica Retroviral VIRAPORT® (Stratagene, La Jolla, CA). Ejemplos no limitantes de sistemas de expresión procariótica incluyen el Sistema de Expresión CHAMPIONTM pET (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI), el Sistema de Expresión Bacteriana TRIEXTM (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI), el Sistema de Expresión QIAEXPRESS® (QIAGEN, Inc.) y el Sistema de Expresión y Purificación de Proteínas AFFINITY® (Stratagene, La Jolla, CA). Los sistemas de expresión de levadura incluyen, sin limitación, el Equipo de Expresión de *Pichia* EASYSELECTTM (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), los Equipos de Vector de Expresión YES-ECHOTM (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y el Sistema de Expresión de *S. pombe* SPECTRAM (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA). Ejemplos no limitantes de sistemas de expresión baculoviral incluyen el BACULODIRECTTM (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), el BAC-TO-BAC® (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y el BD BACULOGOLDTM (BD Biosciences-Pharmingen, San Diego, CA). Los sistemas de expresión de insectos incluyen, sin limitación, el Sistema de Expresión de *Drosophila* (DES®) (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), Sistema INSECTSELECTTM (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y Sistema INSECTDIRECTTM (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI). Ejemplos no limitantes de sistemas de expresión de mamíferos incluyen el Sistema T-REXTM (Expresión Regulada por Tetraciclina) (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), el Sistema FLP-IN™ T-REXTM (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), el sistema pcDNATM (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), el sistema pSecTag2 (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), el Sistema EXCHANGER®, Sistema TAP de Mamífero INTERPLAYTM (Stratagene, La Jolla, CA), Sistema de Expresión de Mamíferos Inducible COMPLETE CONTROL® (Stratagene, La Jolla, CA) y Sistema de Expresión de Mamíferos Inducible LACSWITCH® II (Stratagene, La Jolla, CA).

Otro procedimiento para expresar una construcción de expresión o una construcción de expresión dual descrita en la presente memoria emplea un sistema de expresión libre de células tal como, sin limitación, extractos procarióticos y extractos eucarióticos. Ejemplos no limitantes de extractos de célula procariótica incluyen el Equipo RTS 100 *E. coli* HY (Roche Applied Science, Indianápolis, IN), el Equipo de Traducción In Vitro ACTIVEPRO™ (Ambion, Inc., Austin, TX), el Sistema ECOPRO™ (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI) y el Sistema de Expresión Expressway™ Plus (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA). El extracto de células eucarióticas incluye, sin limitación, el Equipo CECF de Germen de Trigo RTS 100 (Roche Applied Science, Indianápolis, IN), los Sistemas de Extracto de Germen de Trigo Acoplados TNT® (Promega Corp., Madison, WI), el Equipo IVT™ de Germen de Trigo (Ambion, Inc., Austin, TX), el Equipo Retic Lysate IVT™ (Ambion, Inc., Austin, TX), el Sistema PROTEINSCRIPT® II (Ambion, Inc., Austin, TX) y los Sistemas de Lisato de Reticulocito Acoplados TNT® (Promega Corp., Madison, WI).

Los métodos descritos en la presente memoria incluyen, en parte, hacer crecer una célula a una primera temperatura durante un cierto periodo de tiempo y después hacer crecer la célula a una segunda temperatura durante un cierto periodo de tiempo. Las temperaturas primera y segunda y los periodos de tiempo en que crecen las células a las temperaturas primera y segunda se determinan en base a la cantidad deseada de proteína a expresar por la célula, y la eficiencia de escisión deseada en el sitio de escisión de proteasa exógena situado en la región de bucle dicadena para convertir la proteína de cadena sencilla en su forma dicadena.

En una realización, una célula se hace crecer a una primera temperatura durante un cierto periodo de tiempo para alcanzar la máxima densidad celular. En aspectos de esta realización, una célula se hace crecer a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 0,5 horas, aproximadamente 1,0 hora, aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 2,0 horas, aproximadamente 3,0 horas, aproximadamente 3,5 horas, aproximadamente 4,0 horas, aproximadamente 5,0 horas, aproximadamente 6,0 horas, aproximadamente 7,0 horas, aproximadamente 8,0 horas, aproximadamente 9,0 horas o aproximadamente 10 horas. En otros aspectos de esta realización, una célula se hace

5 crecer a aproximadamente 42°C durante aproximadamente 0,5 horas, aproximadamente 1,0 hora, aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 2,0 horas, aproximadamente 3,0 horas, aproximadamente 3,5 horas, aproximadamente 4,0 horas, aproximadamente 5,0 horas. En aspectos de esta realización, una célula se hace crecer a aproximadamente 30°C durante aproximadamente 0,5 horas, aproximadamente 1,0 hora, aproximadamente 1,5
 10 horas, aproximadamente 2,0 horas, aproximadamente 3,0 horas, aproximadamente 3,5 horas, aproximadamente 4,0 horas o aproximadamente 5,0 horas. En aún otros aspectos de esta realización, una célula se hace crecer a aproximadamente 12°C durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas, a aproximadamente 16°C durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas, a aproximadamente 20°C durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas, o a aproximadamente 24°C durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas. En aún otros aspectos de esta realización, una célula se hace crecer a aproximadamente 12°C a aproximadamente 16°C durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas, o a aproximadamente 20°C a aproximadamente 24°C durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas.

15 En otra realización, una célula se hace crecer a una segunda temperatura durante un cierto periodo de tiempo para alcanzar la máxima inducción de expresión de proteína. En aspectos de esta realización, una célula se hace crecer a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 2,5 horas, aproximadamente 3,5 horas, aproximadamente 4,5 horas, aproximadamente 5,5 horas, aproximadamente 6,5 horas, aproximadamente 7,5 horas, aproximadamente 8,5 horas, aproximadamente 9,5 horas, aproximadamente 10,5 horas, aproximadamente 11,5 horas, aproximadamente 12,5 horas, aproximadamente 13,5 horas, aproximadamente 14,5 horas, aproximadamente 15,5 horas, aproximadamente 16,5 horas o aproximadamente 24,5 horas. En otros aspectos de esta realización, una célula se hace crecer a aproximadamente 30°C durante aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 2,5 horas, aproximadamente 3,5 horas, aproximadamente 4,5 horas, aproximadamente 5,5 horas, aproximadamente 6,5 horas, aproximadamente 7,5 horas, aproximadamente 8,5 horas, aproximadamente 9,5 horas, aproximadamente 10,5 horas, aproximadamente 11,5 horas, aproximadamente 12,5 horas, aproximadamente 13,5 horas, aproximadamente 14,5 horas, aproximadamente 15,5 horas, aproximadamente 16,5 horas o aproximadamente 24,5 horas. En aún otros aspectos de esta realización, una célula se hace crecer a aproximadamente 25°C durante aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 2,5 horas, aproximadamente 3,5 horas, aproximadamente 4,5 horas, aproximadamente 5,5 horas, aproximadamente 6,5 horas, aproximadamente 7,5 horas, aproximadamente 8,5 horas, aproximadamente 9,5 horas, aproximadamente 10,5 horas, aproximadamente 11,5 horas, aproximadamente 12,5 horas, aproximadamente 13,5 horas, aproximadamente 14,5 horas, aproximadamente 15,5 horas, aproximadamente 16,5 horas o aproximadamente 24,5 horas. En aún otros aspectos de esta realización, una célula se hace crecer a aproximadamente 22°C durante aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 2,5 horas, aproximadamente 3,5 horas, aproximadamente 4,5 horas, aproximadamente 5,5 horas, aproximadamente 6,5 horas, aproximadamente 7,5 horas, aproximadamente 8,5 horas, aproximadamente 9,5 horas, aproximadamente 10,5 horas, aproximadamente 11,5 horas, aproximadamente 12,5 horas, aproximadamente 13,5 horas, aproximadamente 14,5 horas, aproximadamente 15,5 horas, aproximadamente 16,5 horas o aproximadamente 24,5 horas. En aspectos adicionales de esta realización, una célula se hace crecer a aproximadamente 16°C durante aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 2,5 horas, aproximadamente 3,5 horas, aproximadamente 4,5 horas, aproximadamente 5,5 horas, aproximadamente 6,5 horas, aproximadamente 7,5 horas, aproximadamente 8,5 horas, aproximadamente 9,5 horas, aproximadamente 10,5 horas, aproximadamente 11,5 horas, aproximadamente 12,5 horas, aproximadamente 13,5 horas, aproximadamente 14,5 horas, aproximadamente 15,5 horas, aproximadamente 16,5 horas o aproximadamente 24,5 horas. En aspectos aún adicionales de esta realización, una célula se hace crecer a aproximadamente 12°C durante aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 2,5 horas, aproximadamente 3,5 horas, aproximadamente 4,5 horas, aproximadamente 5,5 horas, aproximadamente 6,5 horas, aproximadamente 7,5 horas, aproximadamente 8,5 horas, aproximadamente 9,5 horas, aproximadamente 10,5 horas, aproximadamente 11,5 horas, aproximadamente 12,5 horas, aproximadamente 13,5 horas, aproximadamente 14,5 horas, aproximadamente 15,5 horas, aproximadamente 16,5 horas o aproximadamente 24,5 horas.

Aspectos de la presente invención son como se describen en las reivindicaciones.

Ejemplos

50 Ejemplo 1

Variantes de proteasa TEV

El siguiente ejemplo ilustra cómo hacer y usar las variantes de proteasa TEV que tienen estabilidad y/o solubilidad aumentada.

A. Construcción de construcciones de expresión pET29/TEV.

55 Para producir una proteasa TEV de forma recombinante, se sintetizó un marco de lectura abierta que codifica la proteasa TEV deseada usando procedimientos estándar (BlueHeron Biotechnology, Bothell, WA). Se sintetizaron oligonucleótidos complementarios de 20 a 50 bases de longitud, que abarcan el marco de lectura abierto entero, usando síntesis de fosoramidita estándar. Estos oligonucleótidos se hibridaron en dobletes de doble hebra que se ligaron secuencialmente juntos para montar la molécula de polinucleótido de longitud total. Esta molécula de

polinucleótido se clonó usando métodos de biología molecular estándar en un vector de transporte pUCBHB1 en el sitio *SmaI* para generar plásmidos pUCBHB1/TEV. La molécula de polinucleótido sintetizada se verificó por secuenciación usando BIG DYE TERMINATOR™ Química 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

- 5 El marco de lectura abierta que codifica las variantes TEV se optimizaron con codones para la expresión de *E. coli* y todas codifican un fragmento proteolítico de aproximadamente 250 aminoácidos de aproximadamente 27,5 kDa, que corresponden a residuos 2038-2279 de la poliproteína TEV de longitud completa condensada a etiqueta de purificación con afinidad a la polihistidina tanto N como C terminal. La expresión recombinante de proteasa TEV de tipo salvaje da por resultado una proteína que tiene una propensión para escindirse a sí misma en Serina 219 para generar una proteasa truncada con actividad proteolítica altamente disminuida. Así, para eliminar enormemente la autoproteólisis y posterior generación de este producto truncado, se sintetizaron variantes TEV donde la Serina 219 se cambió o bien a Asparraguina (S219N) o Valina (S219V). Además, está bien documentado que aunque la proteasa TEV de tipo salvaje recombinante se expresa a niveles muy altos en *E. coli*, se casi enteramente insoluble (Kapust et al., 2001). Así, para mejorar la solubilidad del TEV expresado, se hicieron varias variantes de aminoácidos y se ensayaron para determinar si los cambios dieron por resultado solubilidad aumentada de proteína. Las variantes de TEV sintetizadas se muestran en la Tabla 3. La variante 1 representó una construcción TEV con codón optimizado fabricado con una etiqueta de His C terminal y la mutación S219N. La variante 11 fue una construcción con secuencia de ADN nativo de proteasa TEV fabricada con una etiqueta N terminal y la mutación S219N.

Tabla 3. Variantes de proteasa TEV

| Variante | Cambio para Eliminación de Autoproteólisis | Cambios que Mejoran la Solubilidad | Etiqueta de afinidad | ADN SEQ ID NO: | Proteína SEQ ID NO: |
|----------|--|-------------------------------------|----------------------|----------------|---------------------|
| 1 | S219N | — | Extremo C | 65 | 66 |
| 2 | S219N | L56V, S135G | Extremo N | 67 | 68 |
| 3 | S219N | T17S, N68D, I77V | Extremo N | 69 | 70 |
| 4 | S219N | N44V, L56V, S135G | Extremo N | 71 | 72 |
| 5 | S219N | L56V, N68D, S135G | Extremo N | 73 | 74 |
| 6 | S219N | T17S, L56V, N68D, I77V | Extremo N | 75 | 76 |
| 7 | S219N | T17S, N68D, I77V, S135G | Extremo N | 77 | 78 |
| 8 | S219N | T17S, N44V, L56V, N68D, I77V, S135G | Extremo C | 79 | 80 |
| 9 | S219V | T17S, N44V, L56V, N68D, I77V, S135G | Extremo N | 81 | 82 |
| 10 | S219N | T17S, N44V, L56V, N68D, I77V, S135G | Extremo N | 83 | 84 |
| 11 | S219N | — | Extremo N | 85 | 86 |

- 20 Para construir las construcciones de expresión variantes pET29/TEV, se digirió una construcción pUCBHB1/TEV con endonucleasas de restricción que 1) escinden la inserción que comprende el marco de lectura abierta que codifica la TEV; y 2) permite a esta inserción estar unida de forma operable a un vector pET29 (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI). Usando un procedimiento de ADN ligasa T4 esta inserción se ligó direccionalmente en un vector pET29 digerido con las mismas endonucleasas de restricción en el sitio de clonado múltiple. La mezcla de ligado se transformó en células Acella BL21(DE3) de *E. coli* electrocompetentes (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) por electroporación, se pusieron en platos de agar Luria-Bertani al 1,5% (pH 7,0) que contenían 50 µg/mL de canamicina, y se colocaron en una incubadora a 37°C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen las construcciones de expresión se identificaron como colonias resistentes a la canamicina. Las construcciones candidatas se aislaron usando un procedimiento de mini-preparación de plásmido de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión con endonucleasas de restricción y secuenciación de ambas hebras de ADN para confirmar la presencia e integridad de la inserción génica TEV. Esta estrategia de clonado dio una construcción de expresión pET29 que comprende la molécula de polinucleótido que codifica variantes TEV unidas de forma operable a péptido de purificación de afinidad de polihistidina o bien carboxilo terminal o amino terminal.

35

B. Análisis de expresión TEV bajo diferentes condiciones de inducción.

Para determinar las mejores condiciones de crecimiento e inducción de proteína a usar, se hicieron crecer las variantes 9 y 10 de pET29/TEV (Tabla 3) y se indujeron en un medio inducido de IPTG y un medio de auto-inducción. Además, la longitud de inducción se examinó.

- 5 Para inducir la expresión con IPTG, las células que albergan la construcción de expresión TEV se hicieron crecer primero toda la noche para producir un cultivo iniciador. Medio LB fresco se inoculó a 1:1000 con el cultivo toda la noche y se dejó crecer, con agitación, a 37°C hasta que OD₆₀₀ alcanzó 0,7, en cuyo momento se añadió IPTG a una concentración final de 0,6 mM. Las células se cosecharon 4 horas después de la inducción y los lisatos celulares totales se evaluaron para detectar la expresión diana.
- 10 Para expresar construcciones bajo condiciones de auto-inducción, 3,0 mL de medio PA-0,5G que contenía 50 µg/mL de canamicina se inoculó con una única colonia de células BL21(DE3) que albergan la construcción de expresión apropiada y se hicieron crecer a 37°C con agitación toda la noche. 1,0 µL de este cultivo iniciador se usó para inocular 1,0 mL de medio de auto-inducción ZYP-5052 que contenía 50 µg/mL de canamicina. Las células se hicieron crecer a 37°C con agitación y se quitaron alícuotas a 5, 8, 12, 20 y 28 horas.
- 15 Para determinar la expresión de proteasa TEV total, 40 µL del cultivo celular inducido procedente de cada punto temporal se mezcló con un volumen igual de Tampón de Muestra Laemmi 2x y se incubó a 95°C durante 10 minutos. 2 µL de 1 unidad/µL de Benzonasa en MgSO₄ 1 M se añadieron a esta mezcla y se incubaron a 95°C durante 5 minutos. Una alícuota de 15 µL se cargó y separó por electroforesis en gel de poliacrilamida MOPS usando geles de Bis-Tris poliacrilamida prefabricada al 4-12% de NuPAGE® Novex (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA) en condiciones reductoras, desnaturalizantes. El gel se lavó y se fijó en Disolución de Fijación que comprende 10% de metanol, 7% de ácido acético durante 30 minutos. Después de fijar, la Disolución de Fijación se eliminó y el gel se incubó con Tinción de Gel de Proteína SYPRO Ruby a temperatura ambiente durante 3 horas. El gel se destintó entonces en Disolución Destintadora que comprende 10% de metanol, 7% de ácido acético a temperatura ambiente durante 3 horas. La imagen se visualizó con un Reproductor de Imágenes en Modo Variable Typhoon 9410 y software de Análisis de Reproductor de Imágenes (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

- 25 Para determinar la expresión de proteasa TEV soluble, 1,0 mL del cultivo celular inducido se lisó añadiendo 100 µL de una Disolución de Lisis Celular que comprende 1 x reactivo de Lisis Celular FASTBREAK™ (Promega Corp., Madison, WI), NaCl 500 mM, 250 unidades/mL de nucleasa benzonasa (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI), y 1 x Cóctel Inhibidor de Proteasa III (EMD Biosciences-Calbiochem, Gibbstown, NJ) y se incubó a temperatura ambiente durante 25 minutos con formación de vértice constante. El lisato se centrifugó a 4300 rpm durante 15 minutos para hacer bolitas los desechos. 800 µL del sobrenadante se transfirieron a un tubo limpio, al que se añadieron 30 µL de bolitas magnéticas MagneHis y la mezcla se incubó durante 5 minutos con rotación constante. Después de la incubación, las bolitas magnéticas se secuestraron con un soporte magnético, la disolución se eliminó y las bolitas se lavaron tres veces con 150 µL de tampón de lavado que comprende NaCl 500 mM. La proteína se eluyó con 80 µL de tampón de elución, se añadió un volumen igual de 2 x Tampón de Muestra Laemmli, y la mezcla se incubó a 95°C durante 10 minutos. Una alícuota de 15 µL se cargó y separó por electroforesis en gel de poliacrilamida MOPS usando geles de Bis-Tris poliacrilamida prefabricada al 4-12% de NuPAGE® Novex (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA) en condiciones reductoras, desnaturalizantes.

- 30 Los resultados de los experimentos de inducción indicaron que las condiciones de auto-inducción dieron por resultado 5-10 veces más de proteasa TEV expresada respecto a la inducción IPTG. La comparación de la expresión de proteasa TEV total y soluble en el medio de auto-inducción reveló que aunque los tiempos de inducción más largos dieron por resultado más proteína total, la cantidad de proteasa TEV soluble recuperable disminuyó. De hecho, aproximadamente 8 horas de expresión a 37°C dieron la mayor cantidad de proteína soluble. Finalmente, aunque tanto las variantes TEV S219N como TEV S219V mostraron significativamente menos autoproteólisis, la variante TEV S219V mostró más producto truncado a tiempos de inducción prolongados sugiriendo que la variante TEV S219V era más propensa a la autoproteólisis.

- 35 Una vez que las condiciones de crecimiento e inducción se optimizaron usando variantes 9 y 10 de pET29/TEV, la expresión de las once variantes de pET29/TEV se examinaron en paralelo bajo estas condiciones. Los resultados indicaron que el orden de rendimiento aumentado de proteasa TEV soluble, de mayor a menor de los cinco expresantes mayores, fue de las variantes de pET29/TEV 5, 10, 7, 3 y 6. En comparación, la variante 11 de TEV se expresó al menor nivel de todas.

C. Expresión a gran escala y purificación.

- 40 Para comparar rigurosamente los niveles de expresión de proteasa TEV a partir de las cinco primeras variantes pET29/TEV, junto con la variante 11 como un control, en condiciones a gran escala, se inocularon 3,0 mL de medio PA-0,5G que contiene 50 µg/mL de canamicina con una única colonia de células BL21(DE3) que albergan la construcción de expresión adecuada y se hace crecer a 37°C con agitación toda la noche. 250 µL de este cultivo iniciador se usó para inocular 250 mL de ZYP-5052 que contiene 50 µg/mL de canamicina y se hace crecer a 37°C con agitación durante 8 horas. Las células se hicieron bolitas por centrifugado.

- Para lisar células, la bolita de células se suspendió de nuevo en unos 5,0 mL/gramo de bolitas de células de Disolución de Lisis que comprende Reactivo de Extracción de Proteína BUGBUSTER™ (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI), 1 x Conjunto III de Cóctel Inhibidor de proteasa (EMD Biosciences-Calbiochem, Gibbstown, NJ), 25 unidades/mL de nucleasa benzonasa y 1 Unidad/mL de rLisozima (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI). La suspensión de células se incubó a temperatura ambiente en un balancín de soporte durante 20 minutos, seguido por incubación en hielo durante 15 minutos. La suspensión se centrifugó a 4°C durante 30 minutos a 30.350 rcf para hacer bolitas los desechos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Para preparar la bolita de extracto celular insoluble para análisis SDS-PAGE, la bolita se volvió a suspender al volumen original con 1x Reactivo de Extracción de Proteína BUGBUSTER™.
- 10 Para purificar una variante de proteasa TEV por purificación IMAC, el lisato clarificado se mezcló con Resina de Cobalto de Afinidad con Metal Superfluido TALON™ equilibrado con Disolución de Lavado IMAC que comprende fosfato sódico 25 mM, pH 7,0, NaCl 500 mM, 10% de glicerol e imidazol 35 mM. La mezcla lisato-resina se incubó en un balancín de soporte a 4°C durante 1 hora y después se transfirió a un soporte de columna desechable de 20 mL unido a un colector de vacío. La columna se lavó dos veces con cinco volúmenes de columna de Disolución de Lavado IMAC. La proteasa TEV se eluyó desde la resina con dos volúmenes de columna de Disolución de Lavado IMAC, que comprende fosfato sódico 25 mM, pH 7,8, NaCl 500 mM, 10% de glicerol e imidazol 500 mM, y se recogió en fracciones de 1,0 mL. Cada fracción que contiene proteína se identificó mezclando 10 µL de alícuota con 200 µL de reactivo de Tinte Bradford QUICKSTART™. Las fracciones de elución pico se acumularon y se dializaron para purificación por cromatografía de intercambio iónico secundario.
- 15
- 20 Para dializar una variante de proteasa TEV purificada con IMAC, la muestra acumulada que comprende la fracción de elución pico se dializó en un FASTDIALYZER® ajustado con membrana MWCO 25 kD a 4°C en 1 L de un Tampón de Desalado con agitación constante toda la noche. Para la cromatografía de intercambio catiónico, el tampón desalador (Tampón A) comprendía Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.
- 25 Para purificar la variante de proteasa TEV por cromatografía de intercambio catiónico, la disolución de proteína desalada se cargó en una columna de intercambio catiónico UNO-S1 de 1 mL, se pre-equilibró con Tampón A, a un caudal de 0,5 mL/min. La proteína unida se eluyó por gradiente de NaCl con Tampón B que comprende fosfato sódico 25 mM, pH 7,0, NaCl 1 M a un caudal de 1,0 mL/min como sigue: 5% de Tampón B para 3 mL, 20% de Tampón B para 10 mL, 20% a 100% de Tampón B por encima de 10 mL. La elución de proteínas desde la columna se detectó con un detector UV-Visible a 214 nm, 260 nm y 280 nm, y todas las fracciones de pico se acumularon y se determinó la concentración de proteína. Las alícuotas se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. La variante 7 de TEV tenía el rendimiento más alto de proteasa soluble (cerca de 35 mg/L) seguido por la variante 3 (cerca de 24 mg/L) y la variante 10 (cerca de 23 mg/L). Las dos variantes restantes, 5 y 6, tenían rendimientos de 18 y 8 mg/L, respectivamente. El rendimiento de la variante 11 de TEV fue cerca de 0,6 mg/L. Como tal, todas las cinco variantes de TEV primeras que contienen un cambio de aminoácidos que mejora la solubilidad dio por resultado al menos un aumento de 10 veces en proteasa TEV soluble purificada respecto a la variante 11 de TEV que solo comprendía el cambio de aminoácidos que elimina la autoproteólisis (S219N). Cuando se compara el orden de rango de rendimiento de proteasa TEV a partir de estudios de expresión de pequeña y gran escala, la variante 5 mostró el mayor rendimiento en expresiones a pequeña escala (Ejemplo 1C). Sin embargo, fue la variante 7 la que tuvo el rendimiento mayor en expresiones a gran escala. La repetición de la comparación de rendimientos de cargas a gran escala reveló de forma consistente que la variante 7 es la variante de mayor expresión. Como resultado, la variante 7 representó la construcción de proteasa TEV principal y se usó para todos los estudios posteriores descritos en esta memoria.
- 30
- 35
- 40
- 45 Para determinar la actividad proteolítica de las variantes de proteasa TEV, una variante de proteasa TEV, o proteasa AcTEV como un control positivo, se añadió a 30 µL de una Disolución de Reacción que comprendía Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, DTT 1 mM y 2,5 µg de un sustrato TEV y se incubó a 30°C durante 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos. Las reacciones se apagaron añadiendo 2 x Tampón de Muestra Laemmli e incubando la muestra a 95°C durante 10 minutos. Una alícuota de 15 µL se cargó y separó por electroforesis en gel de poliacriloamida MOPS usando geles de Bis-Tris poliacrilamida prefabricada al 4-12% de NuPAGE® Novex (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA) en condiciones reductoras, desnaturalizantes. El gel se lavó y se fijó en Disolución de Fijación que comprende 10% de metanol, 7% de ácido acético durante 30 minutos. Después de la fijación, la Disolución de Fijación se eliminó y el gel se incubó con Tinción de Gel de Proteína SYPRO Ruby a temperatura ambiente durante 3 horas. El gel se destintó entonces en Disolución Destintadora que comprende 10% de metanol, 7% de ácido acético a temperatura ambiente durante 3 horas. La imagen se visualizó con un Reproductor de Imágenes en Modo Variable Typhoon 9410 y se analizó con software de Análisis de Imágenes ImageQuantTL (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La relación de intensidades de sustrato no escindido y producto escindido se usó para calcular el porcentaje de sustrato TEV escindido. Los resultados del ensayo de actividad de proteasa TEV se dan en la Tabla 4.
- 50
- 55

| Tabla 4. Ensayo de Actividad de Proteasa TEV | | | |
|--|------------------------------|------------|-------------|
| Proteasa TEV | Escisión de Sustrato TEV (%) | | |
| | 30 minutos | 60 minutos | 120 minutos |
| AcTEV | 73,9 | 91,6 | 97,2 |
| Variante 3 de TEV | 96,5 | 97,7 | 98,1 |
| Variante 5 de TEV | 95,6 | 97,8 | 95,6 |
| Variante 6 de TEV | 90,8 | 96,8 | 97,2 |
| Variante 7 de TEV | 96,6 | 97,8 | 97,7 |
| Variante 10 de TEV | 74,2 | 93,3 | 96,1 |

Ejemplo 2

Activación intracelular de una toxina clostridial con un sitio de escisión de proteasa TEV usando dos construcciones de expresión diferentes

- 5 El siguiente ejemplo ilustra un procedimiento útil para expresar en una célula una toxina clostridial que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena como se describe en la presente memoria.

A. Construcción de la construcción de expresión pET29/BoNT/A-TEV.

10 Para producir un BoNT/A que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV situado en la región de bucle dicadena, un marco de lectura abierta (SEQ ID NO: 87) que codifica el BoNT/A-TEV deseado (SEQ ID NO: 88) se sintetizó usando procedimientos estándar (BlueHeron Biotechnology, Bothell, WA). Oligonucleótidos complementarios de 20 a 50 bases de longitud, que abarcan el marco de lectura abierto entero de BoNT/A-TEV, se sintetizaron usando síntesis de fosforamidita estándar. Estos oligonucleótidos se hibridaron en dobletes de doble hebra que se ligaron secuencialmente juntos para montar la molécula de polinucleótidos de longitud total. Esta molécula de polinucleótidos se clonó usando métodos de biología molecular estándar en un vector de transporte pUCBHB1 en el sitio *SmaI* para generar las construcciones pUCBHB1/BoNT/A-TEV. La molécula de polinucleótido sintetizada se verificó por secuenciación usando BIG DYE TERMINATOR™ Química 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

20 Para generar la construcción de expresión pET29/BoNT/A-TEV, se digirió pUCBHB1/BoNT/A-TEV con endonucleasas de restricción que 1) escinden la inserción que comprende el marco de lectura abierta que codifica BoNT/A-TEV; y 2) permite a esta inserción estar unida de forma operable a un vector pET29 (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI). Esta inserción se subclonó usando un procedimiento de ADN ligasa T4 en un vector pET29 digerido con las endonucleasas de restricción análogas para dar la construcción de expresión pET29/BoNT/A-TEV apropiada. La mezcla de ligado se transformó en células Acella BL21(DE3) de *E. coli* electrocompetentes (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) por electroporación, se pusieron en platos en platos de agar Luria-Bertani al 1,5% (pH 7,0) que contenían 50 µg/mL de canamicina, y se colocaron en una incubadora a 37°C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen las construcciones de expresión se identificaron como colonias resistentes a la canamicina. Las construcciones candidatas se aislaron usando un procedimiento de mini-preparación de plásmido de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión con endonucleasa de restricción y secuenciando ambas hebras de ADN para confirmar la presencia e integridad de la inserción. Esta estrategia de clonado dio una construcción de expresión pET29 que comprende la molécula de polinucleótido que codifica BoNT/A-TEV unida de forma operable a un péptido de purificación de afinidad de polihistidina carboxilo terminal.

B. Construcción de las construcciones de expresión pET22/TEV.

35 Para generar una construcción de expresión variante de pET22/TEV, se digirió una construcción de expresión de variante 7 de pET29/TEV con endonucleasas de restricción que 1) escinden la inserción que comprende el marco de lectura abierta (SEQ ID NO: 77) que codifica la proteasa TEV (SEQ ID NO: 78); y 2) permite a esta inserción estar unida de forma operable a un vector pET22 (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI). Esta inserción se subclonó usando un procedimiento de ADN ligasa T4 en un vector pET22 digerido con las endonucleasas de restricción análogas para dar la construcción de expresión pET22/TEV apropiada. La mezcla de ligado se transformó en células Acella BL21(DE3) de *E. coli* electrocompetentes (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) por electroporación, se pusieron en platos en platos de agar Luria-Bertani al 1,5% (pH 7,0) que contenían 50 µg/mL de ampicilina, y se colocaron en una incubadora a 37°C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen las

construcciones de expresión se identificaron como colonias resistentes a la ampicilina. Las construcciones candidatas se aislaron usando un procedimiento de mini-preparación de plásmido de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión con endonucleasa de restricción y secuenciando ambas hebras de ADN para confirmar la presencia e integridad de la inserción. Esta estrategia de clonado dio una construcción de expresión pET22 que comprende la molécula de polinucleótido que codifica la variante 7 de TEV unida de forma operable a un péptido de purificación de afinidad de polihistidina amino terminal.

C. Construcción de células que comprenden las construcciones de expresión pET29/BoNT/A-TEV y pET22/TEV.

Para hacer una célula que comprende las construcciones de expresión pET29/BoNT/A-TEV y pET22/TEV, una construcción de expresión pET29/BoNT/A-TEV se transformó en células BL21(DE3) *E. coli* electro-competentes que albergan la construcción de expresión variante 7 de pET22/TEV usando electroporación, se colocó en platos de agar Luria-Bertani al 1,5% (pH 7,0) que contienen 50 µg/mL de ampicilina y 50 µg/mL de canamicina, y se colocaron en una incubadora a 37°C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen ambas construcciones de expresión se identificaron como colonias resistentes a la ampicilina-canamicina. Las construcciones candidatas se aislaron usando un procedimiento de mini-preparación de plásmidos de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión de endonucleasa de restricción para determinar la presencia de ambas construcciones. Esta estrategia de clonado dio células que comprenden construcciones de expresión pET29/BoNT/A-TEV y pET22/TEV.

D. Activación *in situ* de BoNT/A-TEV.

Para producir formas dicadena de BoNT/A-TEV en condiciones de auto-inducción, 3,0 mL de medio PA-0,5G que contiene 50 µg/mL de canamicina y 50 µg/mL de ampicilina se inoculó con una única colonia de células BL21(DE3) que albergan construcciones de expresión pET29/BoNT/A-TEV y pET22/TEV y se hacen crecer a 37°C con agitación toda la noche. Aproximadamente 1,0 µL de este cultivo iniciador se usó para inocular un 1,0 mL de ZYP-5052 que contiene 50 µg/mL de canamicina y 50 µg/mL de ampicilina y se hizo crecer a 37°C con agitación durante 3,5 horas y después a 22°C con agitación durante 18,5 horas. Como un control, células BL21(DE3) que albergan pET29/BoNT/A-TEV solo se hicieron crecer e inducirse como se describe anteriormente, excepto que solo se usaron 50 µg/mL de canamicina como un agente selectivo.

Después del crecimiento e inducción, las células se lisaron y se purificaron por IMAC esencialmente como se describe en el Ejemplo 1B. Las muestras purificadas por IMAC se analizaron mediante SDS-PAGE y los geles se tintaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 1B.

Los resultados indican que cuando pET29/BoNT/A-TEV se expresa solo, una banda de aproximadamente 150 kDa correspondiente a la cadena sencilla de BoNT/A-TEV se detectó bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras. En contraste, cuando BoNT/A-TEV se co-expresó con proteasa TEV, dos bandas se observaron en condiciones reductoras, una de aproximadamente 50 kDa y la otra de aproximadamente 100 kDa. Además, cuando las mismas muestras se hicieron marchar bajo condiciones no reductoras, las bandas de aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 100 kDa desaparecieron y una nueva banda de aproximadamente 150 kDa se observó. Tomadas juntas, estas observaciones indican que las bandas de aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 100 kDa vistas bajo condiciones reductoras corresponden a las cadenas ligera y pesada del BoNT/A-TEV, y que la presencia de estas dos bandas era indicativa de formación de dicadena de BoNT/A-TEV. Así, la co-expresión de BoNT/A-TEV y proteasa TEV en estas células da por resultado la escisión de BoNT/A-TEV en el sitio de escisión de proteasa TEV situado en el bucle dicadena y la posterior formación de la forma dicadena de BoNT/A-TEV.

Para confirmar estos resultados, se hizo una expresión a gran escala de células BL21(DE3) que albergan construcciones de expresión pET29/BoNT/A-TEV y pET22/TEV. 3,0 mL de medio PA-0,5G que contiene 50 µg/mL de canamicina y 50 µg/mL de ampicilina se inoculó con una única colonia de células BL21(DE3) que comprenden construcciones de expresión pET29/BoNT/A-TEV y pET22/TEV y se hizo crecer a 37°C con agitación toda la noche. Aproximadamente 250 µL de este cultivo iniciador se usó para inocular 250 mL de ZYP-5052 que contiene 50 µg/mL de canamicina y 50 µg/mL de ampicilina y se hizo crecer a 37°C con agitación durante 3,5 horas y después a 22°C con agitación durante 18,5 horas. Las células se hicieron bolitas por centrifugado. Las células se lisaron y se purificaron por IMAC como se describe en el Ejemplo 1C.

Para dializar el BoNT/A-TEV purificado con IMAC para cromatografía de intercambio iónico secundario, la muestra acumulada que comprende las fracciones de elución pico se dializaron en un FASTDIALYZER® ajustado con membrana MWCO de 25 kD a 4°C en 1 L de un Tampón de Desalado con agitación constante toda la noche. Para la cromatografía de intercambio aniónico, el tampón de desalado (Tampón A) comprendía Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

Para purificar BoNT/A-TEV por cromatografía de intercambio aniónico, la disolución de proteína desalada se cargó en una columna de intercambio aniónico UNO-Q1 de 1 mL, se pre-equilibró con Tampón A, a un caudal de 0,5 mL/min. La proteína unida se eluyó por gradiente de NaCl con Tampón B que comprende Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 1 M a un caudal de 0,5 mL/min como sigue: 3% de Tampón B para 3 mL, 7% de Tampón B para 10 mL, 7% a 100% de Tampón B por encima de 10 mL. La elución de proteínas de la columna se detectó con un detector UV-Visible a 214 nm, 260 nm y 280 nm, y todas las fracciones de pico se acumularon y la concentración de proteína se

determinó. Las alícuotas se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C . La proteína BoNT/A-TEV purificada se analizó mediante SDS-PAGE y los geles se tintaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 1B. Los resultados confirman los experimentos a pequeña escala iniciales e indican que el BoNT/A-TEV de cadena sencilla se convierte a su forma dicadena con cerca de 100% de eficiencia.

- 5 Para evaluar la actividad de las dicadenas de BoNT/A-TEV, estas toxinas se evaluaron en un ensayo basado en célula y ensayo basado en animal.

Para ensayar la actividad de las dicadenas de BoNT/A-TEV usando un ensayo basado en células, se realizó un ensayo de actividad de BoNT/A inmuno-basado usando ELISA intercalado con ECL múltiplex esencialmente como se describe en la solicitud de patente de Fernández-Salas, et al., *Immuno-Based BoNT/A Activity Assays*, Attorney Docket Núm. 18383 (BOT).

15 Para obtener un lisato de células tratadas con BoNT/A-TEV para análisis, aproximadamente 50.000 células de un cultivo madre de la línea celular SiMa se sembraron en un plato de 96 pocillos de poli-D-lisina que contiene un medio libre de suero que contiene Medio Esencial Mínimo, GlutaMAX™ I 2 mM con sales de Earle, 1 x suplemento B27, 1 x suplemento N2, Aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GTb1. Estas células se incubaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% hasta que las células se diferenciaron, como se evalúa mediante criterios morfológicos estándar y rutinarios, tal como detención de crecimiento y extensión de neurita (aproximadamente 3 días). El medio se aspiró de cada pocillo y se sustituyó con medio fresco que contenía o bien 0 (muestra no tratada), 0,01 nM, 0,04 nM, 0,12 nM, 0,37 nM, 1,11 nM, 3,33 nM y 10,0 nM de un BoNT/A-TEV. Después de un tratamiento de 24 horas, las células se lavaron, incubaron durante unos dos días adicionales sin toxina. Para cosechar las células, el medio se aspiró, se lavó con 1 x PBS, y se lisó añadiendo 30 μl de Tampón de Lisis que comprende HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl_2 1,5 mM, EGTA 1 mM, 1% de Triton X-100 a cada pocillo, y el plato se incubó en un agitador que rota a 500 rpm durante 30 minutos a 4°C . El plato se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C hasta hacer bolitas los desechos celulares y el sobrenadante se transfirió a un plato de 96 pocillos recubierto con anticuerpo de captura para realizar la etapa de detección.

25 Para preparar la disolución de anticuerpo de captura α -SNAP-25, el anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 contenido en las ascitas de la línea celular de hibridoma 2E2A6 se purificó usando un protocolo de purificación de proteína A estándar. Para preparar una disolución de anticuerpo de detección de α -SNAP-25, el anticuerpo policlonal de conejo de α -SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO) se conjugó con reactivo de marcado de éster de NHS de Rutenio (II)-tris-bipiridina-(4-metilsulfonato) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) según las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Para preparar el soporte en fase sólida que comprende el anticuerpo de captura que era específico para un producto escindido de SNAP-25, aproximadamente 5 μL de disolución de anticuerpo monoclonal de α -SNAP-25 de 2E2A6 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en 1 x PBS) se añadió a cada pocillo de un plato MSD de Alta Unión de 96 pocillos y la disolución se dejó secar al aire en una cabina de seguridad biológica durante 2-3 horas para evaporar el líquido de la disolución. Los pocillos unidos al anticuerpo de captura se bloquearon entonces y se usaron directamente para detectar la actividad de BoNT/A.

40 Para detectar la presencia de un producto SNAP-25 escindido por análisis ELISA intercalado con ECL, el Tampón de Bloqueo de los platos almacenados se aspiró, 25 μL de un lisato de células tratadas con BoNT/A se añadió a cada pocillo y los platos se incubaron a 4°C durante 2 hrs. Los pocillos del plato se lavaron tres veces aspirando el lisato celular y enjuagando cada pocillo tres veces con 200 μL 1 x PBS, 0,1% de TWEEN-20® (monolaureato de polioxietileno (20) sorbitano). Después de lavar, 25 μl de disolución de anticuerpo de detección α -SNAP-25 de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que comprende 2% de Reactivo de Bloqueo Amersham en 1 x PBS, 0,1% de TWEEN-20® (monolaureato de polioxietileno (20) sorbitano) se añadió a cada pocillo, el plato se selló, y el plato sellado se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Después de la incubación del anticuerpo de detección α -SNAP-25, los pocillos se lavaron tres veces con 200 μL 1 x PBS, 0,1% de TWEEN-20® (monolaureato de polioxietileno (20) sorbitano). Los datos en bruto obtenidos a partir del reproductor de imágenes ECL se transfirieron entonces a SigmaPlot v. 9.0 y un ajuste logístico de 4 parámetros se usó para definir las curvas de dosis-respuesta. No hubo limitaciones usadas para la función logística de 4 parámetros cuando se trazaron los datos. Se generaron presentaciones gráficas usando el siguiente análisis: R2 (coeficiente de correlación), a (Max para conjunto de datos), b (pendiente), y $X0 \pm \text{EE}$ (valor $\text{EC}_{50} \pm$ error estándar). Los resultados de dos marchas independientes indican que la actividad de ambas dicadenas fue casi idéntica y de 2 veces de la dicadena nativa.

55 Para ensayar la actividad de las dicadenas de BoNT/A-TEV que usan un ensayo basado en animal, se llevó a cabo un ensayo de Puntuación de Abducción Digital (DAS) *in vivo*. Ratones Fe CD-1 se pesaron y se colocaron en subconjuntos de 10 animales para cada ensayo DAS discreto. Los ratones se incluyeron en un subconjunto particular basado en los siguientes criterios: 1) buena salud; 2) respuesta DAS de línea base robusta de 0; 3) inclusión en un intervalo medio de peso de $X \pm 2$ g estabilizado para el subconjunto seleccionado y 4) peso mayor que 17,0 g.

60 Cada ratón se inyectó con 5 μL de una de siete dosis diferentes de BoNT/A-TEV (0,01 nM, 0,04 nM, 0,12 nM, 0,37 nM, 1,11 nM, 3,33 nM y 10,0 nM) con una aguja de calibre 30 en el músculo gastrocnemio de la pata trasera derecha. Como un control, el músculo gastrocnemio de la pata trasera izquierda se inyectó con 5 μL de una disolución que no contenía nada de BoNT/A-TEV. Se observaron a los ratones para la respuesta DAS de forma

consecutiva durante los primeros 4 días. El DAS se leyó elevando a cada ratón por la cola y observando de forma precisa las patas traseras inyectadas. La abducción o no abducción de los dedos traseros revela el efecto de la parálisis debido a la toxina de ensayo inyectada en el músculo. La abducción del dedo de la pata trasera inyectada se comparó con la de la pata trasera no inyectada y se puntuó en consecuencia. El dato DAS se analizó calculando la dosis ED₅₀ en base a la puntuación DAS media del pico y AUC (área bajo la curva) en términos de u/Kg y/o ng/Kg. Esto se realizó como sigue: 1) la puntuación DAS media del pico para cada dosis se calculó en cada estudio; 2) cualquier dosis que obtuvo más de cinco muertes en cada estudio se eliminó de la consideración; 3) la mayor dosis usada en un estudio individual dado fue la menor dosis que obtuvo un pico promedio de 4,0; 4) la menor dosis usada en un estudio individual dado fue la mayor dosis que obtuvo un pico promedio de 0; 5) las curvas se construyeron para cada estudio individual de DAS de pico promedio frente a log (dosis); 6) un valor AUC se calculó para cada grupo de 10 ratones de los múltiples grupos en algunos estudios; 7) las curvas se construyeron para cada estudio individual de AUC promedio frente a log (dosis); 8) una curva de respuesta de replicado x, y se construyó para cada conjunto de estudios idénticos múltiples; para cada toxina de ensayo; 9) los datos de dosis-respuesta se analizaron por regresión no lineal (no pesada) usando una ecuación logística de tres parámetros (Sigma Plot v 8.0; SPSS Science, Chicago, Illinois) usando la siguiente ecuación:

$$y = a/(1 + (x/x_0)^b)$$

donde y es la respuesta, a es la y_{max} asintótica, b es la pendiente, x es la dosis, y x₀ es la dosis ED₅₀. Para determinaciones de ED₅₀ de pico, Y_{max} se puso a 4 (lectura DAS máxima en escala). Los valores de ED₅₀ medio (pico y/o AUC) se informatizaron para cada estudio de ocho dosis realizado.

Los resultados de dos marchas independientes indican que el nivel de actividad de ambas dicadenas fue casi idéntico y en 2 veces de la dicadena nativa. Tomados juntos, los datos del ensayo basado en célula y el ensayo DAS indican que el proceso de activación intracelular de rBoNT/A dicadena que no solo fue comparable estructuralmente al material cortado *in vitro* sino también funcionalmente indistinguible.

Ejemplo 3

Activación intracelular de una toxina clostridial con un sitio de escisión de proteasa TEV usando dos construcciones de expresión diferentes bajo el control de promotores independientes

El siguiente ejemplo ilustra un procedimiento útil para expresar en una célula una toxina clostridial que comprende una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena como se describe en la presente memoria. En este caso, la formación de la forma dicadena de la toxina está regulada por proteasa TEV bajo control de un promotor independiente.

A. Construcción de la construcción de expresión pBAD/TEV.

Para producir una proteasa TEV de forma recombinante, cuya expresión estaba bajo control de un promotor de arabinosa (P_{BAD}), el marco de lectura abierta que codifica la variante 7 de proteasa TEV (Tabla 3 [130]), menos una etiqueta His N terminal, se clonó en el vector de expresión pBAD/Myc-HisA para construir pBAD/TEV. Para construir pBAD/TEV, un marco de lectura abierta que codifica la variante 7 de proteasa TEV (SEQ ID NO: 106), menos una etiqueta de polihistidina N terminal, se sintetizó usando procedimientos estándar (BlueHeron Biotechnology, Carlsbad, CA). El fragmento sintético se flanqueó además por sitios de restricción para permitir que esta inserción se una de forma operable a un vector pBAD/Myc-HisA (Life Technologies, Madison, WI). Usando un procedimiento de ADN ligasa T4 esta inserción se ligó direccionalmente en un vector pBAD/Myc-HisA digerido con las mismas endonucleasas de restricción en el sitio de clonado múltiple. La mezcla de ligado se transformó en células Acella BL21(DE3) de *E. coli* electrocompetentes (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) por electroporación, se pusieron en platos en platos de agar Luria-Bertani al 1,5% (pH 7,0) que contenían 50 µg/mL de ampicilina, y se colocaron en una incubadora a 37°C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen las construcciones de expresión se identificaron como colonias resistentes a la ampicilina. Las construcciones candidatas se aislaron usando un procedimiento de mini-preparación de plásmido de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión con endonucleasas de restricción y secuenciación de ambas hebras de ADN para confirmar la presencia e integridad de la inserción génica de TEV. Esta estrategia de clonado dio una construcción de expresión pBAD/TEV que comprende la molécula de polinucleótido que codifica la variante 7 de TEV libre de un péptido de purificación de afinidad de polihistidina.

B. Construcción de células que comprenden las construcciones de expresión pET29/BoNT/A-TEV y pBAD/TEV.

Para hacer una célula que comprende las construcciones de expresión pET29/BoNT/A-TEV y pBAD/TEV, una construcción de expresión pET29/BoNT/A-TEV (descrita en el Ejemplo 2A) se transformó en células BL21(DE3) *E. coli* electro-competentes que albergan la construcción de expresión de variante 7 de pBAD/TEV usando electroporación, se colocaron en platos en platos de agar Luria-Bertani al 1,5% (pH 7,0) que contienen 50 µg/mL de ampicilina y 50 µg/mL de canamicina, y se colocaron en una incubadora a 37°C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen ambas construcciones de expresión se identificaron como colonias resistentes a la ampicilina-canamicina. Las construcciones candidatas se aislaron usando un procedimiento de mini-preparación de plásmidos de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión de endonucleasa de restricción para determinar

la presencia de ambas construcciones. Esta estrategia de clonado dio células que comprenden construcciones de expresión pET29/BoNT/A-TEV y pBAD/TEV.

C. Activación *in situ* de BoNT/A-TEV.

5 Para producir formas dicadena de BoNT/A-TEV en condiciones de auto-inducción, 3,0 mL de medio PA-0,5G que contiene 50 µg/mL de canamicina y 50 µg/mL de ampicilina se inoculó con una única colonia de células BL21(DE3) que albergan las construcciones de expresión pET29/BoNT/A-TEV y pBAD/TEV y se hicieron crecer a 37°C con agitación toda la noche. 250 µL de este cultivo iniciador se usó para inocular 250 mL de ZYP-5052 que contiene 50 µg/mL de canamicina y 100 µg/mL de ampicilina y se hizo crecer a 37°C con agitación durante 8 horas y después a 22°C con agitación durante 14 horas. En este punto, la expresión TEV se indujo con 0,2% de L-arabinosa y el cultivo se hizo crecer durante 4 horas adicionales a 22°C. Como un control, células BL21(DE3) que albergan pET29/BoNT/A-TEV solo se hicieron crecer e inducirse como se describe anteriormente, excepto que se usó solo 50 µg/mL de canamicina como un agente selectivo.

15 Después del crecimiento e inducción, las células se lisaron y purificaron por IMAC esencialmente como se describe en el Ejemplo 1C. Para dializar el BoNT/A-TEV purificado con IMAC para cromatografía de intercambio iónico secundario, la muestra acumulada que comprende las fracciones de elución pico se dializaron en un FASTDIALYZER® ajustado con membrana MWCO de 25 kDa a 4°C en 1 L de un Tampón de Desalado con agitación constante toda la noche. Para la cromatografía de intercambio aniónico, el tampón de desalado (Tampón A) comprendía Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

20 Para purificar BoNT/A-TEV por cromatografía de intercambio aniónico, la disolución de proteína desalada se cargó en una columna de intercambio aniónico UNO-Q1 de 1 mL, se pre-equilibró con Tampón A, a un caudal de 0,5 mL/min. La proteína unida se eluyó por gradiente de NaCl con Tampón B que comprende Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 1 M a un caudal de 0,5 mL/min como sigue: 3% de Tampón B para 3 mL, 7% de Tampón B para 10 mL, 7% a 100% de Tampón B por encima de 10 mL. La elución de proteínas de la columna se detectó con un detector UV-Visible a 214 nm, 260 nm y 280 nm, y todas las fracciones de pico se acumularon y se determinó la concentración de proteína.

25 La proteína BoNT/A-TEV purificada se analizó mediante SDS-PAGE y los geles se tintaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 1B. Los resultados indican que cuando pET29/BoNT/A-TEV se expresa solo, una banda de aproximadamente 150 kDa correspondiente a la cadena sencilla de BoNT/A-TEV se detectó bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras. En contraste, cuando BoNT/A-TEV se co-expresó con proteasa TEV bajo el control del promotor P_{BAD} e se indujo con arabinosa, se observaron dos bandas bajo condiciones reductoras, una de aproximadamente 50 kDa y la otra de aproximadamente 100 kDa. Además, cuando las mismas muestras se hicieron marchar bajo condiciones no reductoras, las bandas de aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 100 kDa desaparecieron y una nueva banda de aproximadamente 150 kDa se observó. Tomadas juntas, estas observaciones indican que las bandas de aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 100 kDa vistas bajo condiciones reductoras corresponden a las cadenas ligera y pesada del BoNT/A-TEV, y que la presencia de estas dos bandas era indicativa de formación de dicadena de BoNT/A-TEV. Así, la co-expresión de BoNT/A-TEV y proteasa TEV en estas células da por resultado la escisión de BoNT/A-TEV en el sitio de escisión de proteasa TEV situado en el bucle dicadena y la posterior formación de la forma dicadena de BoNT/A-TEV. Los resultados indican que entre el 90-95% del BoNT/A-TEV de cadena sencilla se convierte a su forma dicadena.

40 Ejemplo 4

Activación intracelular de una toxina clostridial con un sitio de escisión de proteasa TEV usando una construcción de expresión dual

El siguiente ejemplo ilustra métodos útiles para purificar y cuantificar una toxina clostridial que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena como se describe en la presente memoria.

45 A. Construcción de la construcción de expresión dual pET29/BoNT/A-TEV/2xTEV.

Para construir la construcción de expresión dual pET29/BoNT/A-TEV/2xTEV, un fragmento sintético (SEQ ID NO: 89) que codifica los últimos 37 aminoácidos de BoNT/A-TEV además de los elementos de transcripción (promotor T7, sitio operador lac) y traducción (RBS) necesarios para la expresión de *E. coli* y la región de codificación entera de la variante 7 de TEV se sintetizó usando procedimientos estándar (BlueHeron Biotechnology, Bothell, WA). Oligonucleótidos complementarios de 20 a 50 bases de longitud, se sintetizaron usando síntesis de fosforamidita estándar. Estos oligonucleótidos se hibridaron en dobletes de doble hebra que se ligaron secuencialmente juntos para montar la molécula de polinucleótido de longitud total. Esta molécula de polinucleótido se clonó usando métodos de biología molecular estándar en un vector de transporte pUCBHB1 en el sitio *SmaI* para generar el plásmido pUCBHB1/BoNT/A-TEV_C-terminal/T7Prom/TEV. La molécula de polinucleótido sintetizada se verificó por secuenciación usando BIG DYE TERMINATOR™ Química 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Para generar la construcción de expresión pET29/BoNT/A-TEV/2xTEV, se digirió pUCBHB1/BoNT/A-TEV_C-terminal/T7Prom/TEV con endonucleasas de restricción que 1) escinden la inserción que comprende el extremo C de BoNT/A-TEV, motivos de transcripción y traducción necesarios para la expresión en *E. coli* de un segundo marco de lectura abierta, y la región de codificación entera de la variante 7 de TEV; y 2) permiten que esta inserción se una de forma operable detrás del gen BoNT/A en el vector pET29/BoNT/A-TEV del Ejemplo 1A. Esta inserción se subclonó usando procedimiento de ADN ligasa T4 en el vector pET29/BoNT/A-TEV digerido con las endonucleasas de restricción análogas para dar la construcción de expresión dual pET29/BoNT/A-TEV/2xTEV apropiada que comprende los marcos de lectura abierta de BoNT/A-TEV y variante 7 de proteasa TEV con los elementos de transcripción y traducción intercalados de SEQ ID NO: 89. La mezcla de ligado se transformó en células Acella BL21(DE3) de *E. coli* electrocompetentes (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) por electroporación, se pusieron en platos en platos de agar Luria-Bertani al 1,5% (pH 7,0) que contenían 50 µg/mL de canamicina, y se colocaron en una incubadora a 37°C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen las construcciones de expresión se identificaron como colonias resistentes a la canamicina. Las construcciones candidatas se aislaron usando un procedimiento de mini-preparación de plásmido de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión con endonucleasa de restricción y secuenciando ambas hebras de ADN para confirmar la presencia e integridad de la inserción. Esta estrategia de clonado dio una construcción de expresión dual pET29 que comprende la molécula de polinucleótido que codifica una variante de BoNT/A-TEV unida de forma operable a una etiqueta de purificación de afinidad de polihistidina carboxilo terminal y una proteasa TEV. La organización del marco de lectura abierta fue tal que la iniciación de transcripción desde el primer promotor T7 dio un ARNm con el marco de lectura abierta que codifica BoNT/A-TEV y el marco de lectura abierta que codifica la proteasa TEV. Además, la iniciación de la transcripción a partir del segundo promotor T7 da ARNm con el marco de lectura abierto que codifica solo la proteasa TEV. Así, habría dos veces tantas transcripciones que codifican la proteasa TEV en comparación con BoNT/A-TEV.

B. Activación in situ de BoNT/A-TEV a partir de pET29/BoNT/A-TEV/2xTEV.

Para producir formas dicadena de BoNT/A-TEV en condiciones de auto-inducción, 3,0 mL de medio PA-0,5G que contiene 50 µg/mL de canamicina se inoculó con una única colonia de células BL21(DE3) que comprende la construcción de expresión dual pET29/BoNT/A-TEV y se hizo crecer a 37°C con agitación toda la noche. Aproximadamente 250 µL de este cultivo iniciador se usó para inocular 250 mL de ZYP-5052 que contiene 50 µg/mL de canamicina y se hizo crecer a 37°C con agitación durante 3,5 horas y después a 22°C con agitación durante 18,5 horas. Las células se hicieron bolitas por centrifugado. Las células se lisaron, purificaron con IMAC, desalaron, purificaron por cromatografía de intercambio aniónico, analizaron por SDS-PAGE, y los geles se tintaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 2D. Como un control, las células BL21(DE3) que albergan pET29/BoNT/A-TEV solo se hicieron crecer e inducirse como se describe anteriormente, excepto que se usó solo 50 µg/mL de canamicina como un agente selectivo.

Los resultados indican que cuando se expresó solo, una banda de aproximadamente 150 kDa correspondiente a la cadena sencilla de BoNT/A-TEV se detectó bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras. En contraste, cuando BoNT/A-TEV se co-expresó con proteasa TEV, se observaron dos bandas en condiciones reductoras, una de aproximadamente 50 kDa y la otra de aproximadamente 100 kDa. Además, cuando las mismas muestras se hicieron marchar bajo condiciones no reductoras, las bandas de aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 100 kDa desaparecieron y se observó una nueva banda de aproximadamente 150 kDa. Tomadas juntas, estas observaciones indican que las bandas de aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 100 kDa vistas bajo condiciones reductoras corresponden a las cadenas ligera y pesada del BoNT/A-TEV, y que la presencia de estas dos bandas era indicativa de formación de dicadena de BoNT/A-TEV. Los resultados también indicaron que el BoNT/A-TEV de cadena sencilla se convirtió a su forma dicadena con más del 95% de eficiencia. Así, la co-expresión de BoNT/A-TEV y proteasa TEV a partir de una construcción de expresión dual en estas células da por resultado la escisión de BoNT/A-TEV en el sitio de escisión de proteasa TEV situado en el bucle dicadena y la posterior formación de la forma dicadena de BoNT/A-TEV.

C. Construcción de las construcciones de expresión dual pRSFdueto/TEV/2xBoNT/A-TEV.

Para determinar si la inversión de la organización de los marcos de lectura abierta que codifican BoNT/A-TEV y la proteasa TEV afectaría el rendimiento y la eficiencia de escisión de BoNT/A-TEV, se hizo una construcción de expresión dual donde la iniciación de transcripción desde el primer promotor T7 da un ARNm con los marcos de lectura abierta que codifican TEV y BoNT/A-TEV y la iniciación de transcripción a partir del segundo promotor T7 da ARNm con el marco de lectura abierta que codifica solo BoNT/A-TEV. Así, habría dos veces tantos ARNm que codifican BoNT/A-TEV en comparación con proteasa TEV.

Para construir la construcción de expresión dual pRSFdueto/TEV/2xBoNT/A-TEV, se realizaron dos reacciones de clonación secuenciales. Primero, el marco de lectura abierta (SEQ ID NO: 91) que codifica la variante 7 de TEV (SEQ ID NO: 22) se amplificó por PCR a partir de la construcción de expresión de variante 7 de pET29/TEV. El extremo 5' del marco de lectura abierta que codifica la etiqueta de afinidad con poli-histidina se excluyó de la amplificación para codificar una proteasa sin etiqueta. Después de la amplificación, el producto de PCR se digirió en los sitios de restricción única, se incorporó a los extremos del producto de PCR por medio de los cebadores de PCR, y se clonó en los sitios correspondientes en MCS1 (sitio de clonación múltiple) del plásmido de expresión dual

pRSFdueto-1 (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI) usando un procedimiento de ADN ligasa T4. Esta construcción intermedia se designó pRSdueto/TEV. Después, una construcción de expresión de pET29/BoNT-A/TEV se digirió con endonucleasas de restricción que 1) escinden la inserción que comprende el marco de lectura abierta (SEQ ID NO: 87) que codifica el BoNT/A-TEV (SEQ ID NO: 88); y 2) permiten que esta inserción esté unida de forma operable al MCS2 en pRSFdueto/TEV. La inserción BoNT/A-TEV se subclonó en el MCS2 del vector pRSFdueto usando un procedimiento de ADN ligasa T4 para dar la construcción de expresión dual pRSFdueto/TEV/2xBoNT/A-TEV apropiada. Esta estrategia de clonado dio una construcción de expresión dual pRSFdueto donde la transcripción a partir del primer promotor T7 produciría ARNm que codifican TEV y BoNT/A-TEV y la transcripción del segundo promotor T7 produciría ARNm que codificaría solo BoNT/A-TEV.

Esta estrategia de clonado dará una construcción de expresión dual de pRSFdueto donde el primer promotor T7 transcribirá el marco de lectura abierta que codifica BoNT/A-TEV y el segundo promotor T7 transcribirá el marco de lectura abierta que codifica proteasa TEV.

D. Construcción de la construcción de expresión dual pET29/BoNT/A-TEV/TEV.

Para determinar los rendimientos de BoNT/A-TEV y la eficiencia de conversión a dicadena a partir de una configuración de unidad de transcripción donde BoNT/A-TEV y TEV podrían solo producirse a partir de sus propios ARNm independientes, se construyó pET29/BoNT/A-TEV/TEV. Para generar la construcción de expresión dual pET29/BoNT/A-TEV/TEV, un corto fragmento de ADN sintético se usó para incorporar un sitio terminador T7 (SEQ ID NO: 92) en la secuencia intercalada entre los marcos de lectura abierta de BoNT/A-TEV y TEV en la construcción de expresión dual pET29/BoNT/A-TEV/2xTEV (Ejemplo 3A anterior). Usando un procedimiento de ADN ligasa T4, esto se consiguió esencialmente intercambiando la región intercalada en pET29/BoNT/A-TEV/2xTEV que carecía de un sitio de terminación T7 con un fragmento de ADN sintético que alberga los elementos de transcripción y traducción intercalados junto con un sitio de terminación T7 de SEQ ID NO: 93. La construcción de expresión dual resultante, designada como pET29/BoNT/A-TEV/TEV, comprende la molécula de polinucleótido que codifica una variante de BoNT/A-TEV unida de forma operable a una etiqueta de afinidad de polihistidina carboxilo terminal y proteasa TEV, transcrita a partir de los promotores T7 primero y segundo, respectivamente.

E. Activación in situ de BoNT/A-TEV.

El crecimiento e inducción de formas dicadena de BoNT/A-TEV en condiciones de auto-inducción se hizo esencialmente como se describe en el Ejemplo 2D, excepto que se usaron las células BL21(DE3) que comprenden una construcción de expresión dual pET29/BoNT/A-TEV/2xTEV, una construcción de expresión dual pRSF/TEV/2xBoNT/A-TEV o una construcción de expresión dual pET29/BoNT/A-TEV/TEV y colonias sencillas de cada una de estas líneas celulares se usaron para inocular cuatro cultivos de 1,0 mL en paralelo. Después del crecimiento y la inducción, los cuatro replicados de 1,0 mL se acumularon juntos para el procesado. Las células se lisaron y purificaron por IMAC y se analizaron mediante SDS-PAGE y los geles se tizaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 1B. Como un control, las células BL21(DE3) que albergan pET29/BoNT/A-TEV solo se hicieron crecer e inducirse como se describe anteriormente, excepto que se usó solo 50 µg/mL de canamicina como un agente selectivo. Los resultados indican que BoNT/A-TEV se expresó a niveles muy comparables a partir de células que contienen cualquiera de las tres construcciones de expresión dual; sin embargo, la extensión de la conversión a dicadena varió. El BoNT/A-TEV de cadena sencilla se convirtió a su forma de dicadena con cerca de 96% de eficiencia cuando las proteínas se expresaron a partir de pET29/BoNT/A-TEV/2xTEV, con cerca de 81% de eficiencia cuando las proteínas se expresaron a partir de pET29/BoNT/A-TEV/TEV, y con más de 99% de eficiencia cuando las proteínas se expresaron a partir de pRSFdueto/TEV/2xBoNT/A-TEV.

Ejemplo 5

Activación intracelular de una proteína que comprende un dominio de unión opioide al sitio de escisión de proteasa TEV integrada usando una construcción de expresión dual.

El siguiente ejemplo ilustra métodos útiles para purificar y cuantificar cualquiera de las proteínas que comprenden un bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena descrito en la presente memoria.

A. Construcción de la construcción de expresión dual pRSFdueto/TEV/2xNociLHN/A-TEV.

Para construir una construcción de expresión dual pRSFdueto/TEV/2xNociLHN/A-TEV, se digirió una construcción de expresión pET29/NociLHN/A-TEV con endonucleasas de restricción que 1) escinden la inserción que comprende el marco de lectura abierta (SEQ ID NO: 94) que codifica el NociLHN/A-TEV (SEQ ID NO: 95); y 2) permiten a esta inserción unirse de forma operable al MCS2 de pRSFdueto/TEV, un vector pRSFdueto-1 que alberga la variante 7 de TEV en MCS1 (Descrito en el Ejemplo 3C). La inserción NociLHN/A-TEV se subclonó en el MCS2 de la construcción pRSFdueto/TEV usando un procedimiento de ADN ligasa T4 para dar la construcción de expresión dual pRSFdueto/TEV/2xNociLHN/A-TEV apropiada. La mezcla de ligado se transformó en células Acella BL21(DE3) de *E. coli* electrocompetentes (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) por electroporación, se pusieron en platos en platos de agar Luria-Bertani al 1,5% (pH 7,0) que contenían 50 µg/mL de canamicina, y se colocaron en una incubadora a 37°C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen las construcciones de expresión se identificaron como colonias resistentes a la canamicina. Las construcciones candidatas se aislaron usando un

procedimiento de mini-preparación de plásmido de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión con endonucleasas de restricción y secuenciando ambas hebras de ADN para confirmar la presencia e integridad de la inserción. Esta estrategia de clonado dio una construcción de expresión dual pRSFdueto donde la transcripción a partir del primer promotor T7 produciría ARNm que codifican TEV y NociLHN/A-TEV y la transcripción a partir del segundo promotor T7 produciría ARNm que codifican solo NociLHN/A-TEV.

B. Activación in situ de NociLHN/A-TEV.

Para producir formas dicadena de NociLHN/A-TEV en condiciones de auto-inducción, 3,0 mL de medio PA-0,5G que contiene 50 µg/mL de canamicina se inoculó con una única colonia de células BL21(DE3) que comprende la construcción de expresión dual pRSFdueto/TEV/2xNociLHN/A-TEV y se hace crecer a 37°C con agitación toda la noche. 250 µL de este cultivo iniciador se usó para inocular 250 mL de ZYP-5052 que contiene 50 µg/mL de canamicina y se hace crecer a 37°C con agitación durante 8 horas y después a 16°C con agitación durante 18 horas. Las células se hicieron bolitas por centrifugado. Las células se lisaron, se purificaron con IMAC, se desalaron, se purificaron por cromatografía de intercambio aniónico, se analizaron por SDS-PAGE, y los geles se tintaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 2D. Como control, células BL21(DE3) que albergan NociLHN/A-TEV solo se hicieron crecer y se indujeron como se describe anteriormente.

Los resultados indican que cuando se expresa solo, una banda de aproximadamente 102 kDa correspondiente a la cadena sencilla de NociLHN/A-TEV se detectó bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras. En contraste, cuando NociLHN/A-TEV se co-expresó con proteasa TEV, dos bandas se observaron en condiciones reductoras, una de aproximadamente 50,8 kDa y la otra de aproximadamente 51,3 kDa. Además, cuando las mismas muestras se hicieron marchar bajo condiciones no reductoras, las bandas de aproximadamente 50,8 kDa y aproximadamente 51,3 kDa desaparecieron y una nueva banda de aproximadamente 102 kDa se observó. Tomadas juntas, estas observaciones indican que las bandas de aproximadamente 50,8 kDa y aproximadamente 51,3 kDa vistas en condiciones reductoras respectivamente corresponden al dominio enzimático de toxina clostridial y el dominio de translocación de toxina clostridial con el resto de señalización de nociceptina unido a su extremo amino. La presencia de estas dos bandas era indicativo de formación de dicadena de NociLHN/A-TEV y que la cadena sencilla de NociLHN/A-TEV se convirtió a su forma dicadena con más del 95% de eficiencia. Así, la co-expresión de NociLHN/A-TEV y proteasa TEV a partir de una construcción de expresión dual en estas células da por resultado la escisión de NociLHN/A-TEV en el sitio de escisión de proteasa TEV situado en el dominio de unión opioide al sitio de escisión de proteasa TEV integrado y la posterior formación de la forma dicadena de NociLHN/A-TEV.

C. Construcción de la construcción de expresión dual pRSFdueto/TEV/2xDynLHN/A-TEV.

La construcción de expresión dual pRSFdueto/TEV/2xDynLHN/A-TEV se generó casi exactamente como pRSFdueto/TEV/2xNociLHN/A-TEV. Una construcción de expresión pET29/DynLHN/A-TEV se digirió con endonucleasas de restricción que 1) escinden la inserción que comprende el marco de lectura abierta (SEQ ID NO: 96) que codifica el DynLHN/A-TEV (SEQ ID NO: 97); y 2) permiten que esta inserción se una de forma operable al MCS2 de pRSFdueto/TEV (Descrito en el Ejemplo 3C). La inserción DynLHN/A-TEV se subclonó en el MCS2 de la construcción pRSFdueto/TEV usando un procedimiento de ADN ligasa T4 para dar la construcción de expresión dual pRSFdueto/TEV/2xDynLHN/A-TEV apropiada. La mezcla de ligado se transformó en células Acella BL21(DE3) de *E. coli* electrocompetentes (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) por electroporación, se pusieron en platos de agar Luria-Bertani al 1,5% (pH 7,0) que contenían 50 µg/mL de canamicina, y se colocaron en una incubadora a 37°C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen las construcciones de expresión se identificaron como colonias resistentes a la canamicina. Las construcciones candidatas se aislaron usando un procedimiento de mini-preparación de plásmido de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión con endonucleasas de restricción y secuenciando ambas hebras de ADN para confirmar la presencia e integridad de la inserción. Esta estrategia de clonado dio una construcción de expresión dual pRSFdueto donde la transcripción a partir del primer promotor T7 produciría ARNm que codifica TEV y DynLHN/A-TEV y la transcripción a partir del segundo promotor T7 produciría ARNm que codifica solo DynLHN/A-TEV.

D. Activación in situ de DynLHN/A-TEV.

Para producir formas dicadena de NociLHN/A-TEV en condiciones de auto-inducción, 3,0 mL de medio PA-0,5G que contiene 50 µg/mL de canamicina se inoculó con una única colonia de células BL21(DE3) que comprende la construcción de expresión dual pRSFdueto/TEV/2xDynLHN/A-TEV y se hicieron crecer a 37°C con agitación toda la noche. 250 µL de este cultivo iniciador se usó para inocular 250 mL de ZYP-5052 que contiene 50 µg/mL de canamicina y se hizo crecer a 37°C con agitación durante 8 horas y después a 16°C con agitación durante 18 horas. Las células se hicieron bolitas por centrifugado. Las células se lisaron, se purificaron con IMAC, se desalaron, se purificaron por cromatografía de intercambio aniónico, se analizaron por SDS-PAGE, y los geles se tintaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 2D. Como control, células BL21(DE3) que albergan DynLHN/A-TEV solo se hicieron crecer y se indujeron como se describe anteriormente.

Los resultados indican que cuando se expresa solo, una banda de aproximadamente 102 kDa correspondiente a la cadena sencilla de DynLHN/A-TEV se detectó bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras. En contraste, cuando DynLHN/A-TEV se co-expresó con proteasa TEV, dos bandas se observaron en condiciones reductoras, una

de aproximadamente 50,8 kDa y la otra de aproximadamente 52 kDa. Además, cuando las mismas muestras se hicieron marchar bajo condiciones no reductoras, las bandas de aproximadamente 50,8 kDa y aproximadamente 52 kDa desaparecieron y una nueva banda de aproximadamente 102 kDa se observó. Tomadas juntas, estas observaciones indican que la banda de aproximadamente 50,8 kDa corresponde al dominio enzimático de toxina clostridial y una banda de aproximadamente 52 kDa corresponde al dominio de translocación de toxina clostridial con el resto de señalización de dinorfina unido a su extremo amino. La presencia de estas dos bandas era indicativo de formación de dicadena de DynLHN/A-TEV y también que la cadena sencilla de DynLHN/A-TEV se convirtió a su forma dicadena con más del 95% de eficiencia. Así, la co-expresión de DynLHN/A-TEV y proteasa TEV a partir de una construcción de expresión dual en estas células da por resultado la escisión de DynLHN/A-TEV en el sitio de escisión de proteasa TEV situado en el dominio de unión opioide al sitio de escisión de proteasa TEV integrado y la posterior formación de la forma dicadena de DynLHN/A-TEV.

Ejemplo 6

Activación intracelular de una proteína que comprende un dominio de unión de galanina al sitio de escisión de proteasa TEV integrado usando dos construcciones de expresión diferentes.

El siguiente ejemplo ilustra métodos útiles para purificar y cuantificar cualquiera de las proteínas que comprende un bucle dicadena que comprende un dominio de unión opioide al sitio de escisión de proteasa TEV integrado descrito en la presente memoria donde la proteína diana y la proteasa se expresan a partir de plásmidos separados y bajo control de diferentes promotores.

A. Construcción de la construcción de expresión pET29/GalLHN/A-TEV.

Para construir la construcción de expresión pET29/GalLHN/A-TEV, una construcción de expresión pET29/DynLHN/A-TEV se digirió primero con endonucleasas de restricción para escindir un segmento de ADN que codifica el bucle dicadena que comprende el dominio de unión a dinorfina al sitio de escisión de proteasa TEV integrado. El fragmento de marco pET29/LHN/A resultante se ligó con un fragmento de ADN sintético encorchetado con los sitios de restricción compatibles (SEQ ID NO: 98), que comprende el bucle dicadena que comprende un dominio de unión de galanina al sitio de escisión de proteasa TEV integrado (SEQ ID NO: 99). La mezcla de ligado se transformó en células *Acella* BL21(DE3) de *E. coli* electrocompetentes (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) por electroporación, se pusieron en platos de agar Luria-Bertani al 1,5% (pH 7,0) que contenían 50 µg/mL de canamicina, y se colocaron en una incubadora a 37°C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen las construcciones de expresión se identificaron como colonias resistentes a la canamicina. Las construcciones candidatas se aislaron usando un procedimiento de mini-preparación de plásmido de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión con endonucleasas de restricción y secuenciando ambas hebras de ADN para confirmar la presencia e integridad de la inserción. Esta estrategia de clonado dio la construcción de expresión pET29/GalLHN/A-TEV que comprende el marco de lectura abierta (SEQ ID NO: 100) que codifica la GalLHN/A-TEV (SEQ ID NO: 101) en cuya expresión de GalLHN/A-TEV está bajo control del promotor T7.

B. Construcción de la construcción de expresión pColdIV/TEV.

Para generar una construcción de expresión en que TEV está bajo control del promotor de choque frío (*csp*), el marco de lectura abierta (SEQ ID NO: 91) que codifica la variante 7 de TEV (SEQ ID NO: 22) se amplificó por PCR a partir de la construcción de expresión de variante 7 de pET29/TEV. El extremo 5' del marco de lectura abierta que codifica la etiqueta de afinidad con poli-histidina se excluyó de la amplificación para codificar una proteasa sin etiqueta. Después de la amplificación, el producto de PCR se digirió en los sitios de restricción única, incorporados a los extremos del producto de PCR por medio de los cebadores de PCR, y se clonó en los sitios correspondientes en el sitio de clonación múltiple del plásmido de expresión pColdIV (Clontech Laboratories, Inc., Madison, WI) usando un procedimiento de ADN ligasa T4. La mezcla de ligado se transformó en células *Acella* BL21(DE3) de *E. coli* electrocompetentes (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) por electroporación, se pusieron en platos de agar Luria-Bertani al 1,5% (pH 7,0) que contenían 50 µg/mL de ampicilina, y se colocaron en una incubadora a 37°C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen las construcciones de expresión se identificaron como colonias resistentes a la ampicilina. Las construcciones candidatas se aislaron usando un procedimiento de mini-preparación de plásmido de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión con endonucleasas de restricción y secuenciando ambas hebras de ADN para confirmar la presencia e integridad de la inserción. Esta estrategia de clonado dio la construcción de expresión pColdIV/TEV que comprende la molécula de polinucleótido que codifica la variante 7 de TEV bajo control del promotor de choque frío.

C. Construcción de células que comprenden las construcciones de expresión pET29/GalLHN/A-TEV y pColdIV/TEV.

Para hacer una célula que comprende construcciones de expresión pET29/GalLHN/A-TEV y pColdIV/TEV, la construcción de expresión pET29/GalLHN/A-TEV se transformó en células BL21(DE3) *E. coli* electro-competentes que albergan pColdIV/TEV usando electroporación, se colocó en platos de agar Luria-Bertani al 1,5% (pH 7,0) que contienen 100 µg/mL de ampicilina y 50 µg/mL de canamicina, y se colocaron en una incubadora a 37°C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen ambas construcciones de expresión se identificaron

como colonias resistentes a ampicilina-canamicina. Las construcciones candidatas se aislaron usando un procedimiento de mini-preparación de plásmidos de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión de endonucleasa de restricción para determinar la presencia de ambas construcciones. Esta estrategia de clonado dio células que comprenden construcciones de expresión pET29/GalLHN/A-TEV y pColdIV/TEV.

5 D. Activación in situ de pET29/GalLHN/A.

Para producir formas dicadena de GalLHN/A-TEV en condiciones de auto-inducción, 3,0 mL de medio PA-0,5G que contiene 50 µg/mL de canamicina y 100 µg/mL de ampicilina se inoculó con una única colonia de células BL21(DE3) que albergan construcciones de expresión pET29/GalLHN/A-TEV y pColdIV/TEV y se hicieron crecer a 37°C con agitación toda la noche. Aproximadamente 250 µL de este cultivo iniciador se usó para inocular 250 mL de ZYP-5052 que contiene 50 µg/mL de canamicina y 100 µg/mL de ampicilina y se hizo crecer a 37°C con agitación durante 8 horas y después a 15°C con agitación durante 18 horas. Las células se lisaron y se purificaron por IMAC usando resina Magne-His.

Para purificar la GalLHN/A-TEV de di-cadena mediante purificación Magne-His, las células inducidas a partir de 250 mL de cultivos de expresión se suspendieron de nuevo en 16 mL de Tampón de Lavado IMAC frío (4-6°C) que consistía en HEPES 100 mM, pH 7,5, 10% en v/v de glicerol, imidazol 10 mM, NaCl M. La suspensión celular se transfirió a una cámara de tratamiento de atmósfera sellada (n° 101-021-006, Branson Ultrasonics Corporation) y se sonicó mediante 15 pulsos (10 seg, 30% de amplitud, magnetron de ruptura de 0,5 pulgadas (1,27 cm)) con 1 minuto entre pulsos (Sonifier® Digital 450, Branson Ultrasonics Corporation). Durante la sonicación la cámara de tratamiento de atmósfera sellada se enfrió pasando agua helada desde un baño de agua circulante (3,5°C) a través de la camisa externa de la cámara. El material sonicado se transfirió desde la cámara de tratamiento a un tubo Oakridge limpio y se centrifugó a 30.500 RCF durante 30 min (SL-50T Rotor, Sorvall; FIBERLite® F21S-8X50 Rotor, Piramoon Technologies Inc.) a 4°C para eliminar los desechos celulares insolubles. El lisato clarificado se aspiró mediante jeringa y se pasó primero a través de un filtro de jeringa de 0,8 µm y después de 0,45 µm (Sartorius) en serie a un tubo cónico limpio de 50 mL. La Resina de Purificación de Proteína Magne-His™ (Promega Corp., Madison, WI) se puso en vórtice a una suspensión uniforme y 4 mL de la suspensión se transfirió al lisato clarificado. El tubo se selló y se invirtió varias veces para mezclar las partículas bien. La mezcla se incubó durante 30 min con basculamiento suave para unir la proteína diana a 16°C. El tubo se transfirió a una Unidad de Separación Magnética MagneSil (Promega Corp., Madison, WI) y ~2 min se dejaron para la captura de las partículas de resina. La disolución sobrenadante se eliminó y el tubo se quitó de la unidad de separación. La resina se suspendió de nuevo entonces en 10 mL de Tampón de Lavado IMAC, se capturó en la unidad de separación magnética y el tampón de lavado se eliminó. La etapa de lavado se repitió dos veces más. Para eluir la proteína diana, la resina se suspendió de nuevo en 5 mL del Tampón de Elución Magne-His™ (HEPES 100 mM, pH 7,5, imidazol 500 mM) incubada a temperatura ambiente durante 2 min, la resina se capturó en la unidad de separación magnética y la disolución sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. La etapa de elución se repitió una vez.

Para dializar el GalLHN/A-TEV purificado con IMAC por cromatografía de intercambio iónico secundario, las fracciones de elución acumuladas se dializaron en un FASTDIALYZER® ajustado con membrana MWCO de 25 kD a 4°C en 1 L de un Tampón de Desalado (Tampón A: Tris-HCl 50 mM, pH 8,0) con agitación constante toda la noche.

Para purificar GalLHN/A-TEV de dicadena por cromatografía de intercambio aniónico, la disolución de proteína desalada se cargó en una columna de intercambio aniónico UNO-Q1 de 1 mL, se pre-equilibró con Tampón A, a un caudal de 1 mL/min. La proteína unida se eluyó por gradiente de NaCl con Tampón B que comprende Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 1 M a un caudal de 1 mL/min como sigue: 7% de Tampón B para 3 mL, 15% de Tampón B para 7 mL, 10% a 50% de Tampón B por encima de 10 mL. La elución de proteínas de la columna se detectó con un detector UV-Visible a 214 nm, 260 nm y 280 nm, y todas las fracciones de pico se acumularon y la concentración de proteína se determinó. Las alícuotas se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. La proteína BoNT/A-TEV purificada se analizó mediante SDS-PAGE y los geles se tintaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 1B.

Los resultados indican que cuando GalLHN/A-TEV se co-expresó con proteasa TEV, dos bandas casi superpuestas se observaron en condiciones reductoras, una de aproximadamente 51,1 kDa y la otra de aproximadamente 52,1 kDa. Además, cuando las mismas muestras se hicieron marchar bajo condiciones no reductoras, las bandas de aproximadamente 51,1 kDa y 52,1 kDa desaparecieron y una nueva banda de aproximadamente 103 kDa se observó. Tomadas juntas, estas observaciones indican que la banda de aproximadamente 51,1 kDa corresponde al dominio enzimático de toxina clostridial y la banda de aproximadamente 52,1 kDa corresponde al dominio de translocación de toxina clostridial con el resto de señalización de galanina unido a su extremo amino. La presencia de estas dos bandas era indicativo de formación de dicadena de GalLHN/A-TEV y también que la cadena sencilla de GalLHN/A-TEV se convirtió a su forma dicadena con aproximadamente el 90% de eficiencia. Así, la co-expresión de GalLHN/A-TEV y proteasa TEV en estas células a partir de plásmidos independientes da por resultado la escisión de GalLHN/A-TEV en el sitio de escisión de proteasa TEV situado en el dominio de unión de galanina al sitio de escisión de proteasa TEV integrado y la posterior formación de la forma dicadena de GalLHN/A-TEV.

Ejemplo 7: Activación intracelular profética de una proteína que comprende un dominio de unión de galanina al sitio de escisión de proteasa TEV integrado usando una construcción de expresión dual.

El siguiente ejemplo ilustra métodos útiles para purificar y cuantificar cualquiera de las proteínas que comprende un bucle dicadena que comprende un dominio de unión opioide al sitio de escisión de proteasa TEV integrado descrito en la presente memoria donde la proteína diana y la proteasa se expresan a partir de un plásmido de expresión dual.

A. Construcción de la construcción de expresión dual pRSFdueto/TEV/2xGalLHN/A-TEV.

Para construir la construcción de expresión dual pRSFdueto/TEV/2xGalLHN/A-TEV similar a pRSFdueto/TEV/2xNociLHN/A-TEV y pRSFdueto/TEV/2xDynLHN/A-TEV construidas antes (Véase el Ejemplo 4), una construcción de expresión pET29/GalLHN/A-TEV se digerirá con endonucleasas de restricción para 1) escindir la inserción que comprende el marco de lectura abierta (SEQ ID NO: 100) que codifica el GalLHN/A-TEV (SEQ ID NO: 101); y 2) permitir a esta inserción unirse de forma operable al MCS2 de pRSFdueto/TEV, un vector pRSFdueto-1 que alberga la variante 7 de TEV en MCS1 (Descrito en el Ejemplo 3C). La inserción GalLHN/A-TEV se subclonará en el MCS2 de la construcción pRSFdueto/TEV usando un procedimiento de ADN ligasa T4 para dar la construcción de expresión dual pRSFdueto/TEV/2xGalLHN/A-TEV. La mezcla de ligado se transformará en células Acella BL21(DE3) de *E. coli* electrocompetentes (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) por electroporación, se pondrá en platos en platos de agar Luria-Bertani al 1,5% (pH 7,0) que contiene 50 µg/mL de canamicina, y se colocará en una incubadora a 37°C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen las construcciones de expresión se identificarán como colonias resistentes a canamicina y construcciones candidatas confirmadas por mapeo por digestión con endonucleasa de restricción y secuenciación de ambas hebras de ADN para confirmar la presencia e integridad de la inserción. Esta estrategia de clonado dará una construcción de expresión dual pRSFdueto donde la transcripción a partir del primer promotor T7 producirá ARNm que codifican TEV y GalLHN/A-TEV y la transcripción a partir del segundo promotor T7 producirá ARNm que codifican solo GalLHN/A-TEV.

B. Activación in situ de GalLHN/A-TEV.

Para producir formas dicadena de GalLHN/A-TEV en condiciones de auto-inducción, 3,0 mL de medio PA-0,5G que contiene 50 µg/mL de canamicina se inoculará con una única colonia de células BL21(DE3) que comprende la construcción de expresión dual pRSFdueto/TEV/2xGalLHN/A-TEV y se hará crecer a 37°C con agitación toda la noche. 250 µL de este cultivo iniciador se usará para inocular 250 mL de ZYP-5052 que contiene 50 µg/mL de canamicina y se hará crecer a 37°C con agitación durante 8 horas y después a 16°C con agitación durante 18 horas. Las células se harán bolitas por centrifugado, se lisarán, se purificarán con IMAC, se desalarán y se purificarán por cromatografía de intercambio aniónico como se describe en el Ejemplo 5D. La proteína diana purificada se analizará por SDS-PAGE bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras, y los geles se tinarán esencialmente como se describe en el Ejemplo 1B para evaluar los niveles de expresión y la extensión a la que GalLHN/A-TEV producido a partir de la construcción de expresión dual pRSFdueto/TEV/2xGalLHN/A-TEV se convierte a su forma dicadena.

Ejemplo 8

Activación intracelular de una proteína que comprende un dominio de unión de dinorfina al sitio de escisión de proteasa TEV integrado usando una construcción de expresión dual en BEVS.

El siguiente ejemplo ilustra métodos útiles para purificar y cuantificar cualquiera de las proteínas que comprenden un bucle dicadena que comprende un dominio de unión opioide al sitio de escisión de proteasa TEV integrado descrito en la presente memoria donde la proteína diana y la proteasa se co-expresan en una construcción de expresión dual y bajo el control de dos promotores independientes en el sistema de vector de expresión de baculovirus (BEVS).

A. Construcción de la construcción de expresión dual pBAC-6/TEV/DynLHN/A-TEV.

Para construir la construcción de expresión dual pBAC-6/TEV/DynLHN/A-TEV, un fragmento sintético (SEQ ID NO: 107) que codifica la variante 7 de TEV recombinante corriente abajo de la secuencia del promotor p10 y DynLhn/A-TEV corriente abajo de la secuencia promotora polH en la orientación opuesta se sintetizó usando procedimientos estándar (BlueHeron Biotechnology, Bothell, WA). Oligonucleótidos complementarios de 20 a 50 bases de longitud se sintetizaron usando síntesis de fosforamidita estándar. Estos oligonucleótidos se hibridaron en dobles de doble hebra que se ligaron secuencialmente juntos para montar la molécula de polinucleótido de longitud total. Esta molécula de polinucleótido se clonó usando métodos de biología molecular estándar en un vector de transporte pUCBHB1 en el sitio *SmaI* para generar el plásmido pUCBHB1/p10-TEV/polH-DynLHN/A-TEV. La molécula de polinucleótido sintetizada se verificó por secuenciación usando BIG DYE TERMINATOR™ Química 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Para generar la construcción de expresión dual pBAC-6/TEV/DynLHN/A-TEV, pUCBHB1/p10-TEV/polH-DynLHN/A-TEV se digirió con endonucleasas de restricción que 1) escinden la inserción que comprende la región de codificación entera de la variante 7 de TEV bajo el control del promotor p10 y DynLHN/A-TEV en la dirección contraria bajo el control del promotor polH; y 2) permite a esta inserción estar unida de forma operable a un vector de transferencia pBAC-6 (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI). Esta inserción se subclonó usando un procedimiento de ADN ligasa T4 en el vector de transferencia pBAC-6 digerido con las endonucleasas de restricción

analogas para dar la construcción de expresión dual pBAC-6 fabricada que comprende marco de lectura abierta de la variante 7 de proteasa TEV corriente abajo del promotor p10 y un segundo marco de lectura abierta de DynLHN/A-TEV corriente abajo del promotor polH. La mezcla de ligado se transformó en células Acella BL21(DE3) de *E. coli* electrocompetentes (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) por electroporación, se pusieron en platos en platos de agar Luria-Bertani al 1,5% (pH 7,0) que contenían 100 µg/mL de ampicilina, y se colocaron en una incubadora a 37°C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen construcción de expresión se identificaron como colonias resistentes a la ampicilina. Las construcciones candidatas se aislaron usando un procedimiento de mini-preparación de plásmido de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión con endonucleasas de restricción y secuenciando ambas hebras de ADN para confirmar la presencia e integridad de la inserción. Esta estrategia de clonado dio una construcción de expresión dual pBAC-6 que comprende la molécula de polinucleótido que codifica un DynLH/A-TEV unido de forma operable a una etiqueta de purificación de afinidad de polihistidina de carboxilo terminal y una proteasa TEV.

B. Generación de existencias de baculovirus recombinante TEV/DynLHN/A-TEV de título alto.

Antes de que pudieran producirse formas dicadena de DynLHN/A-TEV, se generaron existencias de baculovirus recombinante de alto título que comprende TEV/DynLHN/A-TEV. Aproximadamente 2×10^6 células de insecto Sf9 se sembraron en platos de 35 mm en un volumen de 2 mL de medio de cultivo de células de insecto ESF921. Una disolución de transfección se preparó mezclando Disolución A (que comprende 2 µg de pBAC-6/TEV/DynLHN/A-TEV, 0,5 µg de ADN de baculovirus *flashBAC* linearizado (Oxford Expression Technologies, Oxford, RU), y 100 µL de Medio de Transfección) con disolución B (que comprende 6 µL de reactivo de transfección TRANSLT®-2020 y 100 µL de Medio de Transfección) e incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos. Unos 800 µL adicionales de Medio de Transfección se añadieron después a la mezcla de Disolución A/B, se mezcló suavemente, y se añadió en gotas en las células. Las células se incubaron a 28°C durante 5 horas, al final de lo que 3 mL de ESF 921 se añadió para llevar al volumen final de hasta 4 mL en cada pocillo. La incubación se continuó a 28°C durante 4-5 días para la producción de virus recombinante P0. Para generar existencias de semilla de baculovirus recombinante P1 de alto título, el virus aislado del sobrenadante P0 se valoró usando *baculoQUANT* (Oxford Expression Technologies, Oxford, RU) y se amplificó adicionalmente en matraces de agitación. Aproximadamente 100–200 mL de células Sf9 a una densidad de 2×10^6 células/mL se infectaron con virus P0 a una MOI (multiplicidad de infección) < 1 pfu/célula y se incubó con agitación durante 4 – 5 días. Después de la cuantificación, la existencia P1 de alto título se usó para infectar células Tni para la expresión de proteína de alto nivel.

C. Activación in situ de DynLHN/A-TEV.

Para producir formas dicadena de DynLHN/A-TEV, 50 mL de células Tni a una concentración de 1×10^6 /mL se infectaron a un MOI de 5 con existencias de virus P1 recombinante que comprende TEV/DynLHN/A-TEV y se cosecharon 3 días después de la infección (pi). Las células se lisaron y se purificaron con IMAC usando resina Magne-His.

Para purificar la dicadena de DynLHN/A-TEV mediante purificación Magne-His, la bolita de células se suspendió de nuevo en 20 mL de PBS c/o Ca^{2+} o Mg^{2+} en presencia de 100 µL de Reactivo de PopCultivo de Insecto y 20 µL (10U) de nucleasa benzonasa, se mezcló suavemente y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de clarificar el lisato celular por centrifugado a 16.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se mezcló con 4 mL de Resina de Purificación de Proteína Magne-His™ suspendida uniformemente (Promega Corp., Madison, WI). La mezcla se incubó durante 20 min a temperatura ambiente con basculamiento suave para unir la proteína diana. El tubo se transfirió a una unidad de separación magnética MagneSil durante aproximadamente 2 min para permitir la captura de las partículas de resina. Después de eliminar el sobrenadante, el tubo se quitó de la unidad de separación y la resina se suspendió de nuevo en 10 mL de tampón de lavado IMAC. De nuevo, la resina se capturó en la unidad de separación magnética y el tampón de lavado se eliminó. La etapa de lavado se repitió dos veces más. Para eluir la proteína diana, la resina se suspendió de nuevo en 2,5 mL del Tampón de Elución Magne-His™ (HEPES 100 mM, pH 7,5, imidazol 500 mM), se incubó a temperatura ambiente durante 2 min, la resina se capturó en la unidad de separación magnética y la disolución sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. La etapa de elución se repitió de nuevo para maximizar la recuperación de diana a partir de la resina magnética.

Para dializar el DynLHN/A-TEV purificado con IMAC por cromatografía de intercambio iónico secundario, las fracciones de elución acumuladas se dializaron en un FASTDIALYZER® ajustado con membrana MWCO de 25 kD a 4°C en 1 L de un Tampón de Desalado (Tampón A: Tris-HCl 50 mM, pH 8,0) con agitación constante toda la noche.

Para purificar DynLHN/A-TEV de dicadena por cromatografía de intercambio aniónico, la disolución de proteína desalada se cargó en una columna de intercambio aniónico UNO-Q1 de 1 mL, se pre-equilibró con Tampón A, a un caudal de 1 mL/min. La proteína unida se eluyó por gradiente de NaCl con Tampón B que comprende Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 1 M a un caudal de 1 mL/min como sigue: 7% de Tampón B para 3 mL, 15% de Tampón B para 7 mL, 10% a 50% de Tampón B por encima de 10 mL. La elución de proteínas de la columna se detectó con un detector UV-Visible a 214 nm, 260 nm y 280 nm, y todas las fracciones de pico se acumularon y la concentración de proteína se determinó. Las alícuotas se almacenaron a -20°C. La proteína DynLHN/A-TEV purificada se analizó mediante SDS-PAGE y los geles se tintaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 1B.

- Los resultados indican que cuando DynLHN/A-TEV se co-expresó con proteasa TEV en células de insecto y se purificó a casi homogeneidad, dos bandas casi superpuestas se observaron en condiciones reductoras, una de aproximadamente 51 kDa y otra de aproximadamente 52 kDa. Además, cuando las mismas muestras se hicieron marchar bajo condiciones no reductoras, las dos bandas de aproximadamente 50 kDa y 52 kDa desaparecieron y una nueva banda de aproximadamente 102 kDa se observó. Tomadas juntas, estas observaciones indican que la banda de aproximadamente 51 kDa corresponde al dominio enzimático de toxina clostridial y la banda de aproximadamente 52 kDa corresponde al dominio de translocación de toxina clostridial con el resto de señalización de dinorfina unido a su extremo amino. La presencia de estas dos bandas era indicativa de formación de dicadena de DynLHN/A-TEV y también que la cadena sencilla de DynLHN/A-TEV se convirtió a su forma de dicadena con 80-90% de eficiencia. Así, la co-expresión de DynLHN/A-TEV y proteasa TEV en células de insecto infectadas con baculovirus recombinante TEV/DynLHN/A-TEV generado a partir de la construcción de expresión dual pBAC-6/TEV/DynLHN/A-TEV da por resultado la escisión de DynLHN/A-TEV en el sitio de escisión de proteasa TEV situado en el dominio de unión de dinorfina al sitio de escisión de proteasa TEV integrado y la posterior formación de la forma dicadena de DynLHN/A-TEV.
- Aunque aspectos de la presente invención se han descrito con referencia a las realizaciones descritas, un experto en la técnica apreciará fácilmente que los ejemplos específicos descritos son solo ilustrativos de estos aspectos y de ninguna forma limitan la presente invención.

Listado de secuencias

<110> Ghanshani, Sanjiv

Le, Linh Q.

5 Liu, Li

Steward, Lance E.

<120> Métodos de Conversión Intracelular de Proteínas

de cadena sencilla en su forma di-cadena

10

<130> 18469 (BOT)

<150> US 61/286.963

<151> 25-01-2010

15

<160> 107

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

20 <210> 1

<211> 1296

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum Serotipo A

25 <400> 1

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly

1 5 10 15

Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro

20 25 30

30 Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg

35 40 45

Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu

50 55 60

Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr

35 65 70 75 80

Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu

85 90 95

ES 2 488 217 T3

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

ES 2 488 217 T3

405 410 415
 Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
 420 425 430
 Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys
 5 435 440 445
 Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
 450 455 460
 Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu
 465 470 475 480
 10 Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
 485 490 495
 Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
 500 505 510
 Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
 15 515 520 525
 Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
 530 535 540
 Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu
 545 550 555 560
 20 His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu
 565 570 575
 Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
 580 585 590
 Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
 25 595 600 605
 Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr
 610 615 620
 Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
 625 630 635 640
 30 Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
 645 650 655
 Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
 660 665 670
 Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
 35 675 680 685
 Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
 690 695 700
 Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
 705 710 715 720

ES 2 488 217 T3

Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu
 725 730 735
 Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
 740 745 750
 5 Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
 755 760 765
 Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
 770 775 780
 Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
 10 785 790 795 800
 Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
 805 810 815
 Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
 820 825 830
 15 Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
 835 840 845
 Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
 850 855 860
 Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn
 20 865 870 875 880
 Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser
 885 890 895
 Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn
 900 905 910
 25 Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu
 915 920 925
 Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser
 930 935 940
 Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn
 30 945 950 955 960
 Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val
 965 970 975
 Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu
 980 985 990
 35 Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser
 995 1000 1005
 Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu
 1010 1015 1020
 Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro

ES 2 488 217 T3

1025 1030 1035 1040
 Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile Met Phe Lys
 1045 1050 1055
 Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp Ile Lys Tyr Phe
 5 1060 1065 1070
 Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr
 1075 1080 1085
 Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr
 1090 1095 1100
 10 Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn
 1105 1110 1115 1120
 Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu
 1125 1130 1135
 Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser
 15 1140 1145 1150
 Ser Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly
 1155 1160 1165
 Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val
 1170 1175 1180
 20 Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala
 1185 1190 1195 1200
 Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn
 1205 1210 1215
 Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr
 25 1220 1225 1230
 Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly
 1235 1240 1245
 Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser
 1250 1255 1260
 30 Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys
 1265 1270 1275 1280
 Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Arg Pro Leu
 1285 1290 1295

 35 <210> 2
 <211> 1291
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum Serotipo B

ES 2 488 217 T3

<400> 2

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

ES 2 488 217 T3

Lys Val Leu Val Cys Ile Ser Asp Pro Asn Ile Asn Ile Asn Ile Tyr
 305 310 315 320
 Lys Asn Lys Phe Lys Asp Lys Tyr Lys Phe Val Glu Asp Ser Glu Gly
 325 330 335
 5 Lys Tyr Ser Ile Asp Val Glu Ser Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ser Leu
 340 345 350
 Met Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn Ile Ala Glu Asn Tyr Lys Ile Lys
 355 360 365
 Thr Arg Ala Ser Tyr Phe Ser Asp Ser Leu Pro Pro Val Lys Ile Lys
 10 370 375 380
 Asn Leu Leu Asp Asn Glu Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Gly Phe Asn Ile
 385 390 395 400
 Ser Asp Lys Asp Met Glu Lys Glu Tyr Arg Gly Gln Asn Lys Ala Ile
 405 410 415
 15 Asn Lys Gln Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Lys Glu His Leu Ala Val Tyr
 420 425 430
 Lys Ile Gln Met Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys Ile Asp
 435 440 445
 Val Asp Asn Glu Asp Leu Phe Phe Ile Ala Asp Lys Asn Ser Phe Ser
 20 450 455 460
 Asp Asp Leu Ser Lys Asn Glu Arg Ile Glu Tyr Asn Thr Gln Ser Asn
 465 470 475 480
 Tyr Ile Glu Asn Asp Phe Pro Ile Asn Glu Leu Ile Leu Asp Thr Asp
 485 490 495
 25 Leu Ile Ser Lys Ile Glu Leu Pro Ser Glu Asn Thr Glu Ser Leu Thr
 500 505 510
 Asp Phe Asn Val Asp Val Pro Val Tyr Glu Lys Gln Pro Ala Ile Lys
 515 520 525
 Lys Ile Phe Thr Asp Glu Asn Thr Ile Phe Gln Tyr Leu Tyr Ser Gln
 30 530 535 540
 Thr Phe Pro Leu Asp Ile Arg Asp Ile Ser Leu Thr Ser Ser Phe Asp
 545 550 555 560
 Asp Ala Leu Leu Phe Ser Asn Lys Val Tyr Ser Phe Phe Ser Met Asp
 565 570 575
 35 Tyr Ile Lys Thr Ala Asn Lys Val Val Glu Ala Gly Leu Phe Ala Gly
 580 585 590
 Trp Val Lys Gln Ile Val Asn Asp Phe Val Ile Glu Ala Asn Lys Ser
 595 600 605
 Asn Thr Met Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Leu Ile Val Pro Tyr Ile

ES 2 488 217 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| | 610 | | 615 | | 620 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Gly | Leu | Ala | Leu | Asn | Val | Gly | Asn | Glu | Thr | Ala | Lys | Gly | Asn | Phe | Glu | | | | |
| | 625 | | | | | 630 | | | | | 635 | | | | | 640 | | | | |
| | Asn | Ala | Phe | Glu | Ile | Ala | Gly | Ala | Ser | Ile | Leu | Leu | Glu | Phe | Ile | Pro | | | | |
| 5 | | | | | 645 | | | | | 650 | | | | | | 655 | | | | |
| | Glu | Leu | Leu | Ile | Pro | Val | Val | Gly | Ala | Phe | Leu | Leu | Glu | Ser | Tyr | Ile | | | | |
| | | | | | 660 | | | | | 665 | | | | | | 670 | | | | |
| | Asp | Asn | Lys | Asn | Lys | Ile | Ile | Lys | Thr | Ile | Asp | Asn | Ala | Leu | Thr | Lys | | | | |
| | | | | | 675 | | | | | 680 | | | | | | 685 | | | | |
| 10 | Arg | Asn | Glu | Lys | Trp | Ser | Asp | Met | Tyr | Gly | Leu | Ile | Val | Ala | Gln | Trp | | | | |
| | | | | | 690 | | | | | 695 | | | | | | 700 | | | | |
| | Leu | Ser | Thr | Val | Asn | Thr | Gln | Phe | Tyr | Thr | Ile | Lys | Glu | Gly | Met | Tyr | | | | |
| | | | | | 705 | | | | | 710 | | | | | | 715 | | | | |
| | Lys | Ala | Leu | Asn | Tyr | Gln | Ala | Gln | Ala | Leu | Glu | Glu | Ile | Ile | Lys | Tyr | | | | |
| 15 | | | | | 725 | | | | | 730 | | | | | | 735 | | | | |
| | Arg | Tyr | Asn | Ile | Tyr | Ser | Glu | Lys | Glu | Lys | Ser | Asn | Ile | Asn | Ile | Asp | | | | |
| | | | | | 740 | | | | | 745 | | | | | | 750 | | | | |
| | Phe | Asn | Asp | Ile | Asn | Ser | Lys | Leu | Asn | Glu | Gly | Ile | Asn | Gln | Ala | Ile | | | | |
| | | | | | 755 | | | | | 760 | | | | | | 765 | | | | |
| 20 | Asp | Asn | Ile | Asn | Asn | Phe | Ile | Asn | Gly | Cys | Ser | Val | Ser | Tyr | Leu | Met | | | | |
| | | | | | 770 | | | | | 775 | | | | | | 780 | | | | |
| | Lys | Lys | Met | Ile | Pro | Leu | Ala | Val | Glu | Lys | Leu | Leu | Asp | Phe | Asp | Asn | | | | |
| | | | | | 785 | | | | | 790 | | | | | | 795 | | | | |
| | Thr | Leu | Lys | Lys | Asn | Leu | Leu | Asn | Tyr | Ile | Asp | Glu | Asn | Lys | Leu | Tyr | | | | |
| 25 | | | | | 805 | | | | | 810 | | | | | | 815 | | | | |
| | Leu | Ile | Gly | Ser | Ala | Glu | Tyr | Glu | Lys | Ser | Lys | Val | Asn | Lys | Tyr | Leu | | | | |
| | | | | | 820 | | | | | 825 | | | | | | 830 | | | | |
| | Lys | Thr | Ile | Met | Pro | Phe | Asp | Leu | Ser | Ile | Tyr | Thr | Asn | Asp | Thr | Ile | | | | |
| | | | | | 835 | | | | | 840 | | | | | | 845 | | | | |
| 30 | Leu | Ile | Glu | Met | Phe | Asn | Lys | Tyr | Asn | Ser | Glu | Ile | Leu | Asn | Asn | Ile | | | | |
| | | | | | 850 | | | | | 855 | | | | | | 860 | | | | |
| | Ile | Leu | Asn | Leu | Arg | Tyr | Lys | Asp | Asn | Asn | Leu | Ile | Asp | Leu | Ser | Gly | | | | |
| | | | | | 865 | | | | | 870 | | | | | | 875 | | | | |
| | Tyr | Gly | Ala | Lys | Val | Glu | Val | Tyr | Asp | Gly | Val | Glu | Leu | Asn | Asp | Lys | | | | |
| 35 | | | | | 885 | | | | | 890 | | | | | | 895 | | | | |
| | Asn | Gln | Phe | Lys | Leu | Thr | Ser | Ser | Ala | Asn | Ser | Lys | Ile | Arg | Val | Thr | | | | |
| | | | | | 900 | | | | | 905 | | | | | | 910 | | | | |
| | Gln | Asn | Gln | Asn | Ile | Ile | Phe | Asn | Ser | Val | Phe | Leu | Asp | Phe | Ser | Val | | | | |
| | | | | | 915 | | | | | 920 | | | | | | 925 | | | | |

ES 2 488 217 T3

Ser Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Lys Asn Asp Gly Ile Gln Asn
 930 935 940
 Tyr Ile His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Lys Asn Asn Ser
 945 950 955 960
 5 Gly Trp Lys Ile Ser Ile Arg Gly Asn Arg Ile Ile Trp Thr Leu Ile
 965 970 975
 Asp Ile Asn Gly Lys Thr Lys Ser Val Phe Phe Glu Tyr Asn Ile Arg
 980 985 990
 Glu Asp Ile Ser Glu Tyr Ile Asn Arg Trp Phe Phe Val Thr Ile Thr
 10 995 1000 1005
 Asn Asn Leu Asn Asn Ala Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Lys Leu Glu Ser
 1010 1015 1020
 Asn Thr Asp Ile Lys Asp Ile Arg Glu Val Ile Ala Asn Gly Glu Ile
 1025 1030 1035 1040
 15 Ile Phe Lys Leu Asp Gly Asp Ile Asp Arg Thr Gln Phe Ile Trp Met
 1045 1050 1055
 Lys Tyr Phe Ser Ile Phe Asn Thr Glu Leu Ser Gln Ser Asn Ile Glu
 1060 1065 1070
 Glu Arg Tyr Lys Ile Gln Ser Tyr Ser Glu Tyr Leu Lys Asp Phe Trp
 20 1075 1080 1085
 Gly Asn Pro Leu Met Tyr Asn Lys Glu Tyr Tyr Met Phe Asn Ala Gly
 1090 1095 1100
 Asn Lys Asn Ser Tyr Ile Lys Leu Lys Lys Asp Ser Pro Val Gly Glu
 1105 1110 1115 1120
 25 Ile Leu Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Gln Asn Ser Lys Tyr Ile Asn Tyr
 1125 1130 1135
 Arg Asp Leu Tyr Ile Gly Glu Lys Phe Ile Ile Arg Arg Lys Ser Asn
 1140 1145 1150
 Ser Gln Ser Ile Asn Asp Asp Ile Val Arg Lys Glu Asp Tyr Ile Tyr
 30 1155 1160 1165
 Leu Asp Phe Phe Asn Leu Asn Gln Glu Trp Arg Val Tyr Thr Tyr Lys
 1170 1175 1180
 Tyr Phe Lys Lys Glu Glu Glu Lys Leu Phe Leu Ala Pro Ile Ser Asp
 1185 1190 1195 1200
 35 Ser Asp Glu Phe Tyr Asn Thr Ile Gln Ile Lys Glu Tyr Asp Glu Gln
 1205 1210 1215
 Pro Thr Tyr Ser Cys Gln Leu Leu Phe Lys Lys Asp Glu Glu Ser Thr
 1220 1225 1230
 Asp Glu Ile Gly Leu Ile Gly Ile His Arg Phe Tyr Glu Ser Gly Ile

ES 2 488 217 T3

1235 1240 1245
 Val Phe Glu Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe Cys Ile Ser Lys Trp Tyr Leu
 1250 1255 1260
 Lys Glu Val Lys Arg Lys Pro Tyr Asn Leu Lys Leu Gly Cys Asn Trp
 5 1265 1270 1275 1280
 Gln Phe Ile Pro Lys Asp Glu Gly Trp Thr Glu
 1285 1290

 <210> 3
 10 <211> 1291
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum Serotipo C1

 <400> 3
 15 Met Pro Ile Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Ser Asp Pro Val Asp Asn
 1 5 10 15
 Lys Asn Ile Leu Tyr Leu Asp Thr His Leu Asn Thr Leu Ala Asn Glu
 20 25 30
 Pro Glu Lys Ala Phe Arg Ile Thr Gly Asn Ile Trp Val Ile Pro Asp
 20 35 40 45
 Arg Phe Ser Arg Asn Ser Asn Pro Asn Leu Asn Lys Pro Pro Arg Val
 50 55 60
 Thr Ser Pro Lys Ser Gly Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Ser Thr Asp
 65 70 75 80
 25 Ser Asp Lys Asp Pro Phe Leu Lys Glu Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg
 85 90 95
 Ile Asn Ser Arg Glu Ile Gly Glu Glu Leu Ile Tyr Arg Leu Ser Thr
 100 105 110
 Asp Ile Pro Phe Pro Gly Asn Asn Asn Thr Pro Ile Asn Thr Phe Asp
 30 115 120 125
 Phe Asp Val Asp Phe Asn Ser Val Asp Val Lys Thr Arg Gln Gly Asn
 130 135 140
 Asn Trp Val Lys Thr Gly Ser Ile Asn Pro Ser Val Ile Ile Thr Gly
 145 150 155 160
 35 Pro Arg Glu Asn Ile Ile Asp Pro Glu Thr Ser Thr Phe Lys Leu Thr
 165 170 175
 Asn Asn Thr Phe Ala Ala Gln Glu Gly Phe Gly Ala Leu Ser Ile Ile
 180 185 190
 Ser Ile Ser Pro Arg Phe Met Leu Thr Tyr Ser Asn Ala Thr Asn Asp

ES 2 488 217 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|
| | 195 | | 200 | | 205 | | | | | | | | | | | | | | |
| | Val | Gly | Glu | Gly | Arg | Phe | Ser | Lys | Ser | Glu | Phe | Cys | Met | Asp | Pro | Ile | | | |
| | 210 | | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | | |
| | Leu | Ile | Leu | Met | His | Glu | Leu | Asn | His | Ala | Met | His | Asn | Leu | Tyr | Gly | | | |
| 5 | 225 | | | | 230 | | | | | 235 | | | | 240 | | | | | |
| | Ile | Ala | Ile | Pro | Asn | Asp | Gln | Thr | Ile | Ser | Ser | Val | Thr | Ser | Asn | Ile | | | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | 255 | | | | | | |
| | Phe | Tyr | Ser | Gln | Tyr | Asn | Val | Lys | Leu | Glu | Tyr | Ala | Glu | Ile | Tyr | Ala | | | |
| | | | | 260 | | | | 265 | | | | | 270 | | | | | | |
| 10 | Phe | Gly | Gly | Pro | Thr | Ile | Asp | Leu | Ile | Pro | Lys | Ser | Ala | Arg | Lys | Tyr | | | |
| | | 275 | | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | | |
| | Phe | Glu | Glu | Lys | Ala | Leu | Asp | Tyr | Tyr | Arg | Ser | Ile | Ala | Lys | Arg | Leu | | | |
| | 290 | | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | | | |
| | Asn | Ser | Ile | Thr | Thr | Ala | Asn | Pro | Ser | Ser | Phe | Asn | Lys | Tyr | Ile | Gly | | | |
| 15 | 305 | | | | 310 | | | | | | 315 | | | | 320 | | | | |
| | Glu | Tyr | Lys | Gln | Lys | Leu | Ile | Arg | Lys | Tyr | Arg | Phe | Val | Val | Glu | Ser | | | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | 335 | | | | | | |
| | Ser | Gly | Glu | Val | Thr | Val | Asn | Arg | Asn | Lys | Phe | Val | Glu | Leu | Tyr | Asn | | | |
| | | | | 340 | | | | 345 | | | | | 350 | | | | | | |
| 20 | Glu | Leu | Thr | Gln | Ile | Phe | Thr | Glu | Phe | Asn | Tyr | Ala | Lys | Ile | Tyr | Asn | | | |
| | | 355 | | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | | | |
| | Val | Gln | Asn | Arg | Lys | Ile | Tyr | Leu | Ser | Asn | Val | Tyr | Thr | Pro | Val | Thr | | | |
| | 370 | | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | | | |
| | Ala | Asn | Ile | Leu | Asp | Asp | Asn | Val | Tyr | Asp | Ile | Gln | Asn | Gly | Phe | Asn | | | |
| 25 | 385 | | | | 390 | | | | | | 395 | | | | 400 | | | | |
| | Ile | Pro | Lys | Ser | Asn | Leu | Asn | Val | Leu | Phe | Met | Gly | Gln | Asn | Leu | Ser | | | |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | 415 | | | | | | |
| | Arg | Asn | Pro | Ala | Leu | Arg | Lys | Val | Asn | Pro | Glu | Asn | Met | Leu | Tyr | Leu | | | |
| | | | | 420 | | | | | 425 | | | | 430 | | | | | | |
| 30 | Phe | Thr | Lys | Phe | Cys | His | Lys | Ala | Ile | Asp | Gly | Arg | Ser | Leu | Tyr | Asn | | | |
| | | 435 | | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | | | |
| | Lys | Thr | Leu | Asp | Cys | Arg | Glu | Leu | Leu | Val | Lys | Asn | Thr | Asp | Leu | Pro | | | |
| | | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | | | |
| | Phe | Ile | Gly | Asp | Ile | Ser | Asp | Val | Lys | Thr | Asp | Ile | Phe | Leu | Arg | Lys | | | |
| 35 | 465 | | | | 470 | | | | | | 475 | | | | 480 | | | | |
| | Asp | Ile | Asn | Glu | Glu | Thr | Glu | Val | Ile | Tyr | Tyr | Pro | Asp | Asn | Val | Ser | | | |
| | | | | 485 | | | | | 490 | | | | 495 | | | | | | |
| | Val | Asp | Gln | Val | Ile | Leu | Ser | Lys | Asn | Thr | Ser | Glu | His | Gly | Gln | Leu | | | |
| | | | | 500 | | | | | 505 | | | | 510 | | | | | | |

ES 2 488 217 T3

Asp Leu Leu Tyr Pro Ser Ile Asp Ser Glu Ser Glu Ile Leu Pro Gly
 515 520 525
 Glu Asn Gln Val Phe Tyr Asp Asn Arg Thr Gln Asn Val Asp Tyr Leu
 530 535 540
 5 Asn Ser Tyr Tyr Tyr Leu Glu Ser Gln Lys Leu Ser Asp Asn Val Glu
 545 550 555 560
 Asp Phe Thr Phe Thr Arg Ser Ile Glu Glu Ala Leu Asp Asn Ser Ala
 565 570 575
 Lys Val Tyr Thr Tyr Phe Pro Thr Leu Ala Asn Lys Val Asn Ala Gly
 10 580 585 590
 Val Gln Gly Gly Leu Phe Leu Met Trp Ala Asn Asp Val Val Glu Asp
 595 600 605
 Phe Thr Thr Asn Ile Leu Arg Lys Asp Thr Leu Asp Lys Ile Ser Asp
 610 615 620
 15 Val Ser Ala Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Ser Asn
 625 630 635 640
 Ser Val Arg Arg Gly Asn Phe Thr Glu Ala Phe Ala Val Thr Gly Val
 645 650 655
 Thr Ile Leu Leu Glu Ala Phe Pro Glu Phe Thr Ile Pro Ala Leu Gly
 20 660 665 670
 Ala Phe Val Ile Tyr Ser Lys Val Gln Glu Arg Asn Glu Ile Ile Lys
 675 680 685
 Thr Ile Asp Asn Cys Leu Glu Gln Arg Ile Lys Arg Trp Lys Asp Ser
 690 695 700
 25 Tyr Glu Trp Met Met Gly Thr Trp Leu Ser Arg Ile Ile Thr Gln Phe
 705 710 715 720
 Asn Asn Ile Ser Tyr Gln Met Tyr Asp Ser Leu Asn Tyr Gln Ala Gly
 725 730 735
 Ala Ile Lys Ala Lys Ile Asp Leu Glu Tyr Lys Lys Tyr Ser Gly Ser
 30 740 745 750
 Asp Lys Glu Asn Ile Lys Ser Gln Val Glu Asn Leu Lys Asn Ser Leu
 755 760 765
 Asp Val Lys Ile Ser Glu Ala Met Asn Asn Ile Asn Lys Phe Ile Arg
 770 775 780
 35 Glu Cys Ser Val Thr Tyr Leu Phe Lys Asn Met Leu Pro Lys Val Ile
 785 790 795 800
 Asp Glu Leu Asn Glu Phe Asp Arg Asn Thr Lys Ala Lys Leu Ile Asn
 805 810 815
 Leu Ile Asp Ser His Asn Ile Ile Leu Val Gly Glu Val Asp Lys Leu

ES 2 488 217 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|------|------|------|-----|------|------|-----|------|-----|-----|------|------|-----|------|------|-----|
| | | 820 | | | | | | 825 | | | | | | 830 | | |
| | Lys | Ala | Lys | Val | Asn | Asn | Ser | Phe | Gln | Asn | Thr | Ile | Pro | Phe | Asn | Ile |
| | | | 835 | | | | | 840 | | | | | | 845 | | |
| | Phe | Ser | Tyr | Thr | Asn | Asn | Ser | Leu | Leu | Lys | Asp | Ile | Ile | Asn | Glu | Tyr |
| 5 | | 850 | | | | | 855 | | | | | 860 | | | | |
| | Phe | Asn | Asn | Ile | Asn | Asp | Ser | Lys | Ile | Leu | Ser | Leu | Gln | Asn | Arg | Lys |
| | 865 | | | | | 870 | | | | | 875 | | | | 880 | |
| | Asn | Thr | Leu | Val | Asp | Thr | Ser | Gly | Tyr | Asn | Ala | Glu | Val | Ser | Glu | Glu |
| | | | | | 885 | | | | | | 890 | | | | 895 | |
| 10 | Gly | Asp | Val | Gln | Leu | Asn | Pro | Ile | Phe | Pro | Phe | Asp | Phe | Lys | Leu | Gly |
| | | | 900 | | | | | | | 905 | | | | 910 | | |
| | Ser | Ser | Gly | Glu | Asp | Arg | Gly | Lys | Val | Ile | Val | Thr | Gln | Asn | Glu | Asn |
| | | | 915 | | | | | 920 | | | | | | 925 | | |
| | Ile | Val | Tyr | Asn | Ser | Met | Tyr | Glu | Ser | Phe | Ser | Ile | Ser | Phe | Trp | Ile |
| 15 | | 930 | | | | | 935 | | | | | 940 | | | | |
| | Arg | Ile | Asn | Lys | Trp | Val | Ser | Asn | Leu | Pro | Gly | Tyr | Thr | Ile | Ile | Asp |
| | 945 | | | | | 950 | | | | | 955 | | | | 960 | |
| | Ser | Val | Lys | Asn | Asn | Ser | Gly | Trp | Ser | Ile | Gly | Ile | Ile | Ser | Asn | Phe |
| | | | | | 965 | | | | | 970 | | | | | 975 | |
| 20 | Leu | Val | Phe | Thr | Leu | Lys | Gln | Asn | Glu | Asp | Ser | Glu | Gln | Ser | Ile | Asn |
| | | | 980 | | | | | | | 985 | | | | 990 | | |
| | Phe | Ser | Tyr | Asp | Ile | Ser | Asn | Asn | Ala | Pro | Gly | Tyr | Asn | Lys | Trp | Phe |
| | | | 995 | | | | | 1000 | | | | | | 1005 | | |
| | Phe | Val | Thr | Val | Thr | Asn | Asn | Met | Met | Gly | Asn | Met | Lys | Ile | Tyr | Ile |
| 25 | | 1010 | | | | | | 1015 | | | | | | 1020 | | |
| | Asn | Gly | Lys | Leu | Ile | Asp | Thr | Ile | Lys | Val | Lys | Glu | Leu | Thr | Gly | Ile |
| | 1025 | | | | | 1030 | | | | | | 1035 | | | 1040 | |
| | Asn | Phe | Ser | Lys | Thr | Ile | Thr | Phe | Glu | Ile | Asn | Lys | Ile | Pro | Asp | Thr |
| | | | | | 1045 | | | | | | 1050 | | | | 1055 | |
| 30 | Gly | Leu | Ile | Thr | Ser | Asp | Ser | Asp | Asn | Ile | Asn | Met | Trp | Ile | Arg | Asp |
| | | | 1060 | | | | | | | | 1065 | | | 1070 | | |
| | Phe | Tyr | Ile | Phe | Ala | Lys | Glu | Leu | Asp | Gly | Lys | Asp | Ile | Asn | Ile | Leu |
| | | | 1075 | | | | | | | | 1080 | | | 1085 | | |
| | Phe | Asn | Ser | Leu | Gln | Tyr | Thr | Asn | Val | Val | Lys | Asp | Tyr | Trp | Gly | Asn |
| 35 | | 1090 | | | | | | 1095 | | | | | | 1100 | | |
| | Asp | Leu | Arg | Tyr | Asn | Lys | Glu | Tyr | Tyr | Met | Val | Asn | Ile | Asp | Tyr | Leu |
| | 1105 | | | | | 1110 | | | | | | 1115 | | | 1120 | |
| | Asn | Arg | Tyr | Met | Tyr | Ala | Asn | Ser | Arg | Gln | Ile | Val | Phe | Asn | Thr | Arg |
| | | | | | 1125 | | | | | | 1130 | | | | 1135 | |

ES 2 488 217 T3

Arg Asn Asn Asn Asp Phe Asn Glu Gly Tyr Lys Ile Ile Ile Lys Arg
 1140 1145 1150
 Ile Arg Gly Asn Thr Asn Asp Thr Arg Val Arg Gly Gly Asp Ile Leu
 1155 1160 1165
 5 Tyr Phe Asp Met Thr Ile Asn Asn Lys Ala Tyr Asn Leu Phe Met Lys
 1170 1175 1180
 Asn Glu Thr Met Tyr Ala Asp Asn His Ser Thr Glu Asp Ile Tyr Ala
 1185 1190 1195 1200
 Ile Gly Leu Arg Glu Gln Thr Lys Asp Ile Asn Asp Asn Ile Ile Phe
 10 1205 1210 1215
 Gln Ile Gln Pro Met Asn Asn Thr Tyr Tyr Tyr Ala Ser Gln Ile Phe
 1220 1225 1230
 Lys Ser Asn Phe Asn Gly Glu Asn Ile Ser Gly Ile Cys Ser Ile Gly
 1235 1240 1245
 15 Thr Tyr Arg Phe Arg Leu Gly Gly Asp Trp Tyr Arg His Asn Tyr Leu
 1250 1255 1260
 Val Pro Thr Val Lys Gln Gly Asn Tyr Ala Ser Leu Leu Glu Ser Thr
 1265 1270 1275 1280
 Ser Thr His Trp Gly Phe Val Pro Val Ser Glu
 20 1285 1290

 <210> 4
 <211> 1276
 <212> PRT
 25 <213> Clostridium botulinum Serotipo D

 <400> 4
 Met Thr Trp Pro Val Lys Asp Phe Asn Tyr Ser Asp Pro Val Asn Asp
 1 5 10 15
 30 Asn Asp Ile Leu Tyr Leu Arg Ile Pro Gln Asn Lys Leu Ile Thr Thr
 20 25 30
 Pro Val Lys Ala Phe Met Ile Thr Gln Asn Ile Trp Val Ile Pro Glu
 35 40 45
 Arg Phe Ser Ser Asp Thr Asn Pro Ser Leu Ser Lys Pro Pro Arg Pro
 35 50 55 60
 Thr Ser Lys Tyr Gln Ser Tyr Tyr Asp Pro Ser Tyr Leu Ser Thr Asp
 65 70 75 80
 Glu Gln Lys Asp Thr Phe Leu Lys Gly Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg
 85 90 95

ES 2 488 217 T3

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

ES 2 488 217 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | | |
| | Arg | Asn | Pro | Ala | Leu | Gln | Lys | Leu | Ser | Ser | Glu | Ser | Val | Val | Asp | Leu | |
| | | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | |
| | Phe | Thr | Lys | Val | Cys | Leu | Arg | Leu | Thr | Lys | Asn | Ser | Arg | Asp | Asp | Ser | |
| 5 | | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | |
| | Thr | Cys | Ile | Lys | Val | Lys | Asn | Asn | Arg | Leu | Pro | Tyr | Val | Ala | Asp | Lys | |
| | | 450 | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | | |
| | Asp | Ser | Ile | Ser | Gln | Glu | Ile | Phe | Glu | Asn | Lys | Ile | Ile | Thr | Asp | Glu | |
| | 465 | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | | 480 | |
| 10 | Thr | Asn | Val | Gln | Asn | Tyr | Ser | Asp | Lys | Phe | Ser | Leu | Asp | Glu | Ser | Ile | |
| | | | | 485 | | | | | | 490 | | | | | | 495 | |
| | Leu | Asp | Gly | Gln | Val | Pro | Ile | Asn | Pro | Glu | Ile | Val | Asp | Pro | Leu | Leu | |
| | | | 500 | | | | | | 505 | | | | | 510 | | | |
| | Pro | Asn | Val | Asn | Met | Glu | Pro | Leu | Asn | Leu | Pro | Gly | Glu | Glu | Ile | Val | |
| 15 | | | 515 | | | | | | 520 | | | | | 525 | | | |
| | Phe | Tyr | Asp | Asp | Ile | Thr | Lys | Tyr | Val | Asp | Tyr | Leu | Asn | Ser | Tyr | Tyr | |
| | | 530 | | | | 535 | | | | | | 540 | | | | | |
| | Tyr | Leu | Glu | Ser | Gln | Lys | Leu | Ser | Asn | Asn | Val | Glu | Asn | Ile | Thr | Leu | |
| | 545 | | | | 550 | | | | | | 555 | | | | | 560 | |
| 20 | Thr | Thr | Ser | Val | Glu | Glu | Ala | Leu | Gly | Tyr | Ser | Asn | Lys | Ile | Tyr | Thr | |
| | | | | 565 | | | | | | 570 | | | | | | 575 | |
| | Phe | Leu | Pro | Ser | Leu | Ala | Glu | Lys | Val | Asn | Lys | Gly | Val | Gln | Ala | Gly | |
| | | | 580 | | | | | | | 585 | | | | 590 | | | |
| | Leu | Phe | Leu | Asn | Trp | Ala | Asn | Glu | Val | Val | Glu | Asp | Phe | Thr | Thr | Asn | |
| 25 | | | 595 | | | | | 600 | | | | | 605 | | | | |
| | Ile | Met | Lys | Lys | Asp | Thr | Leu | Asp | Lys | Ile | Ser | Asp | Val | Ser | Val | Ile | |
| | | 610 | | | | 615 | | | | | | | 620 | | | | |
| | Ile | Pro | Tyr | Ile | Gly | Pro | Ala | Leu | Asn | Ile | Gly | Asn | Ser | Ala | Leu | Arg | |
| | 625 | | | | 630 | | | | | | 635 | | | | | 640 | |
| 30 | Gly | Asn | Phe | Asn | Gln | Ala | Phe | Ala | Thr | Ala | Gly | Val | Ala | Phe | Leu | Leu | |
| | | | | 645 | | | | | | | 650 | | | | | 655 | |
| | Glu | Gly | Phe | Pro | Glu | Phe | Thr | Ile | Pro | Ala | Leu | Gly | Val | Phe | Thr | Phe | |
| | | | 660 | | | | | | | 665 | | | | 670 | | | |
| | Tyr | Ser | Ser | Ile | Gln | Glu | Arg | Glu | Lys | Ile | Ile | Lys | Thr | Ile | Glu | Asn | |
| 35 | | | 675 | | | | | 680 | | | | | | 685 | | | |
| | Cys | Leu | Glu | Gln | Arg | Val | Lys | Arg | Trp | Lys | Asp | Ser | Tyr | Gln | Trp | Met | |
| | | 690 | | | | 695 | | | | | | 700 | | | | | |
| | Val | Ser | Asn | Trp | Leu | Ser | Arg | Ile | Thr | Thr | Gln | Phe | Asn | His | Ile | Asn | |
| | 705 | | | | | 710 | | | | | | 715 | | | | 720 | |

ES 2 488 217 T3

Tyr Gln Met Tyr Asp Ser Leu Ser Tyr Gln Ala Asp Ala Ile Lys Ala
 725 730 735
 Lys Ile Asp Leu Glu Tyr Lys Lys Tyr Ser Gly Ser Asp Lys Glu Asn
 740 745 750
 5 Ile Lys Ser Gln Val Glu Asn Leu Lys Asn Ser Leu Asp Val Lys Ile
 755 760 765
 Ser Glu Ala Met Asn Asn Ile Asn Lys Phe Ile Arg Glu Cys Ser Val
 770 775 780
 Thr Tyr Leu Phe Lys Asn Met Leu Pro Lys Val Ile Asp Glu Leu Asn
 10 785 790 795 800
 Lys Phe Asp Leu Arg Thr Lys Thr Glu Leu Ile Asn Leu Ile Asp Ser
 805 810 815
 His Asn Ile Ile Leu Val Gly Glu Val Asp Arg Leu Lys Ala Lys Val
 820 825 830
 15 Asn Glu Ser Phe Glu Asn Thr Met Pro Phe Asn Ile Phe Ser Tyr Thr
 835 840 845
 Asn Asn Ser Leu Leu Lys Asp Ile Ile Asn Glu Tyr Phe Asn Ser Ile
 850 855 860
 Asn Asp Ser Lys Ile Leu Ser Leu Gln Asn Lys Lys Asn Ala Leu Val
 20 865 870 875 880
 Asp Thr Ser Gly Tyr Asn Ala Glu Val Arg Val Gly Asp Asn Val Gln
 885 890 895
 Leu Asn Thr Ile Tyr Thr Asn Asp Phe Lys Leu Ser Ser Ser Gly Asp
 900 905 910
 25 Lys Ile Ile Val Asn Leu Asn Asn Asn Ile Leu Tyr Ser Ala Ile Tyr
 915 920 925
 Glu Asn Ser Ser Val Ser Phe Trp Ile Lys Ile Ser Lys Asp Leu Thr
 930 935 940
 Asn Ser His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Ser Ile Glu Gln Asn Ser
 30 945 950 955 960
 Gly Trp Lys Leu Cys Ile Arg Asn Gly Asn Ile Glu Trp Ile Leu Gln
 965 970 975
 Asp Val Asn Arg Lys Tyr Lys Ser Leu Ile Phe Asp Tyr Ser Glu Ser
 980 985 990
 35 Leu Ser His Thr Gly Tyr Thr Asn Lys Trp Phe Phe Val Thr Ile Thr
 995 1000 1005
 Asn Asn Ile Met Gly Tyr Met Lys Leu Tyr Ile Asn Gly Glu Leu Lys
 1010 1015 1020
 Gln Ser Gln Lys Ile Glu Asp Leu Asp Glu Val Lys Leu Asp Lys Thr

ES 2 488 217 T3

1025 1030 1035 1040
 Ile Val Phe Gly Ile Asp Glu Asn Ile Asp Glu Asn Gln Met Leu Trp
 1045 1050 1055
 Ile Arg Asp Phe Asn Ile Phe Ser Lys Glu Leu Ser Asn Glu Asp Ile
 5 1060 1065 1070
 Asn Ile Val Tyr Glu Gly Gln Ile Leu Arg Asn Val Ile Lys Asp Tyr
 1075 1080 1085
 Trp Gly Asn Pro Leu Lys Phe Asp Thr Glu Tyr Tyr Ile Ile Asn Asp
 1090 1095 1100
 10 Asn Tyr Ile Asp Arg Tyr Ile Ala Pro Glu Ser Asn Val Leu Val Leu
 1105 1110 1115 1120
 Val Gln Tyr Pro Asp Arg Ser Lys Leu Tyr Thr Gly Asn Pro Ile Thr
 1125 1130 1135
 Ile Lys Ser Val Ser Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Arg Ile Leu Asn Gly
 15 1140 1145 1150
 Asp Asn Ile Ile Leu His Met Leu Tyr Asn Ser Arg Lys Tyr Met Ile
 1155 1160 1165
 Ile Arg Asp Thr Asp Thr Ile Tyr Ala Thr Gln Gly Gly Glu Cys Ser
 1170 1175 1180
 20 Gln Asn Cys Val Tyr Ala Leu Lys Leu Gln Ser Asn Leu Gly Asn Tyr
 1185 1190 1195 1200
 Gly Ile Gly Ile Phe Ser Ile Lys Asn Ile Val Ser Lys Asn Lys Tyr
 1205 1210 1215
 Cys Ser Gln Ile Phe Ser Ser Phe Arg Glu Asn Thr Met Leu Leu Ala
 25 1220 1225 1230
 Asp Ile Tyr Lys Pro Trp Arg Phe Ser Phe Lys Asn Ala Tyr Thr Pro
 1235 1240 1245
 Val Ala Val Thr Asn Tyr Glu Thr Lys Leu Leu Ser Thr Ser Ser Phe
 1250 1255 1260
 30 Trp Lys Phe Ile Ser Arg Asp Pro Gly Trp Val Glu
 1265 1270 1275

 <210> 5
 <211> 1252
 35 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum Serotipo E

 <400> 5
 Met Pro Lys Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asp Arg

ES 2 488 217 T3

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

ES 2 488 217 T3

Ile Asn Lys Phe Asn Asp Ile Phe Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr Glu
 325 330 335
 Phe Asp Leu Ala Thr Lys Phe Gln Val Lys Cys Arg Gln Thr Tyr Ile
 340 345 350
 5 Gly Gln Tyr Lys Tyr Phe Lys Leu Ser Asn Leu Leu Asn Asp Ser Ile
 355 360 365
 Tyr Asn Ile Ser Glu Gly Tyr Asn Ile Asn Asn Leu Lys Val Asn Phe
 370 375 380
 Arg Gly Gln Asn Ala Asn Leu Asn Pro Arg Ile Ile Thr Pro Ile Thr
 10 385 390 395 400
 Gly Arg Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Arg Phe Cys Lys Asn Ile Val
 405 410 415
 Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys Ile Glu Ile Asn Asn Gly
 420 425 430
 15 Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Asn Ser Tyr Asn Asp Asp Asn Ile
 435 440 445
 Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Val Thr Ser Asn Asn Asn Tyr
 450 455 460
 Glu Asn Asp Leu Asp Gln Val Ile Leu Asn Phe Asn Ser Glu Ser Ala
 20 465 470 475 480
 Pro Gly Leu Ser Asp Glu Lys Leu Asn Leu Thr Ile Gln Asn Asp Ala
 485 490 495
 Tyr Ile Pro Lys Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Asp Ile Glu Gln His
 500 505 510
 25 Asp Val Asn Glu Leu Asn Val Phe Phe Tyr Leu Asp Ala Gln Lys Val
 515 520 525
 Pro Glu Gly Glu Asn Asn Val Asn Leu Thr Ser Ser Ile Asp Thr Ala
 530 535 540
 Leu Leu Glu Gln Pro Lys Ile Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Glu Phe Ile
 30 545 550 555 560
 Asn Asn Val Asn Lys Pro Val Gln Ala Ala Leu Phe Val Ser Trp Ile
 565 570 575
 Gln Gln Val Leu Val Asp Phe Thr Thr Glu Ala Asn Gln Lys Ser Thr
 580 585 590
 35 Val Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Ile Val Val Pro Tyr Ile Gly Leu
 595 600 605
 Ala Leu Asn Ile Gly Asn Glu Ala Gln Lys Gly Asn Phe Lys Asp Ala
 610 615 620
 Leu Glu Leu Leu Gly Ala Gly Ile Leu Leu Glu Phe Glu Pro Glu Leu

ES 2 488 217 T3

625 630 635 640
 Leu Ile Pro Thr Ile Leu Val Phe Thr Ile Lys Ser Phe Leu Gly Ser
 645 650 655
 Ser Asp Asn Lys Asn Lys Val Ile Lys Ala Ile Asn Asn Ala Leu Lys
 5 660 665 670
 Glu Arg Asp Glu Lys Trp Lys Glu Val Tyr Ser Phe Ile Val Ser Asn
 675 680 685
 Trp Met Thr Lys Ile Asn Thr Gln Phe Asn Lys Arg Lys Glu Gln Met
 690 695 700
 10 Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln Val Asn Ala Ile Lys Thr Ile Ile Glu
 705 710 715 720
 Ser Lys Tyr Asn Ser Tyr Thr Leu Glu Glu Lys Asn Glu Leu Thr Asn
 725 730 735
 Lys Tyr Asp Ile Lys Gln Ile Glu Asn Glu Leu Asn Gln Lys Val Ser
 15 740 745 750
 Ile Ala Met Asn Asn Ile Asp Arg Phe Leu Thr Glu Ser Ser Ile Ser
 755 760 765
 Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn Glu Val Lys Ile Asn Lys Leu Arg Glu
 770 775 780
 20 Tyr Asp Glu Asn Val Lys Thr Tyr Leu Leu Asn Tyr Ile Ile Gln His
 785 790 795 800
 Gly Ser Ile Leu Gly Glu Ser Gln Gln Glu Leu Asn Ser Met Val Thr
 805 810 815
 Asp Thr Leu Asn Asn Ser Ile Pro Phe Lys Leu Ser Ser Tyr Thr Asp
 25 820 825 830
 Asp Lys Ile Leu Ile Ser Tyr Phe Asn Lys Phe Phe Lys Arg Ile Lys
 835 840 845
 Ser Ser Ser Val Leu Asn Met Arg Tyr Lys Asn Asp Lys Tyr Val Asp
 850 855 860
 30 Thr Ser Gly Tyr Asp Ser Asn Ile Asn Ile Asn Gly Asp Val Tyr Lys
 865 870 875 880
 Tyr Pro Thr Asn Lys Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Asn Asp Lys Leu Ser
 885 890 895
 Glu Val Asn Ile Ser Gln Asn Asp Tyr Ile Ile Tyr Asp Asn Lys Tyr
 35 900 905 910
 Lys Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Asn Tyr Asp Asn
 915 920 925
 Lys Ile Val Asn Val Asn Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Arg
 930 935 940

ES 2 488 217 T3

Asp Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu Asn His Asn Glu Ile Ile
 945 950 955 960
 Trp Thr Leu Gln Asp Asn Ala Gly Ile Asn Gln Lys Leu Ala Phe Asn
 965 970 975
 5 Tyr Gly Asn Ala Asn Gly Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys Trp Ile Phe
 980 985 990
 Val Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Asn
 995 1000 1005
 Gly Asn Leu Ile Asp Gln Lys Ser Ile Leu Asn Leu Gly Asn Ile His
 10 1010 1015 1020
 Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile Val Asn Cys Ser Tyr Thr Arg
 1025 1030 1035 1040
 Tyr Ile Gly Ile Arg Tyr Phe Asn Ile Phe Asp Lys Glu Leu Asp Glu
 1045 1050 1055
 15 Thr Glu Ile Gln Thr Leu Tyr Ser Asn Glu Pro Asn Thr Asn Ile Leu
 1060 1065 1070
 Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asp Lys Glu Tyr Tyr Leu
 1075 1080 1085
 Leu Asn Val Leu Lys Pro Asn Asn Phe Ile Asp Arg Arg Lys Asp Ser
 20 1090 1095 1100
 Thr Leu Ser Ile Asn Asn Ile Arg Ser Thr Ile Leu Leu Ala Asn Arg
 1105 1110 1115 1120
 Leu Tyr Ser Gly Ile Lys Val Lys Ile Gln Arg Val Asn Asn Ser Ser
 1125 1130 1135
 25 Thr Asn Asp Asn Leu Val Arg Lys Asn Asp Gln Val Tyr Ile Asn Phe
 1140 1145 1150
 Val Ala Ser Lys Thr His Leu Phe Pro Leu Tyr Ala Asp Thr Ala Thr
 1155 1160 1165
 Thr Asn Lys Glu Lys Thr Ile Lys Ile Ser Ser Ser Gly Asn Arg Phe
 30 1170 1175 1180
 Asn Gln Val Val Val Met Asn Ser Val Gly Asn Asn Cys Thr Met Asn
 1185 1190 1195 1200
 Phe Lys Asn Asn Asn Gly Asn Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe Lys Ala
 1205 1210 1215
 35 Asp Thr Val Val Ala Ser Thr Trp Tyr Tyr Thr His Met Arg Asp His
 1220 1225 1230
 Thr Asn Ser Asn Gly Cys Phe Trp Asn Phe Ile Ser Glu Glu His Gly
 1235 1240 1245
 Trp Gln Glu Lys

ES 2 488 217 T3

1250

<210> 6

<211> 1274

5 <212> PRT

<213> Clostridium botulinum Serotipo F

<400> 6

Met Pro Val Ala Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asp
10 1 5 10 15
Asp Thr Ile Leu Tyr Met Gln Ile Pro Tyr Glu Glu Lys Ser Lys Lys
20 25 30
Tyr Tyr Lys Ala Phe Glu Ile Met Arg Asn Val Trp Ile Ile Pro Glu
35 40 45
15 Arg Asn Thr Ile Gly Thr Asn Pro Ser Asp Phe Asp Pro Pro Ala Ser
50 55 60
Leu Lys Asn Gly Ser Ser Ala Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Thr Thr
65 70 75 80
Asp Ala Glu Lys Asp Arg Tyr Leu Lys Thr Thr Ile Lys Leu Phe Lys
20 85 90 95
Arg Ile Asn Ser Asn Pro Ala Gly Lys Val Leu Leu Gln Glu Ile Ser
100 105 110
Tyr Ala Lys Pro Tyr Leu Gly Asn Asp His Thr Pro Ile Asp Glu Phe
115 120 125
25 Ser Pro Val Thr Arg Thr Thr Ser Val Asn Ile Lys Leu Ser Thr Asn
130 135 140
Val Glu Ser Ser Met Leu Leu Asn Leu Leu Val Leu Gly Ala Gly Pro
145 150 155 160
Asp Ile Phe Glu Ser Cys Cys Tyr Pro Val Arg Lys Leu Ile Asp Pro
30 165 170 175
Asp Val Val Tyr Asp Pro Ser Asn Tyr Gly Phe Gly Ser Ile Asn Ile
180 185 190
Val Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Glu Tyr Thr Phe Asn Asp Ile Ser Gly
195 200 205
35 Gly His Asn Ser Ser Thr Glu Ser Phe Ile Ala Asp Pro Ala Ile Ser
210 215 220
Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala Arg
225 230 235 240
Gly Val Thr Tyr Glu Glu Thr Ile Glu Val Lys Gln Ala Pro Leu Met

ES 2 488 217 T3

245 250 255
 Ile Ala Glu Lys Pro Ile Arg Leu Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly Gly
 260 265 270
 Gln Asp Leu Asn Ile Ile Thr Ser Ala Met Lys Glu Lys Ile Tyr Asn
 5 275 280 285
 Asn Leu Leu Ala Asn Tyr Glu Lys Ile Ala Thr Arg Leu Ser Glu Val
 290 295 300
 Asn Ser Ala Pro Pro Glu Tyr Asp Ile Asn Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe
 305 310 315 320
 10 Gln Trp Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asn Ala Asp Gly Ser Tyr Thr Val
 325 330 335
 Asn Glu Asn Lys Phe Asn Glu Ile Tyr Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr
 340 345 350
 Glu Ser Asp Leu Ala Asn Lys Phe Lys Val Lys Cys Arg Asn Thr Tyr
 15 355 360 365
 Phe Ile Lys Tyr Glu Phe Leu Lys Val Pro Asn Leu Leu Asp Asp Asp
 370 375 380
 Ile Tyr Thr Val Ser Glu Gly Phe Asn Ile Gly Asn Leu Ala Val Asn
 385 390 395 400
 20 Asn Arg Gly Gln Ser Ile Lys Leu Asn Pro Lys Ile Ile Asp Ser Ile
 405 410 415
 Pro Asp Lys Gly Leu Val Glu Lys Ile Val Lys Phe Cys Lys Ser Val
 420 425 430
 Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Ala Pro Pro Arg Leu Cys Ile Arg Val
 25 435 440 445
 Asn Asn Ser Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Ser Ser Tyr Asn Glu
 450 455 460
 Asn Asp Ile Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Thr Asn Leu Asn
 465 470 475 480
 30 Asn Asn Tyr Arg Asn Asn Leu Asp Glu Val Ile Leu Asp Tyr Asn Ser
 485 490 495
 Gln Thr Ile Pro Gln Ile Ser Asn Arg Thr Leu Asn Thr Leu Val Gln
 500 505 510
 Asp Asn Ser Tyr Val Pro Arg Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Glu Ile
 35 515 520 525
 Glu Glu Tyr Asp Val Val Asp Phe Asn Val Phe Phe Tyr Leu His Ala
 530 535 540
 Gln Lys Val Pro Glu Gly Glu Thr Asn Ile Ser Leu Thr Ser Ser Ile
 545 550 555 560

ES 2 488 217 T3

Asp Thr Ala Leu Leu Glu Glu Ser Lys Asp Ile Phe Phe Ser Ser Glu
 565 570 575
 Phe Ile Asp Thr Ile Asn Lys Pro Val Asn Ala Ala Leu Phe Ile Asp
 580 585 590
 5 Trp Ile Ser Lys Val Ile Arg Asp Phe Thr Thr Glu Ala Thr Gln Lys
 595 600 605
 Ser Thr Val Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Leu Ile Val Pro Tyr Val
 610 615 620
 Gly Leu Ala Leu Asn Ile Ile Ile Glu Ala Glu Lys Gly Asn Phe Glu
 10 625 630 635 640
 Glu Ala Phe Glu Leu Leu Gly Val Gly Ile Leu Leu Glu Phe Val Pro
 645 650 655
 Glu Leu Thr Ile Pro Val Ile Leu Val Phe Thr Ile Lys Ser Tyr Ile
 660 665 670
 15 Asp Ser Tyr Glu Asn Lys Asn Lys Ala Ile Lys Ala Ile Asn Asn Ser
 675 680 685
 Leu Ile Glu Arg Glu Ala Lys Trp Lys Glu Ile Tyr Ser Trp Ile Val
 690 695 700
 Ser Asn Trp Leu Thr Arg Ile Asn Thr Gln Phe Asn Lys Arg Lys Glu
 20 705 710 715 720
 Gln Met Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln Val Asp Ala Ile Lys Thr Ala
 725 730 735
 Ile Glu Tyr Lys Tyr Asn Asn Tyr Thr Ser Asp Glu Lys Asn Arg Leu
 740 745 750
 25 Glu Ser Glu Tyr Asn Ile Asn Asn Ile Glu Glu Glu Leu Asn Lys Lys
 755 760 765
 Val Ser Leu Ala Met Lys Asn Ile Glu Arg Phe Met Thr Glu Ser Ser
 770 775 780
 Ile Ser Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn Glu Ala Lys Val Gly Lys Leu
 30 785 790 795 800
 Lys Lys Tyr Asp Asn His Val Lys Ser Asp Leu Leu Asn Tyr Ile Leu
 805 810 815
 Asp His Arg Ser Ile Leu Gly Glu Gln Thr Asn Glu Leu Ser Asp Leu
 820 825 830
 35 Val Thr Ser Thr Leu Asn Ser Ser Ile Pro Phe Glu Leu Ser Ser Tyr
 835 840 845
 Thr Asn Asp Lys Ile Leu Ile Ile Tyr Phe Asn Arg Leu Tyr Lys Lys
 850 855 860
 Ile Lys Asp Ser Ser Ile Leu Asp Met Arg Tyr Glu Asn Asn Lys Phe

ES 2 488 217 T3

865 870 875 880
 Ile Asp Ile Ser Gly Tyr Gly Ser Asn Ile Ser Ile Asn Gly Asn Val
 885 890 895
 Tyr Ile Tyr Ser Thr Asn Arg Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Asn Ser Arg
 5 900 905 910
 Leu Ser Glu Val Asn Ile Ala Gln Asn Asn Asp Ile Ile Tyr Asn Ser
 915 920 925
 Arg Tyr Gln Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Lys His
 930 935 940
 10 Tyr Lys Pro Met Asn His Asn Arg Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met
 945 950 955 960
 Gly Asn Asn Asn Ser Gly Trp Lys Ile Ser Leu Arg Thr Val Arg Asp
 965 970 975
 Cys Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Ser Gly Asn Lys Glu Asn
 15 980 985 990
 Leu Ile Phe Arg Tyr Glu Glu Leu Asn Arg Ile Ser Asn Tyr Ile Asn
 995 1000 1005
 Lys Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu Gly Asn Ser Arg
 1010 1015 1020
 20 Ile Tyr Ile Asn Gly Asn Leu Ile Val Glu Lys Ser Ile Ser Asn Leu
 1025 1030 1035 1040
 Gly Asp Ile His Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile Val Gly Cys
 1045 1050 1055
 Asp Asp Glu Thr Tyr Val Gly Ile Arg Tyr Phe Lys Val Phe Asn Thr
 25 1060 1065 1070
 Glu Leu Asp Lys Thr Glu Ile Glu Thr Leu Tyr Ser Asn Glu Pro Asp
 1075 1080 1085
 Pro Ser Ile Leu Lys Asn Tyr Trp Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asn Lys
 1090 1095 1100
 30 Lys Tyr Tyr Leu Phe Asn Leu Leu Arg Lys Asp Lys Tyr Ile Thr Leu
 1105 1110 1115 1120
 Asn Ser Gly Ile Leu Asn Ile Asn Gln Gln Arg Gly Val Thr Glu Gly
 1125 1130 1135
 Ser Val Phe Leu Asn Tyr Lys Leu Tyr Glu Gly Val Glu Val Ile Ile
 35 1140 1145 1150
 Arg Lys Asn Gly Pro Ile Asp Ile Ser Asn Thr Asp Asn Phe Val Arg
 1155 1160 1165
 Lys Asn Asp Leu Ala Tyr Ile Asn Val Val Asp Arg Gly Val Glu Tyr
 1170 1175 1180

ES 2 488 217 T3

Arg Leu Tyr Ala Asp Thr Lys Ser Glu Lys Glu Lys Ile Ile Arg Thr
 1185 1190 1195 1200
 Ser Asn Leu Asn Asp Ser Leu Gly Gln Ile Ile Val Met Asp Ser Ile
 1205 1210 1215
 5 Gly Asn Asn Cys Thr Met Asn Phe Gln Asn Asn Asn Gly Ser Asn Ile
 1220 1225 1230
 Gly Leu Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Leu Val Ala Ser Ser Trp Tyr
 1235 1240 1245
 Tyr Asn Asn Ile Arg Arg Asn Thr Ser Ser Asn Gly Cys Phe Trp Ser
 10 1250 1255 1260
 Ser Ile Ser Lys Glu Asn Gly Trp Lys Glu
 1265 1270

 <210> 7
 15 <211> 1297
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum Serotipo G

 <400> 7
 20 Met Pro Val Asn Ile Lys Asn Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asn Asn
 1 5 10 15
 Asp Asp Ile Ile Met Met Glu Pro Phe Asn Asp Pro Gly Pro Gly Thr
 20 25 30
 Tyr Tyr Lys Ala Phe Arg Ile Ile Asp Arg Ile Trp Ile Val Pro Glu
 25 35 40 45
 Arg Phe Thr Tyr Gly Phe Gln Pro Asp Gln Phe Asn Ala Ser Thr Gly
 50 55 60
 Val Phe Ser Lys Asp Val Tyr Glu Tyr Tyr Asp Pro Thr Tyr Leu Lys
 65 70 75 80
 30 Thr Asp Ala Glu Lys Asp Lys Phe Leu Lys Thr Met Ile Lys Leu Phe
 85 90 95
 Asn Arg Ile Asn Ser Lys Pro Ser Gly Gln Arg Leu Leu Asp Met Ile
 100 105 110
 Val Asp Ala Ile Pro Tyr Leu Gly Asn Ala Ser Thr Pro Pro Asp Lys
 35 115 120 125
 Phe Ala Ala Asn Val Ala Asn Val Ser Ile Asn Lys Lys Ile Ile Gln
 130 135 140
 Pro Gly Ala Glu Asp Gln Ile Lys Gly Leu Met Thr Asn Leu Ile Ile
 145 150 155 160

ES 2 488 217 T3

Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Ser Asp Asn Phe Thr Asp Ser Met Ile
 165 170 175

Met Asn Gly His Ser Pro Ile Ser Glu Gly Phe Gly Ala Arg Met Met
 180 185 190

5 Ile Arg Phe Cys Pro Ser Cys Leu Asn Val Phe Asn Asn Val Gln Glu
 195 200 205

Asn Lys Asp Thr Ser Ile Phe Ser Arg Arg Ala Tyr Phe Ala Asp Pro
 210 215 220

10 Ala Leu Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr
 225 230 235 240

Gly Ile Lys Ile Ser Asn Leu Pro Ile Thr Pro Asn Thr Lys Glu Phe
 245 250 255

Phe Met Gln His Ser Asp Pro Val Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe
 260 265 270

15 Gly Gly His Asp Pro Ser Val Ile Ser Pro Ser Thr Asp Met Asn Ile
 275 280 285

Tyr Asn Lys Ala Leu Gln Asn Phe Gln Asp Ile Ala Asn Arg Leu Asn
 290 295 300

20 Ile Val Ser Ser Ala Gln Gly Ser Gly Ile Asp Ile Ser Leu Tyr Lys
 305 310 315 320

Gln Ile Tyr Lys Asn Lys Tyr Asp Phe Val Glu Asp Pro Asn Gly Lys
 325 330 335

Tyr Ser Val Asp Lys Asp Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ala Leu Met
 340 345 350

25 Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn Leu Ala Gly Glu Tyr Gly Ile Lys Thr
 355 360 365

Arg Tyr Ser Tyr Phe Ser Glu Tyr Leu Pro Pro Ile Lys Thr Glu Lys
 370 375 380

30 Leu Leu Asp Asn Thr Ile Tyr Thr Gln Asn Glu Gly Phe Asn Ile Ala
 385 390 395 400

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

Lys Glu Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Leu Glu His Leu Val Ile Tyr Arg
 420 425 430

35 Ile Ala Met Cys Lys Pro Val Met Tyr Lys Asn Thr Gly Lys Ser Glu
 435 440 445

Gln Cys Ile Ile Val Asn Asn Glu Asp Leu Phe Phe Ile Ala Asn Lys
 450 455 460

Asp Ser Phe Ser Lys Asp Leu Ala Lys Ala Glu Thr Ile Ala Tyr Asn

ES 2 488 217 T3

465 470 475 480
 Thr Gln Asn Asn Thr Ile Glu Asn Asn Phe Ser Ile Asp Gln Leu Ile
 485 490 495
 Leu Asp Asn Asp Leu Ser Ser Gly Ile Asp Leu Pro Asn Glu Asn Thr
 5 500 505 510
 Glu Pro Phe Thr Asn Phe Asp Asp Ile Asp Ile Pro Val Tyr Ile Lys
 515 520 525
 Gln Ser Ala Leu Lys Lys Ile Phe Val Asp Gly Asp Ser Leu Phe Glu
 530 535 540
 10 Tyr Leu His Ala Gln Thr Phe Pro Ser Asn Ile Glu Asn Leu Gln Leu
 545 550 555 560
 Thr Asn Ser Leu Asn Asp Ala Leu Arg Asn Asn Asn Lys Val Tyr Thr
 565 570 575
 Phe Phe Ser Thr Asn Leu Val Glu Lys Ala Asn Thr Val Val Gly Ala
 15 580 585 590
 Ser Leu Phe Val Asn Trp Val Lys Gly Val Ile Asp Asp Phe Thr Ser
 595 600 605
 Glu Ser Thr Gln Lys Ser Thr Ile Asp Lys Val Ser Asp Val Ser Ile
 610 615 620
 20 Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Val Gly Asn Glu Thr Ala
 625 630 635 640
 Lys Glu Asn Phe Lys Asn Ala Phe Glu Ile Gly Gly Ala Ala Ile Leu
 645 650 655
 Met Glu Phe Ile Pro Glu Leu Ile Val Pro Ile Val Gly Phe Phe Thr
 25 660 665 670
 Leu Glu Ser Tyr Val Gly Asn Lys Gly His Ile Ile Met Thr Ile Ser
 675 680 685
 Asn Ala Leu Lys Lys Arg Asp Gln Lys Trp Thr Asp Met Tyr Gly Leu
 690 695 700
 30 Ile Val Ser Gln Trp Leu Ser Thr Val Asn Thr Gln Phe Tyr Thr Ile
 705 710 715 720
 Lys Glu Arg Met Tyr Asn Ala Leu Asn Asn Gln Ser Gln Ala Ile Glu
 725 730 735
 Lys Ile Ile Glu Asp Gln Tyr Asn Arg Tyr Ser Glu Glu Asp Lys Met
 35 740 745 750
 Asn Ile Asn Ile Asp Phe Asn Asp Ile Asp Phe Lys Leu Asn Gln Ser
 755 760 765
 Ile Asn Leu Ala Ile Asn Asn Ile Asp Asp Phe Ile Asn Gln Cys Ser
 770 775 780

ES 2 488 217 T3

Ile Ser Tyr Leu Met Asn Arg Met Ile Pro Leu Ala Val Lys Lys Leu
785 790 795 800
Lys Asp Phe Asp Asp Asn Leu Lys Arg Asp Leu Leu Glu Tyr Ile Asp
805 810 815
5 Thr Asn Glu Leu Tyr Leu Leu Asp Glu Val Asn Ile Leu Lys Ser Lys
820 825 830
Val Asn Arg His Leu Lys Asp Ser Ile Pro Phe Asp Leu Ser Leu Tyr
835 840 845
Thr Lys Asp Thr Ile Leu Ile Gln Val Phe Asn Asn Tyr Ile Ser Asn
10 850 855 860
Ile Ser Ser Asn Ala Ile Leu Ser Leu Ser Tyr Arg Gly Gly Arg Leu
865 870 875 880
Ile Asp Ser Ser Gly Tyr Gly Ala Thr Met Asn Val Gly Ser Asp Val
885 890 895
15 Ile Phe Asn Asp Ile Gly Asn Gly Gln Phe Lys Leu Asn Asn Ser Glu
900 905 910
Asn Ser Asn Ile Thr Ala His Gln Ser Lys Phe Val Val Tyr Asp Ser
915 920 925
Met Phe Asp Asn Phe Ser Ile Asn Phe Trp Val Arg Thr Pro Lys Tyr
20 930 935 940
Asn Asn Asn Asp Ile Gln Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Tyr Thr Ile Ile
945 950 955 960
Ser Cys Ile Lys Asn Asp Ser Gly Trp Lys Val Ser Ile Lys Gly Asn
965 970 975
25 Arg Ile Ile Trp Thr Leu Ile Asp Val Asn Ala Lys Ser Lys Ser Ile
980 985 990
Phe Phe Glu Tyr Ser Ile Lys Asp Asn Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys
995 1000 1005
Trp Phe Ser Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asn Ala Asn Ile
30 1010 1015 1020
Tyr Ile Asn Gly Ser Leu Lys Lys Ser Glu Lys Ile Leu Asn Leu Asp
1025 1030 1035 1040
Arg Ile Asn Ser Ser Asn Asp Ile Asp Phe Lys Leu Ile Asn Cys Thr
1045 1050 1055
35 Asp Thr Thr Lys Phe Val Trp Ile Lys Asp Phe Asn Ile Phe Gly Arg
1060 1065 1070
Glu Leu Asn Ala Thr Glu Val Ser Ser Leu Tyr Trp Ile Gln Ser Ser
1075 1080 1085
Thr Asn Thr Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Arg Tyr Asp Thr

ES 2 488 217 T3

1090 1095 1100
 Gln Tyr Tyr Leu Phe Asn Gln Gly Met Gln Asn Ile Tyr Ile Lys Tyr
 1105 1110 1115 1120
 Phe Ser Lys Ala Ser Met Gly Glu Thr Ala Pro Arg Thr Asn Phe Asn
 5 1125 1130 1135
 Asn Ala Ala Ile Asn Tyr Gln Asn Leu Tyr Leu Gly Leu Arg Phe Ile
 1140 1145 1150
 Ile Lys Lys Ala Ser Asn Ser Arg Asn Ile Asn Asn Asp Asn Ile Val
 1155 1160 1165
 10 Arg Glu Gly Asp Tyr Ile Tyr Leu Asn Ile Asp Asn Ile Ser Asp Glu
 1170 1175 1180
 Ser Tyr Arg Val Tyr Val Leu Val Asn Ser Lys Glu Ile Gln Thr Gln
 1185 1190 1195 1200
 Leu Phe Leu Ala Pro Ile Asn Asp Asp Pro Thr Phe Tyr Asp Val Leu
 15 1205 1210 1215
 Gln Ile Lys Lys Tyr Tyr Glu Lys Thr Thr Tyr Asn Cys Gln Ile Leu
 1220 1225 1230
 Cys Glu Lys Asp Thr Lys Thr Phe Gly Leu Phe Gly Ile Gly Lys Phe
 1235 1240 1245
 20 Val Lys Asp Tyr Gly Tyr Val Trp Asp Thr Tyr Asp Asn Tyr Phe Cys
 1250 1255 1260
 Ile Ser Gln Trp Tyr Leu Arg Arg Ile Ser Glu Asn Ile Asn Lys Leu
 1265 1270 1275 1280
 Arg Leu Gly Cys Asn Trp Gln Phe Ile Pro Val Asp Glu Gly Trp Thr
 25 1285 1290 1295
 Glu

<210> 8

30 <211> 1315

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 8

35 Met Pro Ile Thr Ile Asn Asn Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Val Asn Asn
 1 5 10 15
 Asp Thr Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Tyr Cys Lys Gly Leu Asp Ile
 20 25 30
 Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Val Pro Glu

ES 2 488 217 T3

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

ES 2 488 217 T3

Ser Ile Met Tyr Gly Phe Thr Glu Ile Glu Leu Gly Lys Lys Phe Asn
 355 360 365

Ile Lys Thr Arg Leu Ser Tyr Phe Ser Met Asn His Asp Pro Val Lys
 370 375 380

5 Ile Pro Asn Leu Leu Asp Asp Thr Ile Tyr Asn Asp Thr Glu Gly Phe
 385 390 395 400

Asn Ile Glu Ser Lys Asp Leu Lys Ser Glu Tyr Lys Gly Gln Asn Met
 405 410 415

Arg Val Asn Thr Asn Ala Phe Arg Asn Val Asp Gly Ser Gly Leu Val
 10 420 425 430

Ser Lys Leu Ile Gly Leu Cys Lys Lys Ile Ile Pro Pro Thr Asn Ile
 435 440 445

Arg Glu Asn Leu Tyr Asn Arg Thr Ala Ser Leu Thr Asp Leu Gly Gly
 450 455 460

15 Glu Leu Cys Ile Lys Ile Lys Asn Glu Asp Leu Thr Phe Ile Ala Glu
 465 470 475 480

Lys Asn Ser Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gln Asp Glu Ile Val Ser Tyr
 485 490 495

Asn Thr Lys Asn Lys Pro Leu Asn Phe Asn Tyr Ser Leu Asp Lys Ile
 20 500 505 510

Ile Val Asp Tyr Asn Leu Gln Ser Lys Ile Thr Leu Pro Asn Asp Arg
 515 520 525

Thr Thr Pro Val Thr Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Pro Glu Tyr Lys Ser
 530 535 540

25 Asn Ala Ala Ser Thr Ile Glu Ile His Asn Ile Asp Asp Asn Thr Ile
 545 550 555 560

Tyr Gln Tyr Leu Tyr Ala Gln Lys Ser Pro Thr Thr Leu Gln Arg Ile
 565 570 575

Thr Met Thr Asn Ser Val Asp Asp Ala Leu Ile Asn Ser Thr Lys Ile
 30 580 585 590

Tyr Ser Tyr Phe Pro Ser Val Ile Ser Lys Val Asn Gln Gly Ala Gln
 595 600 605

Gly Ile Leu Phe Leu Gln Trp Val Arg Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr
 610 615 620

35 Asn Glu Ser Ser Gln Lys Thr Thr Ile Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser
 625 630 635 640

Thr Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Val Lys Gln Gly
 645 650 655

Tyr Glu Gly Asn Phe Ile Gly Ala Leu Glu Thr Thr Gly Val Val Leu

ES 2 488 217 T3

Ile Ser Ser Met Lys Lys His Ser Leu Ser Ile Gly Ser Gly Trp Ser
 980 985 990
 Val Ser Leu Lys Gly Asn Asn Leu Ile Trp Thr Leu Lys Asp Ser Ala
 995 1000 1005
 5 Gly Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe Arg Asp Leu Pro Asp Lys Phe Asn
 1010 1015 1020
 Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val Phe Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg
 1025 1030 1035 1040
 Leu Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ile Asn Gly Val Leu Met Gly Ser Ala
 10 1045 1050 1055
 Glu Ile Thr Gly Leu Gly Ala Ile Arg Glu Asp Asn Asn Ile Thr Leu
 1060 1065 1070
 Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn Asn Asn Gln Tyr Val Ser Ile Asp Lys
 1075 1080 1085
 15 Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Leu Asn Pro Lys Glu Ile Glu Lys Leu
 1090 1095 1100
 Tyr Thr Ser Tyr Leu Ser Ile Thr Phe Leu Arg Asp Phe Trp Gly Asn
 1105 1110 1115 1120
 Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Tyr Tyr Leu Ile Pro Val Ala Ser Ser
 20 1125 1130 1135
 Ser Lys Asp Val Gln Leu Lys Asn Ile Thr Asp Tyr Met Tyr Leu Thr
 1140 1145 1150
 Asn Ala Pro Ser Tyr Thr Asn Gly Lys Leu Asn Ile Tyr Tyr Arg Arg
 1155 1160 1165
 25 Leu Tyr Asn Gly Leu Lys Phe Ile Ile Lys Arg Tyr Thr Pro Asn Asn
 1170 1175 1180
 Glu Ile Asp Ser Phe Val Lys Ser Gly Asp Phe Ile Lys Leu Tyr Val
 1185 1190 1195 1200
 Ser Tyr Asn Asn Asn Glu His Ile Val Gly Tyr Pro Lys Asp Gly Asn
 30 1205 1210 1215
 Ala Phe Asn Asn Leu Asp Arg Ile Leu Arg Val Gly Tyr Asn Ala Pro
 1220 1225 1230
 Gly Ile Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu Ala Val Lys Leu Arg Asp Leu
 1235 1240 1245
 35 Lys Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu Tyr Asp Asp Lys Asn Ala Ser
 1250 1255 1260
 Leu Gly Leu Val Gly Thr His Asn Gly Gln Ile Gly Asn Asp Pro Asn
 1265 1270 1275 1280
 Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp Tyr Phe Asn His Leu Lys Asp

ES 2 488 217 T3

1285 1290 1295
 Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro Thr Asp Glu Gly Trp
 1300 1305 1310
 Thr Asn Asp
 5 1315

 <210> 9
 <211> 1268
 <212> PRT
 10 <213> Clostridium baratii

 <400> 9
 Met Pro Val Asn Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asn Asn
 1 5 10 15
 15 Thr Thr Ile Leu Tyr Met Lys Met Pro Tyr Tyr Glu Asp Ser Asn Lys
 20 25 30
 Tyr Tyr Lys Ala Phe Glu Ile Met Asp Asn Val Trp Ile Ile Pro Glu
 35 40 45
 Arg Asn Ile Ile Gly Lys Lys Pro Ser Asp Phe Tyr Pro Pro Ile Ser
 20 50 55 60
 Leu Asp Ser Gly Ser Ser Ala Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Thr Thr
 65 70 75 80
 Asp Ala Glu Lys Asp Arg Phe Leu Lys Thr Val Ile Lys Leu Phe Asn
 85 90 95
 25 Arg Ile Asn Ser Asn Pro Ala Gly Gln Val Leu Leu Glu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Asn Gly Lys Pro Tyr Leu Gly Asn Asp His Thr Ala Val Asn Glu Phe
 115 120 125
 Cys Ala Asn Asn Arg Ser Thr Ser Val Glu Ile Lys Glu Ser Asn Gly
 30 130 135 140
 Thr Thr Asp Ser Met Leu Leu Asn Leu Val Ile Leu Gly Pro Gly Pro
 145 150 155 160
 Asn Ile Leu Glu Cys Ser Thr Phe Pro Val Arg Ile Phe Pro Asn Asn
 165 170 175
 35 Ile Ala Tyr Asp Pro Ser Glu Lys Gly Phe Gly Ser Ile Gln Leu Met
 180 185 190
 Ser Phe Ser Thr Glu Tyr Glu Tyr Ala Phe Asn Asp Asn Thr Asp Leu
 195 200 205
 Phe Ile Ala Asp Pro Ala Ile Ser Leu Ala His Glu Leu Ile His Val

ES 2 488 217 T3

Phe Phe Tyr Leu Tyr Ala Gln Lys Ala Pro Glu Gly Glu Ser Ala Ile
 530 535 540
 Ser Leu Thr Ser Ser Val Asn Thr Ala Leu Leu Asp Ala Ser Lys Val
 545 550 555 560
 5 Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Phe Ile Asn Thr Val Asn Lys Pro Val
 565 570 575
 Gln Ala Ala Leu Phe Ile Ser Trp Ile Gln Gln Val Ile Asn Asp Phe
 580 585 590
 Thr Thr Glu Ala Thr Gln Lys Ser Thr Ile Asp Lys Ile Ala Asp Ile
 10 595 600 605
 Ser Leu Ile Val Pro Tyr Val Gly Leu Ala Leu Asn Ile Gly Asn Glu
 610 615 620
 Val Gln Lys Gly Asn Phe Lys Glu Ala Ile Glu Leu Leu Gly Ala Gly
 625 630 635 640
 15 Ile Leu Leu Glu Phe Val Pro Glu Leu Leu Ile Pro Thr Ile Leu Val
 645 650 655
 Phe Thr Ile Lys Ser Phe Ile Asn Ser Asp Asp Ser Lys Asn Lys Ile
 660 665 670
 Ile Lys Ala Ile Asn Asn Ala Leu Arg Glu Arg Glu Leu Lys Trp Lys
 20 675 680 685
 Glu Val Tyr Ser Trp Ile Val Ser Asn Trp Leu Thr Arg Ile Asn Thr
 690 695 700
 Gln Phe Asn Lys Arg Lys Glu Gln Met Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln
 705 710 715 720
 25 Val Asp Gly Ile Lys Lys Ile Ile Glu Tyr Lys Tyr Asn Asn Tyr Thr
 725 730 735
 Leu Asp Glu Lys Asn Arg Leu Arg Ala Glu Tyr Asn Ile Tyr Ser Ile
 740 745 750
 Lys Glu Glu Leu Asn Lys Lys Val Ser Leu Ala Met Gln Asn Ile Asp
 30 755 760 765
 Arg Phe Leu Thr Glu Ser Ser Ile Ser Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn
 770 775 780
 Glu Ala Lys Ile Asn Lys Leu Ser Glu Tyr Asp Lys Arg Val Asn Gln
 785 790 795 800
 35 Tyr Leu Leu Asn Tyr Ile Leu Glu Asn Ser Ser Thr Leu Gly Thr Ser
 805 810 815
 Ser Val Pro Glu Leu Asn Asn Leu Val Ser Asn Thr Leu Asn Asn Ser
 820 825 830
 Ile Pro Phe Glu Leu Ser Glu Tyr Thr Asn Asp Lys Ile Leu Ile His

ES 2 488 217 T3

Thr Asp Asn Phe Val Arg Lys Asn Asp Thr Val Tyr Ile Asn Val Val
 1155 1160 1165
 Asp Gly Asn Ser Glu Tyr Gln Leu Tyr Ala Asp Val Ser Thr Ser Ala
 1170 1175 1180
 5 Val Glu Lys Thr Ile Lys Leu Arg Arg Ile Ser Asn Ser Asn Tyr Asn
 1185 1190 1195 1200
 Ser Asn Gln Met Ile Ile Met Asp Ser Ile Gly Asp Asn Cys Thr Met
 1205 1210 1215
 Asn Phe Lys Thr Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly Leu Leu Gly Phe His
 10 1220 1225 1230
 Leu Asn Asn Leu Val Ala Ser Ser Trp Tyr Tyr Lys Asn Ile Arg Asn
 1235 1240 1245
 Asn Thr Arg Asn Asn Gly Cys Phe Trp Ser Phe Ile Ser Lys Glu His
 1250 1255 1260
 15 Gly Trp Gln Glu
 1265

 <210> 10
 <211> 1251
 20 <212> PRT
 <213> Clostridium butyricum

 <400> 10
 Met Pro Thr Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asn Arg
 25 1 5 10 15
 Thr Ile Leu Tyr Ile Lys Pro Gly Gly Cys Gln Gln Phe Tyr Lys Ser
 20 25 30
 Phe Asn Ile Met Lys Asn Ile Trp Ile Ile Pro Glu Arg Asn Val Ile
 35 40 45
 30 Gly Thr Ile Pro Gln Asp Phe Leu Pro Pro Thr Ser Leu Lys Asn Gly
 50 55 60
 Asp Ser Ser Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Lys
 65 70 75 80
 Asp Lys Phe Leu Lys Ile Val Thr Lys Ile Phe Asn Arg Ile Asn Asp
 35 85 90 95
 Asn Leu Ser Gly Arg Ile Leu Leu Glu Glu Leu Ser Lys Ala Asn Pro
 100 105 110
 Tyr Leu Gly Asn Asp Asn Thr Pro Asp Gly Asp Phe Ile Ile Asn Asp
 115 120 125

ES 2 488 217 T3

Ala Ser Ala Val Pro Ile Gln Phe Ser Asn Gly Ser Gln Ser Ile Leu
 130 135 140
 Leu Pro Asn Val Ile Ile Met Gly Ala Glu Pro Asp Leu Phe Glu Thr
 145 150 155 160
 5 Asn Ser Ser Asn Ile Ser Leu Arg Asn Asn Tyr Met Pro Ser Asn His
 165 170 175
 Gly Phe Gly Ser Ile Ala Ile Val Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Ser Phe
 180 185 190
 Arg Phe Lys Asp Asn Ser Met Asn Glu Phe Ile Gln Asp Pro Ala Leu
 10 195 200 205
 Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Ser Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala
 210 215 220
 Lys Gly Ile Thr Thr Lys Tyr Thr Ile Thr Gln Lys Gln Asn Pro Leu
 225 230 235 240
 15 Ile Thr Asn Ile Arg Gly Thr Asn Ile Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly
 245 250 255
 Gly Thr Asp Leu Asn Ile Ile Thr Ser Ala Gln Ser Asn Asp Ile Tyr
 260 265 270
 Thr Asn Leu Leu Ala Asp Tyr Lys Lys Ile Ala Ser Lys Leu Ser Lys
 20 275 280 285
 Val Gln Val Ser Asn Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Lys Asp Val Phe Glu
 290 295 300
 Ala Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asp Ala Ser Gly Ile Tyr Ser Val Asn
 305 310 315 320
 25 Ile Asn Lys Phe Asn Asp Ile Phe Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr Glu
 325 330 335
 Phe Asp Leu Ala Thr Lys Phe Gln Val Lys Cys Arg Gln Thr Tyr Ile
 340 345 350
 Gly Gln Tyr Lys Tyr Phe Lys Leu Ser Asn Leu Leu Asn Asp Ser Ile
 30 355 360 365
 Tyr Asn Ile Ser Glu Gly Tyr Asn Ile Asn Asn Leu Lys Val Asn Phe
 370 375 380
 Arg Gly Gln Asn Ala Asn Leu Asn Pro Arg Ile Ile Thr Pro Ile Thr
 385 390 395 400
 35 Gly Arg Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Arg Phe Cys Lys Asn Ile Val
 405 410 415
 Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys Ile Glu Ile Asn Asn Gly
 420 425 430
 Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Asn Ser Tyr Asn Asp Asp Asn Ile

ES 2 488 217 T3

Ile Ala Met Asn Asn Ile Asp Arg Phe Leu Thr Glu Ser Ser Ile Ser
 755 760 765
 Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn Glu Val Lys Ile Asn Lys Leu Arg Glu
 770 775 780
 5 Tyr Asp Glu Asn Val Lys Thr Tyr Leu Leu Asp Tyr Ile Ile Lys His
 785 790 795 800
 Gly Ser Ile Leu Gly Glu Ser Gln Gln Glu Leu Asn Ser Met Val Ile
 805 810 815
 Asp Thr Leu Asn Asn Ser Ile Pro Phe Lys Leu Ser Ser Tyr Thr Asp
 10 820 825 830
 Asp Lys Ile Leu Ile Ser Tyr Phe Asn Lys Phe Phe Lys Arg Ile Lys
 835 840 845
 Ser Ser Ser Val Leu Asn Met Arg Tyr Lys Asn Asp Lys Tyr Val Asp
 850 855 860
 15 Thr Ser Gly Tyr Asp Ser Asn Ile Asn Ile Asn Gly Asp Val Tyr Lys
 865 870 875 880
 Tyr Pro Thr Asn Lys Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Asn Asp Lys Leu Ser
 885 890 895
 Glu Val Asn Ile Ser Gln Asn Asp Tyr Ile Ile Tyr Asp Asn Lys Tyr
 20 900 905 910
 Lys Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Asn Tyr Asp Asn
 915 920 925
 Lys Ile Val Asn Val Asn Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Arg
 930 935 940
 25 Asp Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu Asn His Asn Glu Ile Ile
 945 950 955 960
 Trp Thr Leu Gln Asp Asn Ser Gly Ile Asn Gln Lys Leu Ala Phe Asn
 965 970 975
 Tyr Gly Asn Ala Asn Gly Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys Trp Ile Phe
 30 980 985 990
 Val Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Asn
 995 1000 1005
 Gly Asn Leu Ile Asp Lys Lys Ser Ile Leu Asn Leu Gly Asn Ile His
 1010 1015 1020
 35 Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile Val Asn Cys Ser Tyr Thr Arg
 1025 1030 1035 1040
 Tyr Ile Gly Ile Arg Tyr Phe Asn Ile Phe Asp Lys Glu Leu Asp Glu
 1045 1050 1055
 Thr Glu Ile Gln Thr Leu Tyr Asn Asn Glu Pro Asn Ala Asn Ile Leu

ES 2 488 217 T3

1060 1065 1070
 Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asp Lys Glu Tyr Tyr Leu
 1075 1080 1085
 Leu Asn Val Leu Lys Pro Asn Asn Phe Ile Asn Arg Arg Thr Asp Ser
 5 1090 1095 1100
 Thr Leu Ser Ile Asn Asn Ile Arg Ser Thr Ile Leu Leu Ala Asn Arg
 1105 1110 1115 1120
 Leu Tyr Ser Gly Ile Lys Val Lys Ile Gln Arg Val Asn Asn Ser Ser
 1125 1130 1135
 10 Thr Asn Asp Asn Leu Val Arg Lys Asn Asp Gln Val Tyr Ile Asn Phe
 1140 1145 1150
 Val Ala Ser Lys Thr His Leu Leu Pro Leu Tyr Ala Asp Thr Ala Thr
 1155 1160 1165
 Thr Asn Lys Glu Lys Thr Ile Lys Ile Ser Ser Ser Gly Asn Arg Phe
 15 1170 1175 1180
 Asn Gln Val Val Val Met Asn Ser Val Gly Asn Cys Thr Met Asn Phe
 1185 1190 1195 1200
 Lys Asn Asn Asn Gly Asn Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe Lys Ala Asp
 1205 1210 1215
 20 Thr Val Val Ala Ser Thr Trp Tyr Tyr Thr His Met Arg Asp Asn Thr
 1220 1225 1230
 Asn Ser Asn Gly Phe Phe Trp Asn Phe Ile Ser Glu Glu His Gly Trp
 1235 1240 1245
 Gln Glu Lys
 25 1250

 <210> 11
 <211> 1035
 <212> PRT
 30 <213> Bos taurus

 <400> 11
 Met Gly Ser Lys Arg Ser Val Pro Ser Arg His Arg Ser Leu Thr Thr
 1 5 10 15
 35 Tyr Glu Val Met Phe Ala Val Leu Phe Val Ile Leu Val Ala Leu Cys
 20 25 30
 Ala Gly Leu Ile Ala Val Ser Trp Leu Ser Ile Gln Gly Ser Val Lys
 35 40 45
 Asp Ala Ala Phe Gly Lys Ser His Glu Ala Arg Gly Thr Leu Lys Ile

ES 2 488 217 T3

Phe Cys Phe Trp Ile Gln Asp Leu Asn Asp Asp Asn Glu Trp Glu Arg
 370 375 380
 Thr Gln Gly Ser Thr Phe Pro Pro Ser Thr Gly Pro Thr Phe Asp His
 385 390 395 400
 5 Thr Phe Gly Asn Glu Ser Gly Phe Tyr Ile Ser Thr Pro Thr Gly Pro
 405 410 415
 Gly Gly Arg Arg Glu Arg Val Gly Leu Leu Thr Leu Pro Leu Asp Pro
 420 425 430
 Thr Pro Glu Gln Ala Cys Leu Ser Phe Trp Tyr Tyr Met Tyr Gly Glu
 10 435 440 445
 Asn Val Tyr Lys Leu Ser Ile Asn Ile Ser Ser Asp Gln Asn Met Glu
 450 455 460
 Lys Thr Ile Phe Gln Lys Glu Gly Asn Tyr Gly Gln Asn Trp Asn Tyr
 465 470 475 480
 15 Gly Gln Val Thr Leu Asn Glu Thr Val Glu Phe Lys Val Ser Phe Tyr
 485 490 495
 Gly Phe Lys Asn Gln Ile Leu Ser Asp Ile Ala Leu Asp Asp Ile Ser
 500 505 510
 Leu Thr Tyr Gly Ile Cys Asn Val Ser Val Tyr Pro Glu Pro Thr Leu
 20 515 520 525
 Val Pro Thr Pro Pro Pro Glu Leu Pro Thr Asp Cys Gly Gly Pro His
 530 535 540
 Asp Leu Trp Glu Pro Asn Thr Thr Phe Thr Ser Ile Asn Phe Pro Asn
 545 550 555 560
 25 Ser Tyr Pro Asn Gln Ala Phe Cys Ile Trp Asn Leu Asn Ala Gln Lys
 565 570 575
 Gly Lys Asn Ile Gln Leu His Phe Gln Glu Phe Asp Leu Glu Asn Ile
 580 585 590
 Ala Asp Val Val Glu Ile Arg Asp Gly Glu Gly Asp Asp Ser Leu Phe
 30 595 600 605
 Leu Ala Val Tyr Thr Gly Pro Gly Pro Val Asn Asp Val Phe Ser Thr
 610 615 620
 Thr Asn Arg Met Thr Val Leu Phe Ile Thr Asp Asn Met Leu Ala Lys
 625 630 635 640
 35 Gln Gly Phe Lys Ala Asn Phe Thr Thr Gly Tyr Gly Leu Gly Ile Pro
 645 650 655
 Glu Pro Cys Lys Glu Asp Asn Phe Gln Cys Lys Asp Gly Glu Cys Ile
 660 665 670
 Pro Leu Val Asn Leu Cys Asp Gly Phe Pro His Cys Lys Asp Gly Ser

ES 2 488 217 T3

675 680 685
 Asp Glu Ala His Cys Val Arg Leu Phe Asn Gly Thr Thr Asp Ser Ser
 690 695 700
 Gly Leu Val Gln Phe Arg Ile Gln Ser Ile Trp His Val Ala Cys Ala
 5 705 710 715 720
 Glu Asn Trp Thr Thr Gln Ile Ser Asp Asp Val Cys Gln Leu Leu Gly
 725 730 735
 Leu Gly Thr Gly Asn Ser Ser Val Pro Thr Phe Ser Thr Gly Gly Gly
 740 745 750
 10 Pro Tyr Val Asn Leu Asn Thr Ala Pro Asn Gly Ser Leu Ile Leu Thr
 755 760 765
 Pro Ser Gln Gln Cys Leu Glu Asp Ser Leu Ile Leu Leu Gln Cys Asn
 770 775 780
 Tyr Lys Ser Cys Gly Lys Lys Leu Val Thr Gln Glu Val Ser Pro Lys
 15 785 790 795 800
 Ile Val Gly Gly Ser Asp Ser Arg Glu Gly Ala Trp Pro Trp Val Val
 805 810 815
 Ala Leu Tyr Phe Asp Asp Gln Gln Val Cys Gly Ala Ser Leu Val Ser
 820 825 830
 20 Arg Asp Trp Leu Val Ser Ala Ala His Cys Val Tyr Gly Arg Asn Met
 835 840 845
 Glu Pro Ser Lys Trp Lys Ala Val Leu Gly Leu His Met Ala Ser Asn
 850 855 860
 Leu Thr Ser Pro Gln Ile Glu Thr Arg Leu Ile Asp Gln Ile Val Ile
 25 865 870 875 880
 Asn Pro His Tyr Asn Lys Arg Arg Lys Asn Asn Asp Ile Ala Met Met
 885 890 895
 His Leu Glu Met Lys Val Asn Tyr Thr Asp Tyr Ile Gln Pro Ile Cys
 900 905 910
 30 Leu Pro Glu Glu Asn Gln Val Phe Pro Pro Gly Arg Ile Cys Ser Ile
 915 920 925
 Ala Gly Trp Gly Ala Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Thr Ala Asp Val Leu
 930 935 940
 Gln Glu Ala Asp Val Pro Leu Leu Ser Asn Glu Lys Cys Gln Gln Gln
 35 945 950 955 960
 Met Pro Glu Tyr Asn Ile Thr Glu Asn Met Val Cys Ala Gly Tyr Glu
 965 970 975
 Ala Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met
 980 985 990

ES 2 488 217 T3

Cys Gln Glu Asn Asn Arg Trp Leu Leu Ala Gly Val Thr Ser Phe Gly
 995 1000 1005
 Tyr Gln Cys Ala Leu Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Pro
 1010 1015 1020
 5 Arg Phe Thr Glu Trp Ile Gln Ser Phe Leu His
 1025 1030 1035

<210> 12
 <211> 183
 10 <212> PRT
 <213> Rinovirus humano C

<400> 12
 Gly Pro Glu His Glu Phe Leu Asn Ala Leu Ile Arg Arg Asn Cys His
 15 1 5 10 15
 Ile Ile Thr Thr Asp Lys Gly Glu Phe Asn Leu Leu Gly Ile Tyr Ser
 20 25 30
 Asn Cys Ala Val Val Pro Thr His Ala Glu Pro Gly Asp Val Val Asp
 35 40 45
 20 Ile Asp Gly Arg Leu Val Arg Val Leu Lys Gln Gln Val Leu Thr Asp
 50 55 60
 Met Asn Asp Val Asp Thr Glu Val Thr Val Leu Trp Leu Asp Gln Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Arg Asp Ile Arg Arg Phe Ile Pro Glu His Gln Gln Asp
 25 85 90 95
 Trp His Asn Ile His Leu Ala Thr Asn Val Thr Lys Phe Pro Met Leu
 100 105 110
 Asn Val Glu Val Gly His Thr Val Pro Tyr Gly Glu Ile Asn Leu Ser
 115 120 125
 30 Gly Asn Ala Thr Cys Arg Leu Tyr Lys Tyr Asp Tyr Pro Thr Gln Pro
 130 135 140
 Gly Gln Cys Gly Ala Val Leu Ala Asn Thr Gly Asn Ile Ile Gly Ile
 145 150 155 160
 His Val Gly Gly Asn Gly Arg Val Gly Tyr Ala Ala Ala Leu Leu Arg
 35 165 170 175
 Lys Tyr Phe Ala Glu Glu Gln
 180

<210> 13

ES 2 488 217 T3

<211> 183

<212> PRT

<213> Enterovirus humano 71

5 <400> 13

Gly Pro Ser Leu Asp Phe Ala Leu Ser Leu Leu Arg Arg Asn Val Arg

1 5 10 15

Gln Val Gln Thr Asp Gln Gly His Phe Thr Met Leu Gly Val Arg Asp

20 25 30

10 Arg Leu Ala Val Leu Pro Arg His Ser Gln Pro Gly Lys Thr Ile Trp

35 40 45

Ile Glu His Lys Leu Val Asn Val Leu Asp Ala Val Glu Leu Val Asp

50 55 60

Glu Gln Gly Val Asn Leu Glu Leu Thr Leu Ile Thr Leu Asp Thr Asn

15 65 70 75 80

Glu Lys Phe Arg Asp Ile Thr Lys Phe Ile Pro Glu Asn Ile Ser Thr

85 90 95

Ala Ser Asp Ala Thr Leu Val Ile Asn Thr Glu His Met Pro Ser Met

100 105 110

20 Phe Val Pro Val Gly Asp Val Val Gln Tyr Gly Xaa Leu Asn Leu Ser

115 120 125

Gly Lys Pro Thr His Arg Thr Met Met Tyr Asn Phe Pro Thr Lys Ala

130 135 140

Gly Gln Cys Gly Gly Val Val Thr Ser Val Gly Lys Val Ile Gly Ile

25 145 150 155 160

His Ile Gly Gly Asn Gly Arg Gln Gly Phe Cys Ala Gly Leu Lys Arg

165 170 175

Ser Tyr Phe Ala Ser Glu Gln

180

30

<210> 14

<211> 3054

<212> PRT

<213> Potyvirus

35

<400> 14

Met Ala Leu Ile Phe Gly Thr Val Asn Ala Asn Ile Leu Lys Glu Val

1 5 10 15

ES 2 488 217 T3

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

ES 2 488 217 T3

325 330 335
 Val Ser Val Glu Arg Cys Gly Glu Val Ala Ala Ile Leu Thr Gln Ala
 340 345 350
 Leu Ser Pro Cys Gly Lys Ile Thr Cys Lys Arg Cys Met Val Glu Thr
 5 355 360 365
 Pro Asp Ile Val Glu Gly Glu Ser Gly Glu Ser Val Thr Asn Gln Gly
 370 375 380
 Lys Leu Leu Ala Met Leu Lys Glu Gln Tyr Pro Asp Phe Pro Met Ala
 385 390 395 400
 10 Glu Lys Leu Leu Thr Arg Phe Leu Gln Gln Lys Ser Leu Val Asn Thr
 405 410 415
 Asn Leu Thr Ala Cys Val Ser Val Lys Gln Leu Ile Gly Asp Arg Lys
 420 425 430
 Gln Ala Pro Phe Thr His Val Leu Ala Val Ser Glu Ile Leu Phe Lys
 15 435 440 445
 Gly Asn Lys Leu Thr Gly Ala Asp Leu Glu Glu Ala Ser Thr His Met
 450 455 460
 Leu Glu Ile Ala Arg Phe Leu Asn Asn Arg Thr Glu Asn Met Arg Ile
 465 470 475 480
 20 Gly His Leu Gly Ser Phe Arg Asn Lys Ile Ser Ser Lys Ala His Val
 485 490 495
 Asn Asn Ala Leu Met Cys Asp Asn Gln Leu Asp Gln Asn Gly Asn Phe
 500 505 510
 Ile Trp Gly Leu Arg Gly Ala His Ala Lys Arg Phe Leu Lys Gly Phe
 25 515 520 525
 Phe Thr Glu Ile Asp Pro Asn Glu Gly Tyr Asp Lys Tyr Val Ile Arg
 530 535 540
 Lys His Ile Arg Gly Ser Arg Lys Leu Ala Ile Gly Asn Leu Ile Met
 545 550 555 560
 30 Ser Thr Asp Phe Gln Thr Leu Arg Gln Gln Ile Gln Gly Glu Thr Ile
 565 570 575
 Glu Arg Lys Glu Ile Gly Asn His Cys Ile Ser Met Arg Asn Gly Asn
 580 585 590
 Tyr Val Tyr Pro Cys Cys Cys Val Thr Leu Glu Asp Gly Lys Ala Gln
 35 595 600 605
 Tyr Ser Asp Leu Lys His Pro Thr Lys Arg His Leu Val Ile Gly Asn
 610 615 620
 Ser Gly Asp Ser Lys Tyr Leu Asp Leu Pro Val Leu Asn Glu Glu Lys
 625 630 635 640

ES 2 488 217 T3

Met Tyr Ile Ala Asn Glu Gly Tyr Cys Tyr Met Asn Ile Phe Phe Ala
645 650 655

Leu Leu Val Asn Val Lys Glu Glu Asp Ala Lys Asp Phe Thr Lys Phe
660 665 670

5 Ile Arg Asp Thr Ile Val Pro Lys Leu Gly Ala Trp Pro Thr Met Gln
675 680 685

Asp Val Ala Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Ser Ile Leu Tyr Pro Asp Val
690 695 700

Leu Arg Ala Glu Leu Pro Arg Ile Leu Val Asp His Asp Asn Lys Thr
10 705 710 715 720

Met His Val Leu Asp Ser Tyr Gly Ser Arg Thr Thr Gly Tyr His Met
725 730 735

Leu Lys Met Asn Thr Thr Ser Gln Leu Ile Glu Phe Val His Ser Gly
740 745 750

15 Leu Glu Ser Glu Met Lys Thr Tyr Asn Val Gly Gly Met Asn Arg Asp
755 760 765

Val Val Thr Gln Gly Ala Ile Glu Met Leu Ile Lys Ser Ile Tyr Lys
770 775 780

Pro His Leu Met Lys Gln Leu Leu Glu Glu Glu Pro Tyr Ile Ile Val
20 785 790 795 800

Leu Ala Ile Val Ser Pro Ser Ile Leu Ile Ala Met Tyr Asn Ser Gly
805 810 815

Thr Phe Glu Gln Ala Leu Gln Met Trp Leu Pro Asn Thr Met Arg Leu
820 825 830

25 Ala Asn Leu Ala Ala Ile Leu Ser Ala Leu Ala Gln Lys Leu Thr Leu
835 840 845

Ala Asp Leu Phe Val Gln Gln Arg Asn Leu Ile Asn Glu Tyr Ala Gln
850 855 860

Val Ile Leu Asp Asn Leu Ile Asp Gly Val Arg Val Asn His Ser Leu
30 865 870 875 880

Ser Leu Ala Met Glu Ile Val Thr Ile Lys Leu Ala Thr Gln Glu Met
885 890 895

Asp Met Ala Leu Arg Glu Gly Gly Tyr Ala Val Thr Ser Glu Lys Val
900 905 910

35 His Glu Met Leu Glu Lys Asn Tyr Val Lys Ala Leu Lys Asp Ala Trp
915 920 925

Asp Glu Leu Thr Trp Leu Glu Lys Phe Ser Ala Ile Arg His Ser Arg
930 935 940

Lys Leu Leu Lys Phe Gly Arg Lys Pro Leu Ile Met Lys Asn Thr Val

ES 2 488 217 T3

945 950 955 960
 Asp Cys Gly Gly His Ile Asp Leu Ser Val Lys Ser Leu Phe Lys Phe
 965 970 975
 His Leu Glu Leu Leu Lys Gly Thr Ile Ser Arg Ala Val Asn Gly Gly
 5 980 985 990
 Ala Arg Lys Val Arg Val Ala Lys Asn Ala Met Thr Lys Gly Val Phe
 995 1000 1005
 Leu Lys Ile Tyr Ser Met Leu Pro Asp Val Tyr Lys Phe Ile Thr Val
 1010 1015 1020
 10 Ser Ser Val Leu Ser Leu Leu Leu Thr Phe Leu Phe Gln Ile Asp Cys
 1025 1030 1035 1040
 Met Ile Arg Ala His Arg Glu Ala Lys Val Ala Ala Gln Leu Gln Lys
 1045 1050 1055
 Glu Ser Glu Trp Asp Asn Ile Ile Asn Arg Thr Phe Gln Tyr Ser Lys
 15 1060 1065 1070
 Leu Glu Asn Pro Ile Gly Tyr Arg Ser Thr Ala Glu Glu Arg Leu Gln
 1075 1080 1085
 Ser Glu His Pro Glu Ala Phe Glu Tyr Tyr Lys Phe Cys Ile Gly Lys
 1090 1095 1100
 20 Glu Asp Leu Val Glu Gln Ala Lys Gln Pro Glu Ile Ala Tyr Phe Glu
 1105 1110 1115 1120
 Lys Ile Ile Ala Phe Ile Thr Leu Val Leu Met Ala Phe Asp Ala Glu
 1125 1130 1135
 Arg Ser Asp Gly Val Phe Lys Ile Leu Asn Lys Phe Lys Gly Ile Leu
 25 1140 1145 1150
 Ser Ser Thr Glu Arg Glu Ile Ile Tyr Thr Gln Ser Leu Asp Asp Tyr
 1155 1160 1165
 Val Thr Thr Phe Asp Asp Asn Met Thr Ile Asn Leu Glu Leu Asn Met
 1170 1175 1180
 30 Asp Glu Leu His Lys Thr Ser Leu Pro Gly Val Thr Phe Lys Gln Trp
 1185 1190 1195 1200
 Trp Asn Asn Gln Ile Ser Arg Gly Asn Val Lys Pro His Tyr Arg Thr
 1205 1210 1215
 Glu Gly His Phe Met Glu Phe Thr Arg Asp Thr Ala Ala Ser Val Ala
 35 1220 1225 1230
 Ser Glu Ile Ser His Ser Pro Ala Arg Asp Phe Leu Val Arg Gly Ala
 1235 1240 1245
 Val Gly Ser Gly Lys Ser Thr Gly Leu Pro Tyr His Leu Ser Lys Arg
 1250 1255 1260

ES 2 488 217 T3

Gly Arg Val Leu Met Leu Glu Pro Thr Arg Pro Leu Thr Asp Asn Met
 1265 1270 1275 1280
 His Lys Gln Leu Arg Ser Glu Pro Phe Asn Cys Phe Pro Thr Leu Arg
 1285 1290 1295
 5 Met Arg Gly Lys Ser Thr Phe Gly Ser Ser Pro Ile Thr Val Met Thr
 1300 1305 1310
 Ser Gly Phe Ala Leu His His Phe Ala Arg Asn Ile Ala Glu Val Lys
 1315 1320 1325
 Thr Tyr Asp Phe Val Ile Ile Asp Glu Cys His Val Asn Asp Ala Ser
 10 1330 1335 1340
 Ala Ile Ala Phe Arg Asn Leu Leu Phe Glu His Glu Phe Glu Gly Lys
 1345 1350 1355 1360
 Val Leu Lys Val Ser Ala Thr Pro Pro Gly Arg Glu Val Glu Phe Thr
 1365 1370 1375
 15 Thr Gln Phe Pro Val Lys Leu Lys Ile Glu Glu Ala Leu Ser Phe Gln
 1380 1385 1390
 Glu Phe Val Ser Leu Gln Gly Thr Gly Ala Asn Ala Asp Val Ile Ser
 1395 1400 1405
 Cys Gly Asp Asn Ile Leu Val Tyr Val Ala Ser Tyr Asn Asp Val Asp
 20 1410 1415 1420
 Ser Leu Gly Lys Leu Leu Val Gln Lys Gly Tyr Lys Val Ser Lys Ile
 1425 1430 1435 1440
 Asp Gly Arg Thr Met Lys Ser Gly Gly Thr Glu Ile Ile Thr Glu Gly
 1445 1450 1455
 25 Thr Ser Val Lys Lys His Phe Ile Val Ala Thr Asn Ile Ile Glu Asn
 1460 1465 1470
 Gly Val Thr Ile Asp Ile Asp Val Val Val Asp Phe Gly Thr Lys Val
 1475 1480 1485
 Val Pro Val Leu Asp Val Asp Asn Arg Ala Val Gln Tyr Asn Lys Thr
 30 1490 1495 1500
 Val Val Ser Tyr Gly Glu Arg Ile Gln Lys Leu Gly Arg Val Gly Arg
 1505 1510 1515 1520
 His Lys Glu Gly Val Ala Leu Arg Ile Gly Gln Thr Asn Lys Thr Leu
 1525 1530 1535
 35 Val Glu Ile Pro Glu Met Val Ala Thr Glu Ala Ala Phe Leu Cys Phe
 1540 1545 1550
 Met Tyr Asn Leu Pro Val Thr Thr Gln Ser Val Ser Thr Thr Leu Leu
 1555 1560 1565
 Glu Asn Ala Thr Leu Leu Gln Ala Arg Thr Met Ala Gln Phe Glu Leu

ES 2 488 217 T3

1570 1575 1580
 Ser Tyr Phe Tyr Thr Ile Asn Phe Val Arg Phe Asp Gly Ser Met His
 1585 1590 1595 1600
 Pro Val Ile His Asp Lys Leu Lys Arg Phe Lys Leu His Thr Cys Glu
 5 1605 1610 1615
 Thr Phe Leu Asn Lys Leu Ala Ile Pro Asn Lys Gly Leu Ser Ser Trp
 1620 1625 1630
 Leu Thr Ser Gly Glu Tyr Lys Arg Leu Gly Tyr Ile Ala Glu Asp Ala
 1635 1640 1645
 10 Gly Ile Arg Ile Pro Phe Val Cys Lys Glu Ile Pro Asp Ser Leu His
 1650 1655 1660
 Glu Glu Ile Trp His Ile Val Val Ala His Lys Gly Asp Ser Gly Ile
 1665 1670 1675 1680
 Gly Arg Leu Thr Ser Val Gln Ala Ala Lys Val Val Tyr Thr Leu Gln
 15 1685 1690 1695
 Thr Asp Val His Ser Ile Ala Arg Thr Leu Ala Cys Ile Asn Arg Arg
 1700 1705 1710
 Ile Ala Asp Glu Gln Met Lys Gln Ser His Phe Glu Ala Ala Thr Gly
 1715 1720 1725
 20 Arg Ala Phe Ser Phe Thr Asn Tyr Ser Ile Gln Ser Ile Phe Asp Thr
 1730 1735 1740
 Leu Lys Ala Asn Tyr Ala Thr Lys His Thr Lys Glu Asn Ile Ala Val
 1745 1750 1755 1760
 Leu Gln Gln Ala Lys Asp Gln Leu Leu Glu Phe Ser Asn Leu Ala Lys
 25 1765 1770 1775
 Asp Gln Asp Val Thr Gly Ile Ile Gln Asp Phe Asn His Leu Glu Thr
 1780 1785 1790
 Ile Tyr Leu Gln Ser Asp Ser Glu Val Ala Lys His Leu Lys Leu Lys
 1795 1800 1805
 30 Ser His Trp Asn Lys Ser Gln Ile Thr Arg Asp Ile Ile Ile Ala Leu
 1810 1815 1820
 Ser Val Leu Ile Gly Gly Gly Trp Met Leu Ala Thr Tyr Phe Lys Asp
 1825 1830 1835 1840
 Lys Phe Asn Glu Pro Val Tyr Phe Gln Gly Lys Lys Asn Gln Lys His
 35 1845 1850 1855
 Lys Leu Lys Met Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Gly Gln Tyr Glu Val
 1860 1865 1870
 Ala Ala Glu Pro Glu Ala Leu Glu His Tyr Phe Gly Ser Ala Tyr Asn
 1875 1880 1885

ES 2 488 217 T3

Asn Lys Gly Lys Arg Lys Gly Thr Thr Arg Gly Met Gly Ala Lys Ser
 1890 1895 1900
 Arg Lys Phe Ile Asn Met Tyr Gly Phe Asp Pro Thr Asp Phe Ser Tyr
 1905 1910 1915 1920
 5 Ile Arg Phe Val Asp Pro Leu Thr Gly His Thr Ile Asp Glu Ser Thr
 1925 1930 1935
 Asn Ala Pro Ile Asp Leu Val Gln His Glu Phe Gly Lys Val Arg Thr
 1940 1945 1950
 Arg Met Leu Ile Asp Asp Glu Ile Glu Pro Gln Ser Leu Ser Thr His
 10 1955 1960 1965
 Thr Thr Ile His Ala Tyr Leu Val Asn Ser Gly Thr Lys Lys Val Leu
 1970 1975 1980
 Lys Val Asp Leu Thr Pro His Ser Ser Leu Arg Ala Ser Glu Lys Ser
 1985 1990 1995 2000
 15 Thr Ala Ile Met Gly Phe Pro Glu Arg Glu Asn Glu Leu Arg Gln Thr
 2005 2010 2015
 Gly Met Ala Val Pro Val Ala Tyr Asp Gln Leu Pro Pro Lys Asn Glu
 2020 2025 2030
 Asp Leu Thr Phe Glu Gly Glu Ser Leu Phe Lys Gly Pro Arg Asp Tyr
 20 2035 2040 2045
 Asn Pro Ile Ser Ser Thr Ile Cys His Leu Thr Asn Glu Ser Asp Gly
 2050 2055 2060
 His Thr Thr Ser Leu Tyr Gly Ile Gly Phe Gly Pro Phe Ile Ile Thr
 2065 2070 2075 2080
 25 Asn Lys His Leu Phe Arg Arg Asn Asn Gly Thr Leu Leu Val Gln Ser
 2085 2090 2095
 Leu His Gly Val Phe Lys Val Lys Asn Thr Thr Thr Leu Gln Gln His
 2100 2105 2110
 Leu Ile Asp Gly Arg Asp Met Ile Ile Ile Arg Met Pro Lys Asp Phe
 30 2115 2120 2125
 Pro Pro Phe Pro Gln Lys Leu Lys Phe Arg Glu Pro Gln Arg Glu Glu
 2130 2135 2140
 Arg Ile Cys Leu Val Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys Ser Met Ser Ser
 2145 2150 2155 2160
 35 Met Val Ser Asp Thr Ser Cys Thr Phe Pro Ser Ser Asp Gly Ile Phe
 2165 2170 2175
 Trp Lys His Trp Ile Gln Thr Lys Asp Gly Gln Cys Gly Ser Pro Leu
 2180 2185 2190
 Val Ser Thr Arg Asp Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser Ala Ser Asn

ES 2 488 217 T3

| | | | | | | |
|----|---|-----------------|---------------------|------|------|--|
| | 2195 | | 2200 | | 2205 | |
| | Phe Thr Asn Thr Asn Asn Tyr | Phe Thr Ser Val | Pro Lys Asn Phe Met | | | |
| | 2210 | 2215 | 2220 | | | |
| | Glu Leu Leu Thr Asn Gln Glu Ala Gln Gln Trp Val Ser Gly Trp Arg | | | | | |
| 5 | 2225 | 2230 | 2235 | 2240 | | |
| | Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val Phe Met Ser | | | | | |
| | 2245 | 2250 | 2255 | | | |
| | Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr Gln Leu Met | | | | | |
| | 2260 | 2265 | 2270 | | | |
| 10 | Asn Glu Leu Val Tyr Ser Gln Gly Glu Lys Arg Lys Trp Val Val Glu | | | | | |
| | 2275 | 2280 | 2285 | | | |
| | Ala Leu Ser Gly Asn Leu Arg Pro Val Ala Glu Cys Pro Ser Gln Leu | | | | | |
| | 2290 | 2295 | 2300 | | | |
| | Val Thr Lys His Val Val Lys Gly Lys Cys Pro Leu Phe Glu Leu Tyr | | | | | |
| 15 | 2305 | 2310 | 2315 | 2320 | | |
| | Leu Gln Leu Asn Pro Glu Lys Glu Ala Tyr Phe Lys Pro Met Met Gly | | | | | |
| | 2325 | 2330 | 2335 | | | |
| | Ala Tyr Lys Pro Ser Arg Leu Asn Arg Glu Ala Phe Leu Lys Asp Ile | | | | | |
| | 2340 | 2345 | 2350 | | | |
| 20 | Leu Lys Tyr Ala Ser Glu Ile Glu Ile Gly Asn Val Asp Cys Asp Leu | | | | | |
| | 2355 | 2360 | 2365 | | | |
| | Leu Glu Leu Ala Ile Ser Met Leu Val Thr Lys Leu Lys Ala Leu Gly | | | | | |
| | 2370 | 2375 | 2380 | | | |
| | Phe Pro Thr Val Asn Tyr Ile Thr Asp Pro Glu Glu Ile Phe Ser Ala | | | | | |
| 25 | 2385 | 2390 | 2395 | 2400 | | |
| | Leu Asn Met Lys Ala Ala Met Gly Ala Leu Tyr Lys Gly Lys Lys Lys | | | | | |
| | 2405 | 2410 | 2415 | | | |
| | Glu Ala Leu Ser Glu Leu Thr Leu Asp Glu Gln Glu Ala Met Leu Lys | | | | | |
| | 2420 | 2425 | 2430 | | | |
| 30 | Ala Ser Cys Leu Arg Leu Tyr Thr Gly Lys Leu Gly Ile Trp Asn Gly | | | | | |
| | 2435 | 2440 | 2445 | | | |
| | Ser Leu Lys Ala Glu Leu Arg Pro Ile Glu Lys Val Glu Asn Asn Lys | | | | | |
| | 2450 | 2455 | 2460 | | | |
| | Thr Arg Thr Phe Thr Ala Ala Pro Ile Asp Thr Leu Leu Ala Gly Lys | | | | | |
| 35 | 2465 | 2470 | 2475 | 2480 | | |
| | Val Cys Val Asp Asp Phe Asn Asn Gln Phe Tyr Asp Leu Asn Ile Lys | | | | | |
| | 2485 | 2490 | 2495 | | | |
| | Ala Pro Trp Thr Val Gly Met Thr Lys Phe Tyr Gln Gly Trp Asn Glu | | | | | |
| | 2500 | 2505 | 2510 | | | |

ES 2 488 217 T3

Leu Met Glu Ala Leu Pro Ser Gly Trp Val Tyr Cys Asp Ala Asp Gly
 2515 2520 2525
 Ser Gln Phe Asp Ser Ser Leu Thr Pro Phe Leu Ile Asn Ala Val Leu
 2530 2535 2540
 5 Lys Val Arg Leu Ala Phe Met Glu Glu Trp Asp Ile Gly Glu Gln Met
 2545 2550 2555 2560
 Leu Arg Asn Leu Tyr Thr Glu Ile Val Tyr Thr Pro Ile Leu Thr Pro
 2565 2570 2575
 Asp Gly Thr Ile Ile Lys Lys His Lys Gly Asn Asn Ser Gly Gln Pro
 10 2580 2585 2590
 Ser Thr Val Val Asp Asn Thr Leu Met Val Ile Ile Ala Met Leu Tyr
 2595 2600 2605
 Thr Cys Glu Lys Cys Gly Ile Asn Lys Glu Glu Ile Val Tyr Tyr Val
 2610 2615 2620
 15 Asn Gly Asp Asp Leu Leu Ile Ala Ile His Pro Asp Lys Ala Glu Arg
 2625 2630 2635 2640
 Leu Ser Arg Phe Lys Glu Ser Phe Gly Glu Leu Gly Leu Lys Tyr Glu
 2645 2650 2655
 Phe Asp Cys Thr Thr Arg Asp Lys Thr Gln Leu Trp Phe Met Ser His
 20 2660 2665 2670
 Arg Ala Leu Glu Arg Asp Gly Met Tyr Ile Pro Lys Leu Glu Glu Glu
 2675 2680 2685
 Arg Ile Val Ser Ile Leu Glu Trp Asp Arg Ser Lys Glu Pro Ser His
 2690 2695 2700
 25 Arg Leu Glu Ala Ile Cys Ala Ser Met Ile Glu Ala Trp Gly Tyr Asp
 2705 2710 2715 2720
 Lys Leu Val Glu Glu Ile Arg Asn Phe Tyr Ala Trp Val Leu Glu Gln
 2725 2730 2735
 Ala Pro Tyr Ser Gln Leu Ala Glu Glu Gly Lys Ala Pro Tyr Leu Ala
 30 2740 2745 2750
 Glu Thr Ala Leu Lys Phe Leu Tyr Thr Ser Gln His Gly Thr Asn Ser
 2755 2760 2765
 Glu Ile Glu Glu Tyr Leu Lys Val Leu Tyr Asp Tyr Asp Ile Pro Thr
 2770 2775 2780
 35 Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Thr Val Asp Ala Gly Ala Asp
 2785 2790 2795 2800
 Ala Gly Lys Lys Lys Asp Gln Lys Asp Asp Lys Val Ala Glu Gln Ala
 2805 2810 2815
 Ser Lys Asp Arg Asp Val Asn Ala Gly Thr Ser Gly Thr Phe Ser Val

ES 2 488 217 T3

2820 2825 2830
 Pro Arg Ile Asn Ala Met Ala Thr Lys Leu Gln Tyr Pro Arg Met Arg
 2835 2840 2845
 Gly Glu Val Val Val Asn Leu Asn His Leu Leu Gly Tyr Lys Pro Gln
 5 2850 2855 2860
 Gln Ile Asp Leu Ser Asn Ala Arg Ala Thr His Glu Gln Phe Ala Ala
 2865 2870 2875 2880
 Trp His Gln Ala Val Met Thr Ala Tyr Gly Val Asn Glu Glu Gln Met
 2885 2890 2895
 10 Lys Ile Leu Leu Asn Gly Phe Met Val Trp Cys Ile Glu Asn Gly Thr
 2900 2905 2910
 Ser Pro Asn Leu Asn Gly Thr Trp Val Met Met Asp Gly Glu Asp Gln
 2915 2920 2925
 Val Ser Tyr Pro Leu Lys Pro Met Val Glu Asn Ala Gln Pro Thr Leu
 15 2930 2935 2940
 Arg Gln Ile Met Thr His Phe Ser Asp Leu Ala Glu Ala Tyr Ile Glu
 2945 2950 2955 2960
 Met Arg Asn Arg Glu Arg Pro Tyr Met Pro Arg Tyr Gly Leu Gln Arg
 2965 2970 2975
 20 Asn Ile Thr Asp Met Ser Leu Ser Arg Tyr Ala Phe Asp Phe Tyr Glu
 2980 2985 2990
 Leu Thr Ser Lys Thr Pro Val Arg Ala Arg Glu Ala His Met Gln Met
 2995 3000 3005
 Lys Ala Ala Ala Val Arg Asn Ser Gly Thr Arg Leu Phe Gly Leu Asp
 25 3010 3015 3020
 Gly Asn Val Gly Thr Ala Glu Glu Asp Thr Glu Arg His Thr Ala His
 3025 3030 3035 3040
 Asp Val Asn Arg Asn Met His Thr Leu Leu Gly Val Arg Gln
 3045 3050
 30
 <210> 15
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Potyvirus
 35
 <400> 15
 Gly Glu Ser Leu Phe Lys Gly Pro Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser
 1 5 10 15
 Thr Ile Cys His Leu Thr Asn Glu Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu

ES 2 488 217 T3

20 25 30
 Tyr Gly Ile Gly Phe Gly Pro Phe Ile Ile Thr Asn Lys His Leu Phe
 35 40 45
 Arg Arg Asn Asn Gly Thr Leu Leu Val Gln Ser Leu His Gly Val Phe
 5 50 55 60
 Lys Val Lys Asn Thr Thr Thr Leu Gln Gln His Leu Ile Asp Gly Arg
 65 70 75 80
 Asp Met Ile Ile Ile Arg Met Pro Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln
 85 90 95
 10 Lys Leu Lys Phe Arg Glu Pro Gln Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val
 100 105 110
 Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys Ser Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr
 115 120 125
 Ser Cys Thr Phe Pro Ser Ser Asp Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile
 15 130 135 140
 Gln Thr Lys Asp Gly Gln Cys Gly Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp
 145 150 155 160
 Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn
 165 170 175
 20 Asn Tyr Phe Thr Ser Val Pro Lys Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn
 180 185 190
 Gln Glu Ala Gln Gln Trp Val Ser Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser
 195 200 205
 Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val Phe Met Ser Lys Pro Glu Glu Pro
 25 210 215 220
 Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr Gln Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr
 225 230 235 240
 Ser Gln

30

<210> 16
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Potyvirus

35

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 216
 <223> S219N

ES 2 488 217 T3

<400> 16

Gly Glu Ser Leu Phe Lys Gly Pro Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser
 1 5 10 15
 5 Thr Ile Cys His Leu Thr Asn Glu Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu
 20 25 30
 Tyr Gly Ile Gly Phe Gly Pro Phe Ile Ile Thr Asn Lys His Leu Phe
 35 40 45
 Arg Arg Asn Asn Gly Thr Leu Leu Val Gln Ser Leu His Gly Val Phe
 10 50 55 60
 Lys Val Lys Asn Thr Thr Thr Leu Gln Gln His Leu Ile Asp Gly Arg
 65 70 75 80
 Asp Met Ile Ile Ile Arg Met Pro Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln
 85 90 95
 15 Lys Leu Lys Phe Arg Glu Pro Gln Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val
 100 105 110
 Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys Ser Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr
 115 120 125
 Ser Cys Thr Phe Pro Ser Ser Asp Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile
 20 130 135 140
 Gln Thr Lys Asp Gly Gln Cys Gly Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp
 145 150 155 160
 Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn
 165 170 175
 25 Asn Tyr Phe Thr Ser Val Pro Lys Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn
 180 185 190
 Gln Glu Ala Gln Gln Trp Val Ser Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser
 195 200 205
 Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val Phe Met Asn Lys Pro Glu Glu Pro
 30 210 215 220
 Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr Gln Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr
 225 230 235 240
 Ser Gln

35

<210> 17

<211> 242

<212> PRT

<213> Potyvirus

ES 2 488 217 T3

<220>

<221> VARIANTE

<222> 56

5 <223> L56V

<221> VARIANTE

<222> 135

<223> S135G

10

<221> VARIANTE

<222> 219

<223> S219N

15 <400> 17

Gly Glu Ser Leu Phe Lys Gly Pro Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser
 1 5 10 15

Thr Ile Cys His Leu Thr Asn Glu Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu
 20 25 30

20 Tyr Gly Ile Gly Phe Gly Pro Phe Ile Ile Thr Asn Lys His Leu Phe
 35 40 45

Arg Arg Asn Asn Gly Thr Leu Val Val Gln Ser Leu His Gly Val Phe
 50 55 60

25 Lys Val Lys Asn Thr Thr Thr Leu Gln Gln His Leu Ile Asp Gly Arg
 65 70 75 80

Asp Met Ile Ile Ile Arg Met Pro Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln
 85 90 95

Lys Leu Lys Phe Arg Glu Pro Gln Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val
 100 105 110

30 Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys Ser Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr
 115 120 125

Ser Cys Thr Phe Pro Ser Gly Asp Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile
 130 135 140

35 Gln Thr Lys Asp Gly Gln Cys Gly Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp
 145 150 155 160

Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn
 165 170 175

Asn Tyr Phe Thr Ser Val Pro Lys Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn

ES 2 488 217 T3

180 185 190
 Gln Glu Ala Gln Gln Trp Val Ser Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser
 195 200 205
 Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val Phe Met Asn Lys Pro Glu Glu Pro
 5 210 215 220
 Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr Gln Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr
 225 230 235 240
 Ser Gln

 10
 <210> 18
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Potyvirus

 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 17
 <223> T17V

 20
 <221> VARIANTE
 <222> 68
 <223> N68D

 25 <221> VARIANTE
 <222> 77
 <223> I77V

 <221> VARIANTE
 30 <222> 219
 <223> S219N

 <400> 18
 Gly Glu Ser Leu Phe Lys Gly Pro Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser
 35 1 5 10 15
 Ser Ile Cys His Leu Thr Asn Glu Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu
 20 25 30
 Tyr Gly Ile Gly Phe Gly Pro Phe Ile Ile Thr Asn Lys His Leu Phe

ES 2 488 217 T3

<221> VARIANTE

<222> 56

<223> L56V

5 <221> VARIANTE

<222> 135

<223> S135G

<221> VARIANTE

10 <222> 219

<223> S219N

<400> 19

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

ES 2 488 217 T3

195 200 205
 Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val Phe Met Asn Lys Pro Glu Glu Pro
 210 215 220
 Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr Gln Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr
 5 225 230 235 240
 Ser Gln

<210> 20

10 <211> 242

<212> PRT

<213> Potyvirus

<220>

15 <221> VARIANTE

<222> 56

<223> L56V

<221> VARIANTE

20 <222> 68

<223> N68D

<221> VARIANTE

<222> 135

25 <223> S135G

<221> VARIANTE

<222> 219

<223> S219N

30

<400> 20

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

ES 2 488 217 T3

<223> L56V

<221> VARIANTE

<222> 68

5 <223> N68D

<221> VARIANTE

<222> 77

<223> I77V

10

<221> VARIANTE

<222> 219

<223> S219N

15 <400> 21

Gly Glu Ser Leu Phe Lys Gly Pro Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser

1 5 10 15

Ser Ile Cys His Leu Thr Asn Glu Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu

20 25 30

20 Tyr Gly Ile Gly Phe Gly Pro Phe Ile Ile Thr Asn Lys His Leu Phe

35 40 45

Arg Arg Asn Asn Gly Thr Leu Val Val Gln Ser Leu His Gly Val Phe

50 55 60

Lys Val Lys Asp Thr Thr Thr Leu Gln Gln His Leu Val Asp Gly Arg

25 65 70 75 80

Asp Met Ile Ile Ile Arg Met Pro Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln

85 90 95

Lys Leu Lys Phe Arg Glu Pro Gln Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val

100 105 110

30 Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys Ser Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr

115 120 125

Ser Cys Thr Phe Pro Ser Ser Asp Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile

130 135 140

Gln Thr Lys Asp Gly Gln Cys Gly Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp

35 145 150 155 160

Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn

165 170 175

Asn Tyr Phe Thr Ser Val Pro Lys Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn

ES 2 488 217 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | 180 | | 185 | | 190 | | | | | | | | | | | | |
| | Gln | Glu | Ala | Gln | Gln | Trp | Val | Ser | Gly | Trp | Arg | Leu | Asn | Ala | Asp | Ser | |
| | | 195 | | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| | Val | Leu | Trp | Gly | Gly | His | Lys | Val | Phe | Met | Asn | Lys | Pro | Glu | Glu | Pro | |
| 5 | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| | Phe | Gln | Pro | Val | Lys | Glu | Ala | Thr | Gln | Leu | Met | Asn | Glu | Leu | Val | Tyr | |
| | 225 | | | | 230 | | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| | Ser | Gln | | | | | | | | | | | | | | | |

10

<210> 22
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Potyvirus

15

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 17
 <223> T17S

20

<221> VARIANTE
 <222> 68
 <223> N68D

25

<221> VARIANTE
 <222> 77
 <223> I77V

30

<221> VARIANTE
 <222> 135
 <223> S135G

35

<221> VARIANTE
 <222> 219
 <223> S219N

<400> 22

ES 2 488 217 T3

Gly Glu Ser Leu Phe Lys Gly Pro Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser
 1 5 10 15
 Ser Ile Cys His Leu Thr Asn Glu Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu
 20 25 30
 5 Tyr Gly Ile Gly Phe Gly Pro Phe Ile Ile Thr Asn Lys His Leu Phe
 35 40 45
 Arg Arg Asn Asn Gly Thr Leu Leu Val Gln Ser Leu His Gly Val Phe
 50 55 60
 Lys Val Lys Asp Thr Thr Thr Leu Gln Gln His Leu Val Asp Gly Arg
 10 65 70 75 80
 Asp Met Ile Ile Ile Arg Met Pro Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln
 85 90 95
 Lys Leu Lys Phe Arg Glu Pro Gln Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val
 100 105 110
 15 Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys Ser Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr
 115 120 125
 Ser Cys Thr Phe Pro Ser Gly Asp Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile
 130 135 140
 Gln Thr Lys Asp Gly Gln Cys Gly Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp
 20 145 150 155 160
 Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn
 165 170 175
 Asn Tyr Phe Thr Ser Val Pro Lys Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn
 180 185 190
 25 Gln Glu Ala Gln Gln Trp Val Ser Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser
 195 200 205
 Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val Phe Met Asn Lys Pro Glu Glu Pro
 210 215 220
 Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr Gln Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr
 30 225 230 235 240
 Ser Gln

<210> 23

35 <211> 242

<212> PRT

<213> Potyvirus

<220>

ES 2 488 217 T3

<221> VARIANTE

<222> 17

<223> T17S

5 <221> VARIANTE

<222> 44

<223> N44V

<221> VARIANTE

10 <222> 56

<223> L56V

<221> VARIANTE

<222> 68

15 <223> N68D

<221> VARIANTE

<222> 77

<223> I77V

20

<221> VARIANTE

<222> 135

<223> S135G

25 <221> VARIANTE

<222> (219)...(219)

<223> S219N

<400> 23

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

ES 2 488 217 T3

Lys Val Lys Asp Thr Thr Thr Leu Gln Gln His Leu Val Asp Gly Arg
 65 70 75 80
 Asp Met Ile Ile Ile Arg Met Pro Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln
 85 90 95
 5 Lys Leu Lys Phe Arg Glu Pro Gln Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val
 100 105 110
 Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys Ser Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr
 115 120 125
 Ser Cys Thr Phe Pro Ser Gly Asp Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile
 10 130 135 140
 Gln Thr Lys Asp Gly Gln Cys Gly Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp
 145 150 155 160
 Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn
 165 170 175
 15 Asn Tyr Phe Thr Ser Val Pro Lys Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn
 180 185 190
 Gln Glu Ala Gln Gln Trp Val Ser Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser
 195 200 205
 Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val Phe Met Asn Lys Pro Glu Glu Pro
 20 210 215 220
 Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr Gln Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr
 225 230 235 240
 Ser Gln

 25
 <210> 24
 <211> 3023
 <212> PRT
 <213> Potyvirus

 30
 <400> 24
 Met Ala Ala Thr Met Ile Phe Gly Ser Phe Thr His Asp Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Lys Ala Met Ser Thr Ile His Ser Ala Val Thr Ala Glu Lys Asp Ile
 35 20 25 30
 Phe Ser Ser Ile Lys Glu Arg Leu Glu Arg Lys Arg His Gly Lys Ile
 35 40 45
 Cys Arg Met Lys Asn Gly Ser Ile Tyr Ile Lys Ala Ala Ser Ser Thr
 50 55 60

ES 2 488 217 T3

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

ES 2 488 217 T3

370 375 380
 Asn Thr Ala Ala Phe Arg Glu Ile Leu Arg Leu Ile Gly Asp Arg Asn
 385 390 395 400
 Glu Ala Pro Phe Ala His Val Asn Arg Leu Asn Glu Ile Leu Leu Leu
 5 405 410 415
 Gly Ser Lys Ala Asn Pro Asp Ser Leu Ala Lys Ala Ser Asp Ser Leu
 420 425 430
 Leu Glu Leu Ala Arg Tyr Leu Asn Asn Arg Thr Glu Asn Ile Arg Asn
 435 440 445
 10 Gly Ser Leu Lys His Phe Arg Asn Lys Ile Ser Ser Lys Ala His Ser
 450 455 460
 Asn Leu Ala Leu Ser Cys Asp Asn Gln Leu Asp Gln Asn Gly Asn Phe
 465 470 475 480
 Leu Trp Gly Leu Ala Gly Ile Ala Ala Lys Arg Phe Leu Asn Asn Tyr
 15 485 490 495
 Phe Glu Thr Ile Asp Pro Glu Gln Gly Tyr Asp Lys Tyr Val Ile Arg
 500 505 510
 Lys Asn Pro Asn Gly Glu Arg Lys Leu Ala Ile Gly Asn Phe Ile Ile
 515 520 525
 20 Ser Thr Asn Leu Glu Lys Leu Arg Asp Gln Leu Glu Gly Glu Ser Ile
 530 535 540
 Ala Arg Val Gly Ile Thr Glu Glu Cys Val Ser Arg Lys Asp Gly Asn
 545 550 555 560
 Tyr Arg Tyr Pro Cys Cys Cys Val Thr Leu Glu Asp Gly Ser Pro Met
 25 565 570 575
 Tyr Ser Glu Leu Lys Met Pro Thr Lys Asn His Leu Val Ile Gly Asn
 580 585 590
 Ser Gly Asp Pro Lys Tyr Leu Asp Leu Pro Gly Glu Ile Ser Asn Leu
 595 600 605
 30 Met Tyr Ile Ala Lys Glu Gly Tyr Cys Tyr Ile Asn Ile Phe Leu Ala
 610 615 620
 Met Leu Val Asn Val Asp Glu Ala Asn Ala Lys Asp Phe Thr Lys Arg
 625 630 635 640
 Val Arg Asp Glu Ser Val Gln Lys Leu Gly Lys Trp Pro Ser Leu Ile
 35 645 650 655
 Asp Val Ala Thr Glu Cys Ala Leu Leu Ser Thr Tyr Tyr Pro Ala Ala
 660 665 670
 Ala Ser Ala Glu Leu Pro Arg Leu Leu Val Asp His Ala Gln Lys Thr
 675 680 685

ES 2 488 217 T3

Ile His Val Val Asp Ser Tyr Gly Ser Leu Asn Thr Gly Tyr His Ile
690 695 700

Leu Lys Ala Asn Thr Val Ser Gln Leu Glu Lys Phe Ala Ser Asn Thr
705 710 715 720

5 Leu Glu Ser Pro Met Ala Gln Tyr Lys Val Gly Gly Leu Val Tyr Ser
725 730 735

Glu Asn Asn Asp Ala Ser Ala Val Lys Ala Leu Thr Gln Ala Ile Phe
740 745 750

Arg Pro Asp Val Leu Ser Glu Leu Ile Glu Lys Glu Pro Tyr Leu Met
10 755 760 765

Val Phe Ala Leu Val Ser Pro Gly Ile Leu Met Ala Met Ser Asn Ser
770 775 780

Gly Ala Leu Glu Phe Gly Ile Ser Lys Trp Ile Ser Ser Asp His Ser
785 790 795 800

15 Leu Val Arg Met Ala Ser Ile Leu Lys Thr Leu Ala Ser Lys Val Ser
805 810 815

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

Asn Phe Leu Cys Gly Glu Leu Ile Asn Gly Phe Gln Lys Lys Lys Ser
20 835 840 845

Tyr Thr His Ala Thr Arg Phe Leu Leu Met Ile Ser Glu Glu Asn Glu
850 855 860

Met Asp Asp Pro Val Leu Asn Ala Gly Tyr Arg Val Leu Glu Ala Ser
865 870 875 880

25 Ser His Glu Ile Met Glu Lys Thr Tyr Leu Ala Leu Leu Glu Thr Ser
885 890 895

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

Arg Lys His Phe Gly Arg Tyr Lys Ala Glu Leu Phe Pro Lys Glu Gln
30 915 920 925

Thr Asp Leu Gln Gly Arg Tyr Ser Asn Ser Leu Arg Phe His Tyr Gln
930 935 940

Ser Thr Leu Lys Arg Leu Arg Asn Lys Gly Ser Leu Cys Arg Glu Arg
945 950 955 960

35 Phe Leu Glu Ser Ile Ser Ser Ala Arg Arg Arg Thr Thr Cys Ala Val
965 970 975

Phe Ser Leu Leu His Lys Ala Phe Pro Asp Val Leu Lys Phe Ile Asn
980 985 990

Thr Leu Val Ile Val Ser Leu Ser Met Gln Ile Tyr Tyr Met Leu Val

ES 2 488 217 T3

| | | | |
|----|---|------|------|
| | 995 | 1000 | 1005 |
| | Ala Ile Ile His Glu His Arg Ala Ala Lys Ile Lys Ser Ala Gln Leu | | |
| | 1010 | 1015 | 1020 |
| | Glu Glu Arg Val Leu Glu Asp Lys Thr Met Leu Leu Tyr Asp Asp Phe | | |
| 5 | 1025 | 1030 | 1035 |
| | Lys Ala Lys Leu Pro Glu Gly Ser Phe Glu Glu Phe Leu Glu Tyr Thr | | |
| | 1045 | 1050 | 1055 |
| | Arg Gln Arg Asp Lys Glu Val Tyr Glu Tyr Leu Met Met Glu Thr Thr | | |
| | 1060 | 1065 | 1070 |
| 10 | Glu Ile Val Glu Phe Gln Ala Lys Asn Thr Gly Gln Ala Ser Leu Glu | | |
| | 1075 | 1080 | 1085 |
| | Arg Ile Ile Ala Phe Val Ser Leu Thr Leu Met Leu Phe Asp Asn Glu | | |
| | 1090 | 1095 | 1100 |
| | Arg Ser Asp Cys Val Tyr Lys Ile Leu Thr Lys Phe Lys Gly Ile Leu | | |
| 15 | 1105 | 1110 | 1115 |
| | Gly Ser Val Glu Asn Asn Val Arg Phe Gln Ser Leu Asp Thr Ile Val | | |
| | 1125 | 1130 | 1135 |
| | Pro Thr Gln Glu Glu Lys Asn Met Val Ile Asp Phe Glu Leu Asp Ser | | |
| | 1140 | 1145 | 1150 |
| 20 | Asp Thr Ala His Thr Pro Gln Met Gln Glu Gln Thr Phe Ser Asp Trp | | |
| | 1155 | 1160 | 1165 |
| | Trp Ser Asn Gln Ile Ala Asn Asn Arg Val Val Pro His Tyr Arg Thr | | |
| | 1170 | 1175 | 1180 |
| | Glu Gly Tyr Phe Met Gln Phe Thr Arg Asn Thr Ala Ser Ala Val Ser | | |
| 25 | 1185 | 1190 | 1195 |
| | His Gln Ile Ala His Asn Glu His Lys Asp Ile Ile Leu Met Gly Ala | | |
| | 1205 | 1210 | 1215 |
| | Val Gly Ser Gly Lys Ser Thr Gly Leu Pro Thr Asn Leu Cys Lys Phe | | |
| | 1220 | 1225 | 1230 |
| 30 | Gly Gly Val Leu Leu Leu Glu Pro Thr Arg Pro Leu Ala Glu Asn Val | | |
| | 1235 | 1240 | 1245 |
| | Thr Lys Gln Met Arg Gly Ser Pro Phe Phe Ala Ser Pro Thr Leu Arg | | |
| | 1250 | 1255 | 1260 |
| | Met Arg Asn Leu Ser Thr Phe Gly Ser Ser Pro Ile Thr Val Met Thr | | |
| 35 | 1265 | 1270 | 1275 |
| | Thr Gly Phe Ala Leu His Phe Phe Ala Asn Asn Val Lys Glu Phe Asp | | |
| | 1285 | 1290 | 1295 |
| | Arg Tyr Gln Phe Ile Ile Phe Asp Glu Phe His Val Leu Asp Ser Asn | | |
| | 1300 | 1305 | 1310 |

ES 2 488 217 T3

Ala Ile Ala Phe Arg Asn Leu Cys His Glu Tyr Ser Tyr Asn Gly Lys
 1315 1320 1325

Ile Ile Lys Val Ser Ala Thr Pro Pro Gly Arg Glu Cys Asp Leu Thr
 1330 1335 1340

5 Thr Gln Tyr Pro Val Glu Leu Leu Ile Glu Glu Gln Leu Ser Leu Arg
 1345 1350 1355 1360

Asp Phe Val Asp Ala Gln Gly Thr Asp Ala His Ala Asp Val Val Lys
 1365 1370 1375

Lys Gly Asp Asn Ile Leu Val Tyr Val Ala Ser Tyr Asn Glu Val Asp
 10 1380 1385 1390

Gln Leu Ser Lys Met Leu Asn Glu Arg Gly Phe Leu Val Thr Lys Val
 1395 1400 1405

Asp Gly Arg Thr Met Lys Leu Gly Gly Val Glu Ile Ile Thr Lys Gly
 1410 1415 1420

15 Ser Ser Ile Lys Lys His Phe Ile Val Ala Thr Asn Ile Ile Glu Asn
 1425 1430 1435 1440

Gly Val Thr Leu Asp Val Asp Val Val Val Asp Phe Gly Leu Lys Val
 1445 1450 1455

Val Pro Asn Leu Asp Ser Asp Asn Arg Leu Val Ser Tyr Cys Lys Ile
 20 1460 1465 1470

Pro Ile Ser Leu Gly Glu Arg Ile Gln Arg Phe Gly Arg Val Gly Arg
 1475 1480 1485

Asn Lys Pro Gly Val Ala Leu Arg Ile Gly Glu Thr Ile Lys Gly Leu
 1490 1495 1500

25 Val Glu Ile Pro Ser Met Ile Ala Thr Glu Ala Ala Phe Leu Cys Phe
 1505 1510 1515 1520

Val Tyr Gly Leu Pro Val Thr Thr Gln Asn Val Ser Thr Ser Ile Leu
 1525 1530 1535

Ser Gln Val Ser Val Arg Gln Ala Arg Val Met Cys Gln Phe Glu Leu
 30 1540 1545 1550

Pro Ile Phe Tyr Thr Ala His Leu Val Arg Tyr Asp Gly Ala Met His
 1555 1560 1565

Pro Ala Ile His Asn Ala Leu Lys Arg Phe Lys Leu Arg Asp Ser Glu
 1570 1575 1580

35 Ile Asn Leu Asn Thr Leu Ala Ile Pro Thr Ser Ser Ser Lys Thr Trp
 1585 1590 1595 1600

Tyr Thr Gly Lys Cys Tyr Lys Gln Leu Val Gly Arg Leu Asp Ile Pro
 1605 1610 1615

Asp Glu Ile Lys Ile Pro Phe Tyr Thr Lys Glu Val Pro Glu Lys Val

ES 2 488 217 T3

| | | | | |
|----|---|------|------|------|
| | 1620 | 1625 | 1630 | |
| | Pro Glu Gln Ile Trp Asp Val Met Val Lys Phe Ser Ser Asp Ala Gly | | | |
| | 1635 | 1640 | 1645 | |
| | Phe Gly Arg Met Thr Ser Ala Ala Ala Cys Lys Val Ala Tyr Thr Leu | | | |
| 5 | 1650 | 1655 | 1660 | |
| | Gln Thr Asp Ile His Ser Ile Gln Arg Thr Val Gln Ile Ile Asp Arg | | | |
| | 1665 | 1670 | 1675 | 1680 |
| | Leu Leu Glu Asn Glu Met Lys Lys Arg Asn His Phe Asn Leu Val Val | | | |
| | 1685 | 1690 | 1695 | |
| 10 | Asn Gln Ser Cys Ser Ser His Phe Met Ser Leu Ser Ser Ile Met Ala | | | |
| | 1700 | 1705 | 1710 | |
| | Ser Leu Arg Ala His Tyr Ala Lys Asn His Thr Gly Gln Asn Ile Glu | | | |
| | 1715 | 1720 | 1725 | |
| | Ile Leu Gln Lys Ala Lys Ala Gln Leu Leu Glu Phe Ser Asn Leu Ala | | | |
| 15 | 1730 | 1735 | 1740 | |
| | Ile Asp Pro Ser Thr Thr Glu Ala Leu Arg Asp Phe Gly Tyr Leu Glu | | | |
| | 1745 | 1750 | 1755 | 1760 |
| | Ala Val Arg Phe Gln Ser Glu Ser Glu Met Ala Arg Gly Leu Lys Leu | | | |
| | 1765 | 1770 | 1775 | |
| 20 | Ser Gly His Trp Lys Trp Ser Leu Ile Ser Arg Asp Leu Ile Val Val | | | |
| | 1780 | 1785 | 1790 | |
| | Ser Gly Val Gly Ile Gly Leu Gly Cys Met Leu Trp Gln Phe Phe Lys | | | |
| | 1795 | 1800 | 1805 | |
| | Glu Lys Met His Glu Pro Val Lys Phe Gln Gly Lys Ser Arg Arg Arg | | | |
| 25 | 1810 | 1815 | 1820 | |
| | Leu Gln Phe Arg Lys Ala Arg Asp Asp Lys Met Gly Tyr Ile Met His | | | |
| | 1825 | 1830 | 1835 | 1840 |
| | Gly Glu Gly Asp Thr Ile Glu His Phe Phe Gly Ala Ala Tyr Thr Lys | | | |
| | 1845 | 1850 | 1855 | |
| 30 | Lys Gly Lys Ser Lys Gly Lys Thr His Gly Ala Gly Thr Lys Ala His | | | |
| | 1860 | 1865 | 1870 | |
| | Lys Phe Val Asn Met Tyr Gly Val Ser Pro Asp Glu Tyr Ser Tyr Val | | | |
| | 1875 | 1880 | 1885 | |
| | Arg Tyr Leu Asp Pro Val Thr Gly Ala Thr Leu Asp Glu Ser Pro Met | | | |
| 35 | 1890 | 1895 | 1900 | |
| | Thr Asp Leu Asn Ile Val Gln Glu His Phe Gly Glu Ile Arg Arg Glu | | | |
| | 1905 | 1910 | 1915 | 1920 |
| | Ala Ile Leu Ala Asp Ala Met Ser Pro Gln Gln Arg Asn Lys Gly Ile | | | |
| | 1925 | 1930 | 1935 | |

ES 2 488 217 T3

Gln Ala Tyr Phe Val Arg Asn Ser Thr Met Pro Ile Leu Lys Val Asp
 1940 1945 1950
 Leu Thr Pro His Ile Pro Leu Lys Val Cys Glu Ser Asn Asn Ile Ala
 1955 1960 1965
 5 Gly Phe Pro Glu Arg Glu Gly Glu Leu Arg Arg Thr Gly Pro Thr Glu
 1970 1975 1980
 Thr Leu Pro Phe Asp Ala Leu Pro Pro Glu Lys Gln Glu Val Ala Phe
 1985 1990 1995 2000
 Glu Ser Lys Ala Leu Leu Lys Gly Val Arg Asp Phe Asn Pro Ile Ser
 10 2005 2010 2015
 Ala Cys Val Trp Leu Leu Glu Asn Ser Ser Asp Gly His Ser Glu Arg
 2020 2025 2030
 Leu Phe Gly Ile Gly Phe Gly Pro Tyr Ile Ile Ala Asn Gln His Leu
 2035 2040 2045
 15 Phe Arg Arg Asn Asn Gly Glu Leu Thr Ile Lys Thr Met His Gly Glu
 2050 2055 2060
 Phe Lys Val Lys Asn Ser Thr Gln Leu Gln Met Lys Pro Val Glu Gly
 2065 2070 2075 2080
 Arg Asp Ile Ile Val Ile Lys Met Ala Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro
 20 2085 2090 2095
 Gln Lys Leu Lys Phe Arg Gln Pro Thr Ile Lys Asp Arg Val Cys Met
 2100 2105 2110
 Val Ser Thr Asn Phe Gln Gln Lys Ser Val Ser Ser Leu Val Ser Glu
 2115 2120 2125
 25 Ser Ser His Ile Val His Lys Glu Asp Thr Ser Phe Trp Gln His Trp
 2130 2135 2140
 Ile Thr Thr Lys Asp Gly Gln Cys Gly Ser Pro Leu Val Ser Ile Ile
 2145 2150 2155 2160
 Asp Gly Asn Ile Leu Gly Ile His Ser Leu Thr His Thr Thr Asn Gly
 30 2165 2170 2175
 Ser Asn Tyr Phe Val Glu Phe Pro Glu Lys Phe Val Ala Thr Tyr Leu
 2180 2185 2190
 Asp Ala Ala Asp Gly Trp Cys Lys Asn Trp Lys Phe Asn Ala Asp Lys
 2195 2200 2205
 35 Ile Ser Trp Gly Ser Phe Thr Leu Val Glu Asp Ala Pro Glu Asp Asp
 2210 2215 2220
 Phe Met Ala Lys Lys Thr Val Ala Ala Ile Met Asp Asp Leu Val Arg
 2225 2230 2235 2240
 Thr Gln Gly Glu Lys Arg Lys Trp Met Leu Glu Ala Ala His Thr Asn

ES 2 488 217 T3

2245 2250 2255
 Ile Gln Pro Val Ala His Leu Gln Ser Gln Leu Val Thr Lys His Ile
 2260 2265 2270
 Val Lys Gly Arg Cys Lys Met Phe Ala Leu Tyr Leu Gln Glu Asn Ala
 5 2275 2280 2285
 Asp Ala Arg Asp Phe Phe Lys Ser Phe Met Gly Ala Tyr Gly Pro Ser
 2290 2295 2300
 His Leu Asn Lys Glu Ala Tyr Ile Lys Asp Ile Met Lys Tyr Ser Lys
 2305 2310 2315 2320
 10 Gln Ile Val Val Gly Ser Val Asp Cys Asp Thr Phe Glu Ser Ser Leu
 2325 2330 2335
 Lys Val Leu Ser Arg Lys Met Lys Glu Trp Gly Phe Glu Asn Leu Glu
 2340 2345 2350
 Tyr Val Thr Asp Glu Gln Thr Ile Lys Asn Ala Leu Asn Met Asp Ala
 15 2355 2360 2365
 Ala Val Gly Ala Leu Tyr Ser Gly Lys Lys Lys Gln Tyr Phe Glu Asp
 2370 2375 2380
 Leu Ser Asp Asp Ala Val Ala Asn Leu Val Gln Lys Ser Cys Leu Arg
 2385 2390 2395 2400
 20 Leu Phe Lys Asn Lys Leu Gly Val Trp Asn Gly Ser Leu Lys Ala Glu
 2405 2410 2415
 Leu Arg Pro Phe Glu Lys Leu Ile Glu Asn Lys Thr Arg Thr Phe Thr
 2420 2425 2430
 Ala Ala Pro Ile Glu Thr Leu Leu Gly Gly Lys Val Cys Val Asp Asp
 25 2435 2440 2445
 Phe Asn Asn His Phe Tyr Ser Lys His Ile Gln Cys Pro Trp Ser Val
 2450 2455 2460
 Gly Met Thr Lys Phe Tyr Gly Gly Trp Asn Glu Leu Leu Gly Lys Leu
 2465 2470 2475 2480
 30 Pro Asp Gly Trp Val Tyr Cys Asp Ala Asp Gly Ser Gln Phe Asp Ser
 2485 2490 2495
 Ser Leu Ser Pro Tyr Leu Ile Asn Ala Val Leu Arg Leu Arg Leu Ser
 2500 2505 2510
 Ser Met Glu Glu Trp Asp Val Gly Gln Lys Met Leu Gln Asn Leu Tyr
 35 2515 2520 2525
 Thr Glu Ile Val Tyr Thr Pro Ile Ser Thr Pro Asp Gly Thr Ile Val
 2530 2535 2540
 Lys Lys Phe Lys Gly Asn Asn Ser Gly Gln Pro Ser Thr Val Val Asp
 2545 2550 2555 2560

ES 2 488 217 T3

| | | | |
|----|---|------|------|
| | Asn Thr Leu Met Val Val Leu Ala Met Tyr Tyr Ala Leu Ser Lys Leu | | |
| | 2565 | 2570 | 2575 |
| | Gly Val Asp Ile Asn Ser Gln Glu Asp Val Cys Lys Phe Phe Ala Asn | | |
| | 2580 | 2585 | 2590 |
| 5 | Gly Asp Asp Leu Ile Ile Ala Ile Ser Pro Glu Leu Glu His Val Leu | | |
| | 2595 | 2600 | 2605 |
| | Asp Gly Phe Gln Gln His Phe Ser Asp Leu Gly Leu Asn Tyr Asp Phe | | |
| | 2610 | 2615 | 2620 |
| 10 | Ser Ser Arg Thr Arg Asp Lys Lys Glu Leu Trp Phe Met Ser His Arg | | |
| | 2625 | 2630 | 2635 |
| | Ala Leu Ser Lys Asp Gly Ile Leu Ile Pro Lys Leu Glu Pro Glu Arg | | |
| | 2645 | 2650 | 2655 |
| | Ile Val Ser Ile Leu Glu Trp Asp Arg Ser Ala Glu Pro His His Arg | | |
| | 2660 | 2665 | 2670 |
| 15 | Leu Glu Ala Ile Cys Ala Ser Met Ile Glu Ala Trp Gly Tyr Thr Asp | | |
| | 2675 | 2680 | 2685 |
| | Leu Leu Gln Asn Ile Arg Arg Phe Tyr Lys Trp Thr Ile Glu Gln Glu | | |
| | 2690 | 2695 | 2700 |
| 20 | Pro Tyr Arg Ser Leu Ala Glu Gln Gly Leu Ala Pro Tyr Leu Ser Glu | | |
| | 2705 | 2710 | 2715 |
| | Val Ala Leu Arg Arg Leu Tyr Thr Ser Gln Ile Ala Thr Asp Asn Glu | | |
| | 2725 | 2730 | 2735 |
| | Leu Thr Asp Tyr Tyr Lys Glu Ile Leu Ala Asn Asn Glu Phe Leu Arg | | |
| | 2740 | 2745 | 2750 |
| 25 | Glu Thr Val Arg Phe Gln Ser Asp Thr Val Asp Ala Gly Lys Asp Lys | | |
| | 2755 | 2760 | 2765 |
| | Ala Arg Asp Gln Lys Leu Ala Asp Lys Pro Thr Leu Ala Ile Asp Arg | | |
| | 2770 | 2775 | 2780 |
| 30 | Thr Lys Asp Lys Asp Val Asn Thr Gly Thr Ser Gly Thr Phe Ser Ile | | |
| | 2785 | 2790 | 2795 |
| | Pro Arg Leu Lys Lys Ala Ala Met Asn Met Lys Leu Pro Lys Val Gly | | |
| | 2805 | 2810 | 2815 |
| | Gly Ser Ser Val Val Asn Leu Asp His Leu Leu Thr Tyr Lys Pro Ala | | |
| | 2820 | 2825 | 2830 |
| 35 | Gln Glu Phe Val Val Asn Thr Arg Ala Thr His Ser Gln Phe Lys Ala | | |
| | 2835 | 2840 | 2845 |
| | Trp His Thr Asn Val Met Ala Glu Leu Glu Leu Asn Glu Glu Gln Met | | |
| | 2850 | 2855 | 2860 |
| | Lys Ile Val Leu Asn Gly Phe Met Ile Trp Cys Ile Glu Asn Gly Thr | | |

ES 2 488 217 T3

2865 2870 2875 2880
 Ser Pro Asn Ile Ser Gly Val Trp Thr Met Met Asp Gly Asp Glu Gln
 2885 2890 2895
 Val Glu Tyr Pro Ile Glu Pro Met Val Lys His Ala Asn Pro Ser Leu
 5 2900 2905 2910
 Arg Gln Ile Met Lys His Phe Ser Asn Leu Ala Glu Ala Tyr Ile Arg
 2915 2920 2925
 Met Arg Asn Ser Glu Gln Val Tyr Ile Pro Arg Tyr Gly Leu Gln Arg
 2930 2935 2940
 10 Gly Leu Val Asp Arg Asn Leu Ala Pro Phe Ala Phe Asp Phe Phe Glu
 2945 2950 2955 2960
 Val Asn Gly Ala Thr Pro Val Arg Ala Arg Glu Ala His Ala Gln Met
 2965 2970 2975
 Lys Ala Ala Ala Leu Arg Asn Ser Gln Gln Arg Met Phe Cys Leu Asp
 15 2980 2985 2990
 Gly Ser Val Ser Gly Gln Glu Glu Asn Thr Glu Arg His Thr Val Asp
 2995 3000 3005
 Asp Val Asn Ala Gln Met His His Leu Leu Gly Val Lys Gly Val
 3010 3015 3020
 20
 <210> 25
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis
 25
 <400> 25
 Met Arg Gly Lys Lys Val Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Ile Phe Thr Met Ala Phe Ser Asn Met Ser Ala Gln Ala Ala Gly Lys
 30 20 25 30
 Ser Ser Thr Glu Lys Lys Tyr Ile Val Gly Phe Lys Gln Thr Met Ser
 35 40 45
 Ala Met Ser Ser Ala Lys Lys Lys Asp Val Ile Ser Glu Lys Gly Gly
 50 55 60
 35 Lys Val Gln Lys Gln Phe Lys Tyr Val Asn Ala Ala Thr Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Asp Glu Lys Ala Val Lys Glu Leu Lys Gln Asp Pro Ser Val Ala Tyr
 85 90 95
 Val Glu Glu Asp His Ile Ala His Glu Tyr Ala Gln Ser Val Pro Tyr

ES 2 488 217 T3

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

<210> 26

<211> 277

<212> PRT

ES 2 488 217 T3

<213> Rattus norvegicus

<400> 26

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

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso del sitio de escisión de proteasa del virus
de grabado del tabaco

10

<221> VARIANTE

<222> 2, 3, 5

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

15 <400> 27

Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Gly

1

5

<210> 28

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Secuencia de consenso del sitio de escisión de proteasa del
virus de grabado del tabaco

<221> VARIANTE

<222> 2, 3, 5

30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 28

Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Ser

1

5

35

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco

<400> 29

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

1 5

10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco

<400> 30

20 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser

1 5

<210> 31

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco

30

<400> 31

Glu Asn Ile Tyr Thr Gln Gly

1 5

35 <210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco

5

<400> 32

Glu Asn Ile Tyr Thr Gln Ser

1 5

10 <210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco

<400> 33

Glu Asn Ile Tyr Leu Gln Gly

20 1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco

30 <400> 34

Glu Asn Ile Tyr Leu Gln Ser

1 5

<210> 35

35 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco

5 <400> 35

Glu Asn Val Tyr Phe Gln Gly

1 5

<210> 36

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco

<400> 36

Glu Asn Val Tyr Ser Gln Ser

1 5

20

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco

<400> 37

30 Glu Asn Val Tyr Ser Gln Gly

1 5

<210> 38

<211> 7

35 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco

<400> 38

5 Glu Asn Val Tyr Ser Gln Ser
1 5

<210> 39

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de consenso del sitio de escisión de proteasa del virus
de moteado de las venas del tabaco

<221> VARIANTE

<222> 1, 2

20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 39

Xaa Xaa val Arg Phe Gln Gly
1 5

25 <210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Secuencia de consenso del sitio de escisión de proteasa del virus
de moteado de la vena del tabaco

<221> VARIANTE

35 <222> 1, 2

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 40

Xaa Xaa Val Arg Phe Gln Ser

1 5

5 <210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Sitio de escisión de proteasa del virus de moteado de las venas del tabaco

<400> 41

Glu Thr Val Arg Phe Gln Gly

15 1 5

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa del virus de moteado de las venas del tabaco

25 <400> 42

Glu Thr Val Arg Phe Gln Ser

1 5

<210> 43

30 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Sitio de escisión de proteasa del virus de moteado de las venas del tabaco

<400> 43

ES 2 488 217 T3

Asn Asn Val Arg Phe Gln Gly

1 5

<210> 44

5 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Sitio de escisión de proteasa del virus de moteado de las venas del tabaco

<400> 44

Asn Asn Val Arg Phe Gln Ser

1 5

15

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Secuencia de consenso del sitio de escisión de proteasa del
rinovirus humano 3C

25 <221> VARIANTE

<222> 1

<223> Xaa puede ser aminoácido, con D o E preferidos

<221> VARIANTE

30 <222> 2

<223> Xaa puede ser G, A, V, L, I, M, S o T

<400> 45

Xaa Xaa Leu Phe Gln Gly Pro

35 1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Sitio de escisión de proteasa del rinovirus humano 3C

<400> 46

Glu Ala Leu Phe Gln Gly Pro

10 1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa del rinovirus humano 3C

20 <400> 47

Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro

1 5

<210> 48

25 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Sitio de escisión de proteasa del rinovirus humano 3C

<400> 48

Glu Leu Leu Phe Gln Gly Pro

1 5

35

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Sitio de escisión de proteasa del rinovirus humano 3C

<400> 49

Asp A1a Leu Phe G1n Gly Pro

1 5

10

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa del rinovirus humano 3C

<400> 50

20 Asp Va1 Leu Phe G1n Gly Pro

1 5

<210> 51

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa del rinovirus humano 3C

30

<400> 51

Asp Leu Leu Phe G1n Gly Pro

1 5

35 <210> 52

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de consenso del sitio de escisión de proteasa de
5 subtilisina

<221> VARIANTE

<222> 1, 2, 3, 4

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

10

<400> 52

Xaa Xaa Xaa Xaa His Tyr
1 5

15 <210> 53

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Secuencia de consenso del sitio de escisión de proteasa de
subtilisina

<221> VARIANTE

25 <222> 1, 2, 3, 4

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 53

Xaa Xaa Xaa Xaa His Tyr
30 1 5

<210> 54

<211> 2

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa de subtilisina

<400> 54

His Tyr

5 1

<210> 55

<211> 2

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa de subtilisina

15 <400> 55

Tyr His

1

<210> 56

20 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Sitio de escisión de proteasa de subtilisina

<400> 56

Pro Gly Ala Ala His Tyr

1

5

30

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Secuencia de consenso del sitio de escisión de proteasa de caspasa 3

<221> VARIANTE

<222> 2

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido con E preferido

5

<221> VARIANTE

<222> 3

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

10 <221> VARIANTE

<222> 5

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido con G o S preferidos

<400> 57

15 Asp Xaa Xaa Asp Xaa

1

5

<210> 58

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa de caspasa 3

25

<400> 58

Asp Glu Val Asp Gly

1

5

30 <210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Sitio de escisión de proteasa de caspasa 3

<400> 59

Asp Glu Val Asp Ser

1 5

5 <210> 60

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Sitio de escisión de proteasa de caspasa 3

<400> 60

Asp Glu Pro Asp Gly

15 1 5

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa de caspasa 3

25 <400> 61

Asp Glu Pro Asp Ser

1 5

<210> 62

30 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Sitio de escisión de proteasa de caspasa 3

<400> 62

Asp Glu Leu Asp Gly

1 5

<210> 63

5 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Sitio de escisión de proteasa de caspasa 3

<400> 63

Asp Glu Leu Asp Ser

1 5

15

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Secuencia de consenso del sitio de escisión de proteasa de
enteroquinasa

25 <400> 64

Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 65

30 <211> 753

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Marco de lectura abierta de TEV con codón optimizado

<400> 65

ES 2 488 217 T3

atgggcgaat ctctgttcaa ggggccgct gattataacc cgatatcttc tactatttgt 60
 catctgacta acgaaagcga cggccacacg acttctctgt acggtatcgg tttcgggtccg 120
 ttcatacatta ccaacaagca tctgttccgc cgtaacaacg gtaccctgct ggttcaatct 180
 ctgcacggcg tcttcaaggt aaaaaatacc actacgctgc agcagcacct gattgacggc 240
 5 cgtgacatga tcatcatccg catgccgaaa gattttccgc cgttcccgca aaaactgaag 300
 tttcgtgaac cgcaacgcga agaacgtatt tgcctgggta ccaccaactt tcagaccaa 360
 agcatgtctt ctatggtttc cgatacctct tgcaccttcc caagctctga cggtatatttc 420
 tggaacatt ggatccagac caaagatggc cagtgcggct ctccgctggc gtctacgctg 480
 gacggtttca tcgttggtat ccattctgct tctaacttca ctaactactaa caactacttt 540
 10 acttccgctt cgaaaaactt catggagctg ctgactaacc aagaggcca gcagtgggtg 600
 tccggttggc gcctgaacgc agattctgta ctgtggggtg gtcataaggc attcatgaac 660
 aaaccggagg agccgttcca gccggtaaaa gaggcgacct agctgatgaa cgaactgggt 720
 tactctcagg gtcaccacca tcaccacat taa 753

15 <210> 66
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Proteasa TEV (S219N) con etiqueta de afinidad de polihistidina
 de amino terminal

<400> 66
 25 Met Gly Glu Ser Leu Phe Lys Gly Pro Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser
 1 5 10 15
 Ser Thr Ile Cys His Leu Thr Asn Glu Ser Asp Gly His Thr Thr Ser
 20 25 30
 Leu Tyr Gly Ile Gly Phe Gly Pro Phe Ile Ile Thr Asn Lys His Leu
 30 35 40 45
 Phe Arg Arg Asn Asn Gly Thr Leu Leu Val Gln Ser Leu His Gly Val
 50 55 60
 Phe Lys Val Lys Asn Thr Thr Thr Leu Gln Gln His Leu Ile Asp Gly
 65 70 75 80
 35 Arg Asp Met Ile Ile Ile Arg Met Pro Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro
 85 90 95
 Gln Lys Leu Lys Phe Arg Glu Pro Gln Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu
 100 105 110
 Val Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys Ser Met Ser Ser Met Val Ser Asp

cagctgatga acgaactggg ttactctcag taa

753

<210> 68

<211> 250

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteasa TEV (L56V, S135G, S219N) con etiqueta de afinidad de

10 polihistidina amino terminal

<400> 68

Met Gly His His His His His His Gly Glu Ser Leu Phe Lys Gly Pro
 1 5 10 15
 15 Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser Thr Ile Cys His Leu Thr Asn Glu
 20 25 30
 Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu Tyr Gly Ile Gly Phe Gly Pro Phe
 35 40 45
 Ile Ile Thr Asn Lys His Leu Phe Arg Arg Asn Asn Gly Thr Leu Val
 20 50 55 60
 Val Gln Ser Leu His Gly Val Phe Lys Val Lys Asn Thr Thr Thr Leu
 65 70 75 80
 Gln Gln His Leu Ile Asp Gly Arg Asp Met Ile Ile Ile Arg Met Pro
 85 90 95
 25 Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln Lys Leu Lys Phe Arg Glu Pro Gln
 100 105 110
 Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys Ser
 115 120 125
 Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr Ser Cys Thr Phe Pro Ser Gly Asp
 30 130 135 140
 Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile Gln Thr Lys Asp Gly Gln Cys Gly
 145 150 155 160
 Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser
 165 170 175
 35 Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn Asn Tyr Phe Thr Ser Val Pro Lys
 180 185 190
 Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn Gln Glu Ala Gln Gln Trp Val Ser
 195 200 205
 Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val

ES 2 488 217 T3

| | | | | | | |
|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 210 | | 215 | | 220 | |
| | Phe Met Asn Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr | | | | | |
| | 225 | | 230 | | 235 | 240 |
| | Gln Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr Ser Gln | | | | | |
| 5 | | 245 | | 250 | | |

<210> 69

<211> 753

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Marco de lectura abierta de TEV con codón optimizado

15 <400> 69

```

atgggtcacc accatcacca ccatggcgaa tctctgttca aggggccg cg tgattataac 60
ccgatatctt cttctatttg tcatctgact aacgaaagcg acggccacac gacttctctg 120
tacggtatcg gtttcgggtcc gttcatcatt accaacaagc atctgttccg ccgtaacaac 180
ggtagcctgc tggttcaatc tctgcacggc gtcttcaagg taaaagacac cactacgctg 240
20 cagcagcacc tggtcgacgg ccgtgacatg atcatcatcc gcatgccgaa agattttccg 300
ccgttcccgc aaaaactgaa gtttcgtgaa ccgcaacgcg aagaacgtat ttgcctggtt 360
accaccaact ttcagaccaa aagcatgtct tctatggttt ccgatacctc ttgcacctt 420
ccaagctctg acggtatfff ctggaaacat tggatccaga ccaaagatgg tcagtgcggc 480
tctccgctgg tgtctacgcg tgacggtttc atcgttggta tccattctgc ttctaacttc 540
25 actaacacta acaactactt tacttccgtt ccgaaaaact tcatggagct gctgactaac 600
caagaggccc agcagtgggt gtccggttgg cgctgaacg cagattctgt actgtgggg 660
ggtcataagg tattcatgaa caaacggag gagccgttcc agccggtcaa agaggcgacc 720
cagctgatga acgaactggt ttactctcag taa 753
  
```

30 <210> 70

<211> 250

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Proteasa TEV (T17S, N68D, I77V, S219N) con etiqueta de afinidad de polihistidina amino terminal

ES 2 488 217 T3

<400> 70

Met Gly His His His His His His Gly Glu Ser Leu Phe Lys Gly Pro
 1 5 10 15
 Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser Ser Ile Cys His Leu Thr Asn Glu
 5 20 25 30
 Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu Tyr Gly Ile Gly Phe Gly Pro Phe
 35 40 45
 Ile Ile Thr Asn Lys His Leu Phe Arg Arg Asn Asn Gly Thr Leu Leu
 50 55 60
 10 Val Gln Ser Leu His Gly Val Phe Lys Val Lys Asp Thr Thr Thr Leu
 65 70 75 80
 Gln Gln His Leu Val Asp Gly Arg Asp Met Ile Ile Ile Arg Met Pro
 85 90 95
 Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln Lys Leu Lys Phe Arg Glu Pro Gln
 15 100 105 110
 Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys Ser
 115 120 125
 Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr Ser Cys Thr Phe Pro Ser Ser Asp
 130 135 140
 20 Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile Gln Thr Lys Asp Gly Gln Cys Gly
 145 150 155 160
 Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser
 165 170 175
 Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn Asn Tyr Phe Thr Ser Val Pro Lys
 25 180 185 190
 Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn Gln Glu Ala Gln Gln Trp Val Ser
 195 200 205
 Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val
 210 215 220
 30 Phe Met Asn Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr
 225 230 235 240
 Gln Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr Ser Gln
 245 250

35 <210> 71

<211> 753

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 488 217 T3

<220>

<223> Marco de lectura abierta de TEV con codón optimizado

<400> 71

5 atgggtcacc accatcacca ccatggcgaa tctctgttca aggggtccgcg tgattataac 60
ccgatatctt ctactatcttgc tcatctgact aacgaaagcg acggccacac gacttctctg 120
tacggatcgc gtttcggtcc gttcatcatt accgtgaagc atctgttccg ccgtaacaac 180
gggtaccctgg tggttcaatc tctgcacggc gtcttcaagg taaaaaatac cactacgctg 240
cagcagcacc tgattgacgg ccgtgacatg atcatcatcc gcatgccgaa agattttccg 300
10 ccgttcccgc aaaaactgaa gtttcgtgaa ccgcaacgcg aagaacgtat ttgcctgggtt 360
accaccaact ttcagaccaa aagcatgtct tctatggttt ccgatacctc ttgcaccttc 420
ccaagcggtg acggtatctt ctggaaacat tggatccaga ccaaagatgg tcagtgcggc 480
tctccgctgg tgtctacgcg tgacggtttc atcgttggta tccattctgc ttctaacttc 540
actaacacta acaactactt tacttccggt ccgaaaaact tcatggagct gctgactaac 600
15 caagaggccc agcagtgggt gtccggttgg cgcctgaacg cagattctgt actgtgggggt 660
ggtcataagg tattcatgaa caaacggag gagccgttcc agccggtcaa agaggcgacc 720
cagctgatga acgaactggt ttactctcag taa 753

<210> 72

20 <211> 250

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Proteasa TEV (N44V, L56V, S135G, S219N) con etiqueta de
afinidad de polihistidina amino terminal

<400> 72

Met Gly His His His His His His Gly Glu Ser Leu Phe Lys Gly Pro
30 1 5 10 15
Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser Thr Ile Cys His Leu Thr Asn Glu
20 25 30
Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu Tyr Gly Ile Gly Phe Gly Pro Phe
35 40 45
35 Ile Ile Thr Val Lys His Leu Phe Arg Arg Asn Asn Gly Thr Leu Val
50 55 60
Val Gln Ser Leu His Gly Val Phe Lys Val Lys Asn Thr Thr Thr Leu
65 70 75 80

ES 2 488 217 T3

Gln Gln His Leu Ile Asp Gly Arg Asp Met Ile Ile Ile Arg Met Pro
 85 90 95
 Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln Lys Leu Lys Phe Arg Glu Pro Gln
 100 105 110
 5 Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys Ser
 115 120 125
 Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr Ser Cys Thr Phe Pro Ser Gly Asp
 130 135 140
 Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile Gln Thr Lys Asp Gly Gln Cys Gly
 10 145 150 155 160
 Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser
 165 170 175
 Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn Asn Tyr Phe Thr Ser Val Pro Lys
 180 185 190
 15 Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn Gln Glu Ala Gln Gln Trp Val Ser
 195 200 205
 Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val
 210 215 220
 Phe Met Asn Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr
 20 225 230 235 240
 Gln Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr Ser Gln
 245 250

<210> 73

25 <211> 753

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Marco de lectura abierta de TEV con codón optimizado

<400> 73

atgggtcacc accatcacca ccatggcgaa tctctgttca aggggtccgcg tgattataac 60
 ccgatatctt ctactatctg tcatctgact aacgaaagcg acggccacac gacttctctg 120
 35 tacggtatcg gtttcggtcc gttcatcatt accaacaagc atctgttccg ccgtaacaac 180
 ggtaccctgg tggttcaatc tctgcacggc gtcttcaagg taaaagacac cactacgctg 240
 cagcagcacc tgattgacgg ccgtgacatg atcatcatcc gcatgccgaa agattttccg 300
 ccgttcccgc aaaaactgaa gtttcgtgaa ccgcaacgcg aagaacgtat ttgcctgggt 360
 accaccaact ttcagaccaa aagcatgtct tctatggttt ccgatacctc ttgcaccttc 420

ES 2 488 217 T3

ccaagcgggtg acggtatntt ctggaaacat tggatccaga ccaaagatgg tcagtgcggc 480
 tctccgctgg tgtctacgcg tgacggtttc atcgttggta tccattctgc ttctaacttc 540
 actaacacta acaactactt tacttccggt cggaaaaact tcatggagct gctgactaac 600
 caagaggccc agcagtgggt gtccggttgg cgcctgaacg cagattctgt actgtgggggt 660
 5 ggtcataagg tattcatgaa caaacggag gagccgttcc agccggtcaa agaggcgacc 720
 cagctgatga acgaactggg ttactctcag taa 753

<210> 74

<211> 250

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Proteasa TEV (L56V, N68D, S135G, S219N) con etiqueta de
 afinidad de polihistidina amino terminal

<400> 74

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

ES 2 488 217 T3

Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn Asn Tyr Phe Thr Ser Val Pro Lys
 180 185 190
 Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn Gln Glu Ala Gln Gln Trp Val Ser
 195 200 205
 5 Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val
 210 215 220
 Phe Met Asn Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr
 225 230 235 240
 Gln Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr Ser Gln
 10 245 250

<210> 75

<211> 753

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Marco de lectura abierta de TEV con codón optimizado

20 <400> 75

atgggtcacc accatcacca ccatggcgaa tctctgttca aggggtccgcg tgattataac 60
 ccgatatcctt cttctatctg tcatctgact aacgaaagcg acggccacac gacttctctg 120
 tacggtatcg gtttcgggtcc gttcatcatt accaacaagc atctgttccg ccgtaacaac 180
 ggtaccctgg tggttcaatc tctgcacggc gtcttcaagg taaaagacac cactacgctg 240
 25 cagcagcacc tggtcgacgg ccgtgacatg atcatcatcc gcatgccgaa agattttccg 300
 ccgttcccgc aaaaactgaa gtttcgtgaa ccgcaacgcg aagaacgtat ttgcctgggt 360
 accaccaact ttcagaccaa aagcatgtct tctatggttt ccgatacctc ttgcaccttc 420
 ccaagctctg acggtatctt ctggaacat tggatccaga ccaaagatgg tcagtgcggc 480
 tctccgctgg tgtctacgcg tgacggtttc atcgttggtg tccattctgc ttctaacttc 540
 30 actaacacta acaactactt tacttccggt ccgaaaaact tcatggagct gctgactaac 600
 caagaggccc agcagtgggt gtccggttgg cgcctgaacg cagattctgt actgtgggggt 660
 ggtcataagg tattcatgaa caaacggag gagccgttcc agccgggtcaa agaggcgacc 720
 cagctgatga acgaactggt ttactctcag taa 753

35 <210> 76

<211> 250

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 488 217 T3

<220>

<223> Proteasa TEV (T17S, L56V, N68D, I77V, S219N) con etiqueta de afinidad de polihistidina de amino terminal

5

<400> 76

Met Gly His His His His His His Gly Glu Ser Leu Phe Lys Gly Pro
 1 5 10 15
 Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser Ser Ile Cys His Leu Thr Asn Glu
 10 20 25 30
 Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu Tyr Gly Ile Gly Phe Gly Pro Phe
 35 40 45
 Ile Ile Thr Asn Lys His Leu Phe Arg Arg Asn Asn Gly Thr Leu Val
 50 55 60
 15 Val Gln Ser Leu His Gly Val Phe Lys Val Lys Asp Thr Thr Thr Leu
 65 70 75 80
 Gln Gln His Leu Val Asp Gly Arg Asp Met Ile Ile Ile Arg Met Pro
 85 90 95
 Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln Lys Leu Lys Phe Arg Glu Pro Gln
 20 100 105 110
 Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys Ser
 115 120 125
 Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr Ser Cys Thr Phe Pro Ser Ser Asp
 130 135 140
 25 Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile Gln Thr Lys Asp Gly Gln Cys Gly
 145 150 155 160
 Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser
 165 170 175
 Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn Asn Tyr Phe Thr Ser Val Pro Lys
 30 180 185 190
 Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn Gln Glu Ala Gln Gln Trp Val Ser
 195 200 205
 Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val
 210 215 220
 35 Phe Met Asn Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr
 225 230 235 240
 Gln Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr Ser Gln
 245 250

ES 2 488 217 T3

<210> 77

<211> 753

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Marco de lectura abierta de TEV con codón optimizado

10 <400> 77

atgggtcacc accatcacca ccatggcgaa tctctgttca aggggccg cg tgattataac 60
ccgatatctt cttctatctg tcctctgact aacgaaagcg acggccacac gacttctctg 120
tacggtatcg gtttcggtcc gttcatcatt accaacaagc atctgttccg ccgtaacaac 180
gggtaccctgc tggttcaatc tctgcacggc gtcttcaagg taaaagacac cactacgctg 240
15 cagcagcacc tggtcgacgg ccgtgacatg atcatcatcc gcatgccgaa agattttccg 300
ccgttcccgc aaaaactgaa gtttcgtgaa ccgcaacgcg aagaacgtat ttgcctgggt 360
accaccaact ttcagaccaa aagcatgtct tctatggttt ccgatacctc ttgcaccttc 420
ccaagcgggtg acggtatctt ctggaacat tggatccaga ccaagatgg tcagtgcggc 480
tctccgctgg tgtctacgcg tgacggtttc atcgttggta tccattctgc ttctaacttc 540
20 actaacacta acaactactt tacttccggt ccgaaaaact tcatggagct gctgactaac 600
caagaggccc agcagtggtt gtccggttgg cgcctgaacg cagattctgt actgtgggggt 660
ggtcataagg tattcatgaa caaacggag gagccgttcc agccgggtcaa agaggcgacc 720
cagctgatga acgaactggt ttactctcag taa 753

25 <210> 78

<211> 250

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Proteasa TEV (T17S, N68D, I77V, S135G, S219N) con etiqueta de
afinidad de polihistidina amino terminal

<400> 78

35 Met Gly His His His His His His Gly Glu Ser Leu Phe Lys Gly Pro
1 5 10 15
Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser Ser Ile Cys His Leu Thr Asn Glu
20 25 30

ES 2 488 217 T3

Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu Tyr Gly Ile Gly Phe Gly Pro Phe
 35 40 45
 Ile Ile Thr Asn Lys His Leu Phe Arg Arg Asn Asn Gly Thr Leu Leu
 50 55 60
 5 Val Gln Ser Leu His Gly Val Phe Lys Val Lys Asp Thr Thr Thr Leu
 65 70 75 80
 Gln Gln His Leu Val Asp Gly Arg Asp Met Ile Ile Ile Arg Met Pro
 85 90 95
 Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln Lys Leu Lys Phe Arg Glu Pro Gln
 10 100 105 110
 Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys Ser
 115 120 125
 Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr Ser Cys Thr Phe Pro Ser Gly Asp
 130 135 140
 15 Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile Gln Thr Lys Asp Gly Gln Cys Gly
 145 150 155 160
 Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser
 165 170 175
 Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn Asn Tyr Phe Thr Ser Val Pro Lys
 20 180 185 190
 Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn Gln Glu Ala Gln Gln Trp Val Ser
 195 200 205
 Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val
 210 215 220
 25 Phe Met Asn Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr
 225 230 235 240
 Gln Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr Ser Gln
 245 250

30 <210> 79

<211> 753

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Marco de lectura abierta de TEV con codón optimizado

<400> 79

atgggcgaat ctctgttcaa ggggccgcgt gattataacc cgatatcttc ttctatttgt 60

ES 2 488 217 T3

catctgacta acgaaagcga cggccacacg acttctctgt acggtatcgg tttcgggccg 120
 ttcattcatta ccgtgaagca tctgttccgc cgtaacaacg gtaccctggt ggttcaatct 180
 ctgcacggcg tcttcaagggt aaaagacacc actacgctgc agcagcacct ggtcgacggc 240
 cgtgacatga tcattcatccg catgccgaaa gattttccgc cgttcccgca aaaactgaag 300
 5 tttcgtgaac cgcaacgcga agaacgtatt tgcctgggta ccaccaactt tcagaccaa 360
 agcatgtctt ctatggtttc cgatacctct tgcaccttcc caagcgggta cggatatttc 420
 tggaacatt ggatccagac caaagatggt cagtgcggct ctccgctggt gtctacgct 480
 gacggtttca tcggtggtat ccattctgct tctaacttca ctaactactaa caactacttt 540
 acttccggtc cgaaaaactt catggagctg ctgactaacc aagaggccca gcagtgggtg 600
 10 tccggttggc gcctgaacgc agattctgta ctgtgggggtg gtcataaggt attcatgaac 660
 aaaccggagg agccgttcca gccgggtcaaa gaggcgaccc agctgatgaa cgaactgggt 720
 tactctcagg gtcaccacca tcaccacat taa 753

<210> 80

15 <211> 250

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Proteasa TEV (T17S, N44V, L56V, N68D, I77V, S135G,
 S219N) con etiqueta de afinidad de polihistidina de
 carboxilo terminal

<400> 80

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

ES 2 488 217 T3

Val Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys Ser Met Ser Ser Met Val Ser Asp
 115 120 125
 Thr Ser Cys Thr Phe Pro Ser Gly Asp Gly Ile Phe Trp Lys His Trp
 130 135 140
 5 Ile Gln Thr Lys Asp Gly Gln Cys Gly Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg
 145 150 155 160
 Asp Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr
 165 170 175
 Asn Asn Tyr Phe Thr Ser Val Pro Lys Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr
 10 180 185 190
 Asn Gln Glu Ala Gln Gln Trp Val Ser Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp
 195 200 205
 Ser Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val Phe Met Asn Lys Pro Glu Glu
 210 215 220
 15 Pro Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr Gln Leu Met Asn Glu Leu Val
 225 230 235 240
 Tyr Ser Gln Gly His His His His His His
 245 250

20 <210> 81
 <211> 753
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Marco de lectura abierta de TEV con codón optimizado

<400> 81
 atgggtcacc accatcacca ccatggcgaa tctctgttca aggggtccgcg tgattataac 60
 30 ccgatatctt cttctatttg tcatctgact aacgaaagcg acggccacac gacttctctg 120
 tacggtatcg gtttcggtcc gttcatcatt accgtgaagc atctgttccg ccgtaacaac 180
 ggtaccctgg tggttcaatc tctgcacggc gtcttcaagg taaaagacac cactacgctg 240
 cagcagcacc tggtcgacgg ccgtgacatg atcatcatcc gcatgccgaa agattttccg 300
 ccgttcccgc aaaaactgaa gtttcgtgaa ccgcaacgcg aagaacgtat ttgcctgggt 360
 35 accaccaact ttcagaccaa aagcatgtct tctatggttt ccgatacctc ttgcaccttc 420
 ccaagcgggtg acggtatttt ctggaacat tggatccaga ccaaagatgg tcagtgcggc 480
 tctccgctgg tgtctacgcg tgacggtttc atcgttgta tccattctgc ttctaacttc 540
 actaacacta acaactactt tacttccggt ccgaaaaact tcatggagct gctgactaac 600
 caagaggccc agcagtgggt gtccggttgg cgcctgaacg cagattctgt actgtggggt 660

ES 2 488 217 T3

ggtcataagg tattcatggt gaaaccggag gagccgttcc agccgggtcaa agaggcgacc 720
 cagctgatga acgaactggt ttactctcag taa 753

<210> 82

5 <211> 250

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Proteasa TEV (T17S, N44V, L56V, N68D, I77V, S135G,
 S219V) con etiqueta de afinidad de polihistidina amino terminal

<400> 82

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Met | Gly | His | His | His | His | His | His | Gly | Glu | Ser | Leu | Phe | Lys | Gly | Pro |
| 15 | 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| | Arg | Asp | Tyr | Asn | Pro | Ile | Ser | Ser | Ser | Ile | Cys | His | Leu | Thr | Asn | Glu |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | 30 | | | |
| | Ser | Asp | Gly | His | Thr | Thr | Ser | Leu | Tyr | Gly | Ile | Gly | Phe | Gly | Pro | Phe |
| | | | 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| 20 | Ile | Ile | Thr | Val | Lys | His | Leu | Phe | Arg | Arg | Asn | Asn | Gly | Thr | Leu | Val |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | 60 | | | | | |
| | Val | Gln | Ser | Leu | His | Gly | Val | Phe | Lys | Val | Lys | Asp | Thr | Thr | Thr | Leu |
| | 65 | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| | Gln | Gln | His | Leu | Val | Asp | Gly | Arg | Asp | Met | Ile | Ile | Ile | Arg | Met | Pro |
| 25 | | | | 85 | | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| | Lys | Asp | Phe | Pro | Pro | Phe | Pro | Gln | Lys | Leu | Lys | Phe | Arg | Glu | Pro | Gln |
| | | | | 100 | | | | | | 105 | | | | | 110 | |
| | Arg | Glu | Glu | Arg | Ile | Cys | Leu | Val | Thr | Thr | Asn | Phe | Gln | Thr | Lys | Ser |
| | | | | 115 | | | | | | 120 | | | | | 125 | |
| 30 | Met | Ser | Ser | Met | Val | Ser | Asp | Thr | Ser | Cys | Thr | Phe | Pro | Ser | Gly | Asp |
| | | | | 130 | | | | | | 135 | | | | | 140 | |
| | Gly | Ile | Phe | Trp | Lys | His | Trp | Ile | Gln | Thr | Lys | Asp | Gly | Gln | Cys | Gly |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | | 155 | | | | 160 |
| | Ser | Pro | Leu | Val | Ser | Thr | Arg | Asp | Gly | Phe | Ile | Val | Gly | Ile | His | Ser |
| 35 | | | | | 165 | | | | | | | 170 | | | | 175 |
| | Ala | Ser | Asn | Phe | Thr | Asn | Thr | Asn | Asn | Tyr | Phe | Thr | Ser | Val | Pro | Lys |
| | | | | 180 | | | | | | | | 185 | | | | 190 |
| | Asn | Phe | Met | Glu | Leu | Leu | Thr | Asn | Gln | Glu | Ala | Gln | Gln | Trp | Val | Ser |
| | | | | 195 | | | | | | | | | | | 200 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | 205 |

ES 2 488 217 T3

Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val
210 215 220
Phe Met Val Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr
225 230 235 240
5 Gln Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr Ser Gln
245 250

<210> 83

<211> 753

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Marco de lectura abierta de TEV con codón optimizado

15

<400> 83

atgggtcacc accatcacca ccatggcgaa tctctgttca aggggtccgcg tgattataac 60
ccgatatctt cttctatttg tcatctgact aacgaaagcg acggccacac gacttctctg 120
tacggtatcg gtttcggtcc gttcatcatt accgtgaagc atctgttccg ccgtaacaac 180
20 ggtaccctgg tggttcaatc tctgcacggc gtcttcaagg taaaagacac cactacgctg 240
cagcagcacc tggtcgacgg ccgtgacatg atcatcatcc gcatgccgaa agattttccg 300
ccgttcccgc aaaaactgaa gtttcgtgaa ccgcaacgcg aagaacgtat ttgcctgggtt 360
accaccaact ttcagaccaa aagcatgtct tctatggttt ccgatacctc ttgcaccttc 420
ccaagcggtg acggtatfff ctggaaacat tggatccaga ccaaagatgg tcagtgcggc 480
25 tctccgctgg tgtctacgcg tgacggtttc atcgttggtg tccattctgc ttctaacttc 540
actaacacta acaactactt tacttccggt ccgaaaaact tcatggagct gctgactaac 600
caagaggccc agcagtgggt gtccggttgg cgcctgaacg cagattctgt actgtgggggt 660
ggtcataagg tattcatgaa caaacggag gagccgttcc agccggtcaa agaggcgacc 720
cagctgatga acgaactggt ttactctcag taa 753

30

<210> 84

<211> 250

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Proteasa TEV (T17S, N44V, L56V, N68D, I77V, S135G,

S219N) con etiqueta de afinidad de polihistidina amino terminal

ES 2 488 217 T3

<400> 84

Met Gly His His His His His His Gly Glu Ser Leu Phe Lys Gly Pro
 1 5 10 15
 5 Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser Ser Ile Cys His Leu Thr Asn Glu
 20 25 30
 Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu Tyr Gly Ile Gly Phe Gly Pro Phe
 35 40 45
 Ile Ile Thr Val Lys His Leu Phe Arg Arg Asn Asn Gly Thr Leu Val
 10 50 55 60
 Val Gln Ser Leu His Gly Val Phe Lys Val Lys Asp Thr Thr Thr Leu
 65 70 75 80
 Gln Gln His Leu Val Asp Gly Arg Asp Met Ile Ile Ile Arg Met Pro
 85 90 95
 15 Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln Lys Leu Lys Phe Arg Glu Pro Gln
 100 105 110
 Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys Ser
 115 120 125
 Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr Ser Cys Thr Phe Pro Ser Gly Asp
 20 130 135 140
 Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile Gln Thr Lys Asp Gly Gln Cys Gly
 145 150 155 160
 Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser
 165 170 175
 25 Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn Asn Tyr Phe Thr Ser Val Pro Lys
 180 185 190
 Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn Gln Glu Ala Gln Gln Trp Val Ser
 195 200 205
 Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val
 30 210 215 220
 Phe Met Asn Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr
 225 230 235 240
 Gln Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr Ser Gln
 245 250

35

<210> 85

<211> 750

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 488 217 T3

<220>

<223> Marco de lectura abierta de TEV nativo

5 <400> 85

atgcatcacc atcaccacca tggagaaagc ttgtttaagg gaccacgtga ttacaacccg 60
 atatcgagca ccatttgta tttgacgaat gaatctgatg ggcacacaac atcgttgtat 120
 ggtattggat ttggtccctt catcattaca aacaagcact tgtttcgccg taataatgga 180
 aactgttg tccaatcact acatggtgta ttcaaggta agaacaccac gactttgcaa 240
 10 caacacctca ttgatgggag ggacatgata attattcgca tgcctaagga tttcccacca 300
 tttcctcaaa agctgaaatt tagagagcca caaaggaag agcgcactctg tcttgtgaca 360
 accaacttcc aaactaagag catgtctagc atggtgtcag acactagtgtg cacattccct 420
 tcatctgatg gcatattctg gaagcattgg atccaaacca aggatgggca gtgtggcagt 480
 ccattagtat caactagaga tgggttcatt gttggtatac actcagcatc gaatttcacc 540
 15 aacacaaaca attatttcac aagcgtgccg aaaaacttca tggaattggt gacaaatcag 600
 gaggcgcagc agtgggtag tggttggcga ttaaagtctg actcagtatt gtgggggggc 660
 cataaagttt tcatgaaca acctgaagag ccttttcagc cagttaagga agcgactcaa 720
 ctcatgaatg aattggtgta ctcgcaataa 750

20 <210> 86

<211> 249

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Proteasa TEV (S219N) con etiqueta de afinidad de polihistidina
 de amino terminal

<400> 86

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

ES 2 488 217 T3

65 70 75 80
 Gln His Leu Ile Asp Gly Arg Asp Met Ile Ile Ile Arg Met Pro Lys
 85 90 95
 Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln Lys Leu Lys Phe Arg Glu Pro Gln Arg
 5 100 105 110
 Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys Ser Met
 115 120 125
 Ser Ser Met Val Ser Asp Thr Ser Cys Thr Phe Pro Ser Ser Asp Gly
 130 135 140
 10 Ile Phe Trp Lys His Trp Ile Gln Thr Lys Asp Gly Gln Cys Gly Ser
 145 150 155 160
 Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser Ala
 165 170 175
 Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn Asn Tyr Phe Thr Ser Val Pro Lys Asn
 15 180 185 190
 Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn Gln Glu Ala Gln Gln Trp Val Ser Gly
 195 200 205
 Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val Phe
 210 215 220
 20 Met Asn Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr Gln
 225 230 235 240
 Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr Ser Gln
 245

25 <210> 87
 <211> 3984
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Marco de lectura abierta que codifica BoNT/A-TEV

<400> 87
 atgccgttcg taaacaaca gttcaactat aaagaccag tcaacggcgt ggacattgcc 60
 35 tatatcaaaa tcccgaatgc gggcfaatg cagcccgtga aagcatttaa aatccataac 120
 aaaatttggg tgatcccga gcgcatatg ttcacgaacc cggaagaagg agatttaaac 180
 ccaccgctg aggctaaaca ggtcccgtg tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
 gacaatgaaa aggacaacta cctgaaagg gttaccaaac tgttcgagcg catttattcg 300
 acagatctcg gtcgcatggt gctgacttct attgtgcgcg gcattccggt ttggggtggg 360

ES 2 488 217 T3

agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
 gatgggagct accggtccga agagcttaac ctcgtaatca ttggcccag cgcggatatt 480
 atccaattcg aatgtaaact ttttgggcat gaagtctga atctgacgcg gaatggctat 540
 ggatcgacgc agtatattcg tttttctcca gatttcacat ttggatttga agaaagcctc 600
 5 gaagttgata cgaacctct ttttaggcgcg ggaaaattcg cgacggacc agcggtgacc 660
 ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgcttgatg gaatcgccat taaccggaac 720
 cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgat tacgagatgt cgggcttaga agtgccttt 780
 gaagaactgc gcacgtttgg cggcatgat gcaaaattta ttgatagtct gcaagaaaac 840
 gaatttcggc tgtactatta caataaattc aaagacattg catcaacctt aaacaaggcg 900
 10 aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgtttt caaagaaaa 960
 tacctcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa atttgataaa 1020
 ctgtataaaa tgctcaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt cttcaaggtc 1080
 ttgaatcggg aaacctatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
 aaagttaact acaccatcta tgatggcttt aatctgcgca atacgaatct ggcggcgaac 1200
 15 tttaacggcc agaacaccga aatcaacaac atgaacttta ctaaactgaa aaattttacc 1260
 ggcttgtttg aattctataa gctcctgtgt gtccgcggta ttatcaccag caaaaccaa 1320
 tccttgggcg gtggtggcga aaacctgtac ttccagggcg gtggcggtg tgataagggc 1380
 tataacaagg ctttaaatga tttatgcatc aaggtgaaca actgggactt gtttttctct 1440
 ccatctgaag ataattttac taacgacttg aacaaaggag aggaaattac ttccgatacc 1500
 20 aacatcgaag cagcgaaga gaatattagc ctggatctta ttcaacaata ttacctgacc 1560
 tttaattttg ataacgagcc tgagaacatt tccattgaga atctcagctc tgacatcatc 1620
 ggccagctgg aactgatgcc gaatatcgaa cgctttccta atggaaaga atatgaattg 1680
 gacaaataca ccatgttcca ctatctccg gcgcaggagt ttgagcacgg caagtctcgt 1740
 attgctctga ccaattcggg aaacgaagcc cttttaaact cttcgcgtgt gtacaccttt 1800
 25 ttctcaagcg attatgttaa aaaagtgaac aaggcgaccg aagcggcgat gtttttggga 1860
 tgggtggaac aactgggata tgactttacg gatgaaactt ctgaagtctc gaccaccgac 1920
 aaaattgccg atattaccat tatcattccc tatattggcc ctgactgaa cattggtaac 1980
 atgctgtata aagatgattt tgtggcgcc ctgatctttt caggcgtgt tatcctgctg 2040
 gaatttatcc cggaaatcgc cattccagta ctcggtacct ttgcgctggg gtcctatatc 2100
 30 gcaaacaaag ttttgactgt ccagacgatc gacaacgcgc tcagtaaacy taacgaaaa 2160
 tgggatgagg tgtataagta tattgttacc aactggctcg ctaaagtaa caccagatt 2220
 gacctgattc gcaagaagat gaaagaagcg ctggaaaacc aagcagaagc gaccaaagct 2280
 attatcaact atcaatataa ccagtacaca gaggaagaaa agaataacat caacttcaac 2340
 atcgacgact tatcttcaa gctgaatgaa tctattaaca aagcgatgat taatattaac 2400
 35 aagttcttga accaatgtag tgtcagctat ctgatgaact cgatgatccc ttacggtgtg 2460
 aaacgtctgg aagacttcga tgcaagcctt aaagatgcc ttctgaagta tatttacgat 2520
 aatcgcggaa ctcttattgg ccaagtggat cgcttaaaag ataaagtcaa caacacgctg 2580
 agtacagaca tcccttttca gctgtctaaa tatgtggaca atcagcgctt gctgtccacg 2640
 tttacggaat acatcaaaaa catcatcaac actagtattc tgaacttgcg ttacgagagt 2700

ES 2 488 217 T3

aaccatctga ttgatctgag cggttacgca tctaaaatca acatcggctc gaagggtgaac 2760
 ttcgatccta tcgacaaaaa ccagattcaa ttgttcaact tagaatcgtc aaagattgaa 2820
 gttatcttaa aaaatgcatg tgtatataat tcaatgtacg aaaatttctc tacgagcttt 2880
 tggattcgta ttccgaataa tttcaacagt atctctttaa acaacgagta tactatcatc 2940
 5 aattgtatgg agaataacag cgggtggaaa gtgagcctta actatggtga aatcatctgg 3000
 actctgcagg aactcaaga aattaaaca cgcgtggtgt ttaaatactc acagatgatt 3060
 aacatctcgg attatattaa tcgctggatt tttgtgacaa ttactaaca cgggctgaac 3120
 aacagcaaaa ttacattaa cggtcgcctg atcgcacaga aaccaatcag taatctcggg 3180
 aacattcacg catcgaataa tatcatgttc aaactggatg gttgtcgcga cacgcaccgt 3240
 10 tacatttggg tcaaatactt caatttattc gacaaagaac tcaacgaaaa ggagattaag 3300
 gatctttatg acaatcagtc taattcgggt attctgaaag acttttgggg tgattacctt 3360
 cagtacgata aaccgtatta tatgttaaac ttatatgatc cgaataaata cgttgacgtc 3420
 aacaacgttg gcattcgtgg ctatatgtat ctgaaagggc cgcgtggcag cgtgatgacc 3480
 actaacattt acttaaaact ctcctctat cgcggtacta aatttattat caagaaatat 3540
 15 gcctctggca acaaggacaa tatcgtacgc aataacgatc gcgctacat taacgtggtg 3600
 gtgaagaata aagaatatcg tctggcgacc aatgctagtc aggcgggctg ggagaaaatt 3660
 ctgtctgcac ttgaaatccc ggatgtgggt aatttatccc aggtggtgtg gatgaaaagt 3720
 aaaaatgacc aagggatcac caataaatgc aaaatgaatc tgcaagataa caacggcaac 3780
 gacattgggt ttatcggctt ccaccaattc aataatatcg cgaaactggt ggcctcaaat 3840
 20 tggtaacaac gtcagattga ggcagctcc cgcacttag gctgtagctg ggagttcatt 3900
 ccggtagatg acggttgggg agaacgcca ttgaaagtcg acaagcttgc ggccgcaactc 3960
 gagcaccacc accaccacca ctga 3984

<210> 88

25 <211> 1327

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> BoNT/A-TEV

<400> 88

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

ES 2 488 217 T3

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

ES 2 488 217 T3

Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
 370 375 380
 Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
 385 390 395 400
 5 Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
 405 410 415
 Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
 420 425 430
 Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Gly Gly Gly Gly Glu Asn
 10 435 440 445
 Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Gly Tyr Asn Lys Ala
 450 455 460
 Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser
 465 470 475 480
 15 Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile
 485 490 495
 Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu Asp
 500 505 510
 Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro Glu
 20 515 520 525
 Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu
 530 535 540
 Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu
 545 550 555 560
 25 Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu His
 565 570 575
 Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu Leu
 580 585 590
 Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys Lys
 30 595 600 605
 Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu Gln
 610 615 620
 Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr Asp
 625 630 635 640
 35 Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu
 645 650 655
 Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu Ile
 660 665 670
 Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala Ile

ES 2 488 217 T3

675 680 685
 Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val
 690 695 700
 Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys
 5 705 710 715 720
 Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val
 725 730 735
 Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu Glu
 740 745 750
 10 Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln
 755 760 765
 Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu
 770 775 780
 Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn
 15 785 790 795 800
 Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile
 805 810 815
 Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys Asp
 820 825 830
 20 Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly Gln
 835 840 845
 Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp Ile
 850 855 860
 Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser Thr
 25 865 870 875 880
 Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn Leu
 885 890 895
 Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser Lys
 900 905 910
 30 Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn Gln
 915 920 925
 Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu Lys
 930 935 940
 Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser Phe
 35 945 950 955 960
 Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn Glu
 965 970 975
 Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser
 980 985 990

ES 2 488 217 T3

Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu Ile
 995 1000 1005
 Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser Asp
 1010 1015 1020
 5 Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu Asn
 1025 1030 1035 1040
 Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro Ile
 1045 1050 1055
 Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile Met Phe Lys Leu
 10 1060 1065 1070
 Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp Ile Lys Tyr Phe Asn
 1075 1080 1085
 Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr Asp
 1090 1095 1100
 15 Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu
 1105 1110 1115 1120
 Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys
 1125 1130 1135
 Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys
 20 1140 1145 1150
 Gly Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser
 1155 1160 1165
 Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn
 1170 1175 1180
 25 Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val
 1185 1190 1195 1200
 Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly
 1205 1210 1215
 Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu
 30 1220 1225 1230
 Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr Asn
 1235 1240 1245
 Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly Phe
 1250 1255 1260
 35 Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser Asn
 1265 1270 1275 1280
 Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys Ser
 1285 1290 1295
 Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Arg Pro Leu Lys

ES 2 488 217 T3

| | | | |
|-----|-------------------------|---------------------|---------|
| | 1300 | 1305 | 1310 |
| Val | Asp Lys Leu Ala Ala Ala | Leu Glu His His His | His His |
| | 1315 | 1320 | 1325 |

5 <210> 89
 <211> 1044
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia intercalada que contiene sitios transcripcionales y traduccionales.

<400> 89

15 aagcttgagg cctcaaattg gtacaaccgt cagattgagc gcagctcccg cactttaggc 60
 tgtagctggg agttcattcc ggtagatgac ggttggggag aacgcccatt gcaccatcat 120
 caccatcact gagcggccgc ataatgctta agtcgaacag attgatatgt agctataagt 180
 aatcgtattg tacacggccg cataatcgaa attaatacga ctactatag gggaattgtg 240
 agcggataac aattcccat cttagtatat tagttaagta taagaaggag atataccatg 300
 20 ggcgaatctc tgttcaaggg tccgcgtgat tataaccga tatcttctc tatttgtcat 360
 ctgactaacg aaagcgacgg ccacacgact tctctgtacg gtatcggttt cgggccgttc 420
 atcattacca acaagcatct gttccgccgt aacaacggta ccctgctggt tcaatctctg 480
 cacggcgtct tcaaggtaaa agacaccact acgctgcagc agcacctggt cgacggccgt 540
 gacatgatca tcatccgcat gccgaaagat tttccgccgt tcccgcaaaa actgaagttt 600
 25 cgtgaaccgc aacgcgaaga acgtatttgc ctggttacca ccaacttca gacaaaagc 660
 atgtcttcta tggtttccga tacctcttgc accttccaa gcggtgacgg tattttctgg 720
 aaacattgga ttcagaccaa agatggtcag tgcggctctc cgctggtgtc tacgcgtgac 780
 ggtttcatcg ttggtatcca ttctgttct aacttacta aactaacta ctactttact 840
 tccgttccga aaaacttcat ggagctgctg actaaccaag aggcccagca gtgggtgtcc 900
 30 ggttggcgcc tgaacgcaga ttctgtactg tggggtggtc ataaggtatt catgaacaaa 960
 ccggaggagc cgttccagcc ggtcaaagag gcgaccagc tgatgaacga actggtttac 1020
 tctcagtaag agctctgtct cgag 1044

<210> 90
 35 <211> 4851
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 488 217 T3

<220>

<223> Marcos de lectura abierta de BoNT/A-TEV y variante 4 de proteasa

TEV con los elementos de transcripción y traducción intercalados.

5 <400> 90
atgccgttcg taaacaaca gttcaactat aaagaccag tcaacggcgt ggacattgcc 60
tatatcaaaa tcccgaatgc gggcfaatg cagcccgtga aagcatttaa aatccataac 120
aaaatttggg tgatcccga ggcgatacg ttcacgaacc cggaagaagg agatttaaac 180
ccaccgcctg aggctaaaca ggtcccgggtg tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
10 gacaatgaaa aggacaacta cctgaaagggt gttaccaaac tgttcgagcg catttattcg 300
acagatctcg gtcgcatggt gctgacttct attgtgcgcg gcattccgtt ttggggtgggt 360
agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
gatgggagct accggtccga agagctaac ctcgtaatca ttggcccag cgcggatatt 480
atccaattcg aatgtaaadc ttttgggcat gaagtcctga atctgacgcg gaatggctat 540
15 ggatcgagcg agtatattcg ttttctcca gatttcacat ttggatttga agaaagcctc 600
gaagttgata cgaaccctct tttaggcgcg ggaaaattcg cgacggacc agcggtgacc 660
ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgcttgatg gaatcgccat taaccgaaac 720
cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgat tacgagatgt cgggcttaga agtgtccttt 780
gaagaactgc gcacgtttgg cggcatgat gcaaaattta ttgatagtct gcaagaaaac 840
20 gaatttcggc tgtactatta caataaattc aaagacattg catcaacctt aaacaaggcg 900
aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgtttt caaagaaaaa 960
tacctcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa atttgataaa 1020
ctgtataaaa tgctcaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt cttcaaggct 1080
ttgaatcggg aaactatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
25 aaagttaact acaccatcta tgatggcttt aatctgcgca atacgaatct ggcggcgaac 1200
tttaacggcc agaacaccga aatcaacaac atgaacttta ctaaactgaa aaattttacc 1260
ggcttgtttg aattctataa gctcctgtgt gtccgcggta ttatcaccag caaaacaaa 1320
tccttgggcg gtggtggcga aaactgtac ttccagggcg gtggcggtgg tgataagggc 1380
tataacaagg ccttcaatga tttatgcatc aaggtaaca actgggactt gtttttctct 1440
30 ccatctgaag ataattttac taacgacttg aacaaaggag aggaaattac ttccgatacc 1500
aacatcgaag cagcgggaaga gaatattagt ctagatctta ttcaacaata ttacctgacc 1560
tttaattttg ataacgagcc tgagaacatt tccattgaga atctcagctc tgacatcatc 1620
ggccagctgg aactgatgcc gaatatcga cgctttccta atggaaagaa atatgaattg 1680
gacaaataca ccatgttcca ctatctccgc ggcgaggagt ttgagcacgg caagtctcgt 1740
35 attgctctga ccaattcgggt aaacgaagcc cttttaaadc cttcgcgtgt gtacaccttt 1800
ttctcaagcg attatgttaa aaaagtgaac aaggcgaccg aagcggcgat gtttttggga 1860
tgggtggaac aactggata tgactttacg gatgaaactt ctgaagtctc gaccaccgac 1920
aaaattgccg atattaccat tatcattccc tatattggcc ctgactgaa cattggtaac 1980
atgctgtata aagatgattt tgtgggcgcc ctgatctttt caggcgctgt tatcctgctg 2040

ES 2 488 217 T3

gaatttatcc cggaaatcgc cattccagta ctcggtacct ttgctgctggt gtcctatatc 2100
 gcaaacaaag ttttgactgt ccagacgacg gacaacgcgc tcagtaaacy taacgaaaaa 2160
 tgggatgagg tgtataagta tattgttacc aactggctcg ctaaagtaaa caccagatt 2220
 gacctgattc gcaagaagat gaaagaagcg ctggaaaacc aagcagaagc gaccaaagct 2280
 5 attatcaact atcaatataa ccagtacaca gaggaagaaa agaataacat caacttcaac 2340
 atcgacgact tatcttcaaa gctgaatgaa tctattaaca aagcgatgat taatattaac 2400
 aagttcttga accaatgtag tgtcagctat ctgatgaact cgatgatccc ttacggtgtg 2460
 aaacgtctgg aagacttcga tgcaagcctt aaagatgccc ttctgaagta tatttacgat 2520
 aatcgcgga cttctattgg ccaagtggat cgcttaaaa ataaagtcaa caacacgctg 2580
 10 agtacagaca tcccttttca gctgtctaaa tatgtggaca atcagcgctt gctgtccacg 2640
 ttacggaat acatcaaaaa catcatcaac actagtattc tgaacttgcg ttacgagagt 2700
 aaccatctga ttgatctgag cggttacgca tctaaaatca acatcggatc caaggtgaac 2760
 ttcgatccta tcgacaaaaa ccagattcaa ttgttcaact tagaatcgtc aaagattgaa 2820
 gttatcttaa aaaatgcatg tgtatataat tcaatgtacg aaaatttctc tacgagcttt 2880
 15 tggattcgta ttccgaataa tttcaacagt atctctttaa acaacgagta tactatcatc 2940
 aattgtatgg agaataacag cgggtggaaa gtgagcctta actatggtga aatcatctgg 3000
 actctgcagg aactcaaga aattaaaca cgcgtggtgt ttaaatactc acagatgatt 3060
 aacatctcgg attatattaa tcgctggatt tttgtgacaa ttactaaca cgggctgaac 3120
 aacagcaaaa ttacattaa cggctgcctg atcgatcaga aaccaatcag taatctcggg 3180
 20 aacattcacg catcgaataa tatcatgttc aaactggatg gttgtcgcga cacgcaccgt 3240
 tacatttggg tcaaataact caatttattc gacaaagaac tcaacgaaaa ggagattaag 3300
 gatctttatg acaatcagtc taattcgggt attctgaaag acttttgggg tgattacctt 3360
 cagtacgata aaccgtatta tatgttaaac ttatatgac cgaataaata cgttgacgtc 3420
 aacaacgttg gcattcgtgg ctatatgtat ctgaaagggc cgcgtggcag cgtgatgacc 3480
 25 actaacattt acttaactc ctccctctat cgcggtacta aatttattat caagaaatat 3540
 gcctctggca acaaggacaa tatcgtacgc aataacgacg cgcgtctacat taacgtggtg 3600
 gtgaagaata aagaatatcg tctggcgacc aatgctagtc aggcgggctg ggagaaaatt 3660
 ctgtctgcac ttgaaatccc ggatgtgggt aatttatccc aggtggttgt gatgaaaagt 3720
 aaaaatgacc aagggatcac caataaatgc aaaatgaatc tgcaagataa caacggcaac 3780
 30 gacattgggt ttatcggctt ccaccaattc aataatatcg cgaagcttgt ggcctcaaat 3840
 tggtaacaac gtcagattga gcgacgctc cgcactttag gctgtagctg ggagttcatt 3900
 ccggtagatg acggttgggg agaacgcca ttgcaccatc atcaccatca ctgagcggcc 3960
 gcataatgct taagtcgaac agattgatat gtagctataa gtaatcgtat tgtacacggc 4020
 cgcataatcg aaattaatac gactcactat aggggaattg tgagcggata acaattccc 4080
 35 atcttagtat attagttaag tataagaagg agatatacca tgggcgaatc tctgttcaag 4140
 ggtccgctg attataaacc gatatcttct tctatttgtc atctgactaa cgaaagcgac 4200
 ggccacacga cttctctgta cggatcgggt ttcggtccgt tcatcattac caacaagcat 4260
 ctgttccgcc gtaacaacgg tacctgctg gttcaatctc tgcacggcgt cttcaaggta 4320
 aaagacacca ctacgctgca gcagcacctg gtcgacggcc gtgacatgat catcatccgc 4380

ES 2 488 217 T3

atgccgaaag attttccgcc gttcccgcaa aaactgaagt ttcgtgaacc gcaacgcgaa 4440
 gaacgtatth gcctgggttac caccaactth cagaccaaaa gcatgtcttc tatggthtcc 4500
 gatacctctt gcaccttccc aagcgggtgac ggtatthtct ggaaacattg gattcagacc 4560
 aaagatggtc agtgcggctc tccgctggtg tctacgcgtg acggtthcat cgttggtatc 4620
 5 cattctgctt ctaacttcac taactactaa aactacttha cttccgttcc gaaaaacttc 4680
 atggagctgc tgactaacca agaggcccag cagtgggtgt ccggttggcg cctgaacgca 4740
 gattctgtac tgtgggggtg tcataaggta ttcataaaca aaccggagga gccgttccag 4800
 ccggtcaaag aggcgaccca gctgatgaac gaactggtth actctcagta a 4851

10 <210> 91
 <211> 732
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Variante 7 de TEV

<400> 91

atgggcgaat ctctgttcaa ggggccgcgt gattataacc cgatatcttc ttctatthgt 60
 20 catctgacta acgaaagcga cggccacacg acttctctgt acggtatcgg thtccggtccg 120
 ttcatacatta ccaacaagca tctgttccgc cgtaacaacg gtaccctgct ggttcaatct 180
 ctgcacggcg tcttcaaggc aaaagacacc actacgctgc agcagcacct ggtcgcggc 240
 cgtgacatga tcatcatccg catgccgaaa gattthtccg cgttcccgcg aaaaactgaag 300
 thtccgtgaac cgcaacgcga agaactgatt tgcctgggta ccaccaactt tcagaccaa 360
 25 agcatgtctt ctatggtthc cgatacctct tgcaccttcc caagcgggta cggatthtcc 420
 tgaaacatt ggatccagac caaatgggt cagtgcggct ctccgctggg gtctacgcgt 480
 gacggthtca tcgttggtat ccattctgct tctaacttca ctaactaa caactactth 540
 acttccgthc cgaaaaactt catggagctg ctgactaac aagaggcca gcagtgggtg 600
 tccggttggc gcctgaacgc agattctgta ctgtgggggt gtcataaggc attcatgaac 660
 30 aaaccggagg agccgttcca gccgtcaaa gaggcgaccc agctgatgaa cgaactggtt 720
 tactctcagt aa 732

<210> 92
 <211> 415
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 488 217 T3

<223> Secuencia intercalada que contiene sitios transcripcionales y traduccionales y sitio de terminación T7.

<400> 92

```
5  aagcttgtgg cctcaaattg gtacaaccgt cagattgagc gcagctcccg cactttaggc 60
   tgtagctggg agttcattcc ggtagatgac ggttggggag aacgccatt gcaccatcat 120
   caccatcact gagcggccgc ataatgctta agtcgaacag attgatatgt agctataagt 180
   aattgtatga ctgaacctag gctgctgcca ccgctgagca ataactagca taacccttg 240
   gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt tgctgacgt atactctcag gcatctatga 300
10  gttgtacacg tccgcataat cgaaattaat acgactcact ataggggaat tgtgagcggg 360
   taacaattcc ccatcctagt atattagtta agtataagaa ggagatatac catgg      415
```

<210> 93

<211> 4965

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Marcos de lectura abierta de BoNT/A-TEV y de variante 4 de proteasa

20 TEV con los elementos de transcripción y traducción intercalados
y sitio de terminación.

<400> 93

```
   atgccgttcg taaacaaaca gttcaactat aaagaccag tcaacggcgt ggacattgcc 60
25  tatatcaaaa tcccgaatgc ggggtcaaatg cagcccgtga aagcatttaa aatccataac 120
   aaaatttggg tgatcccgga gcgcgatacg ttcacgaacc cggaagaagg agatttaaac 180
   ccaccgcctg aggctaaaca ggtcccgggtg tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
   gacaatgaaa aggacaacta cctgaaagggt gttaccaaac tgttcgagcg catttattcg 300
   acagatctcg gtcgcatggt gctgacttct attgtgcgcg gcattccggt ttggggtggt 360
30  agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
   gatgggagct accggtccga agagcttaac ctcgtaatca ttggcccagag cgcgatatt 480
   atccaattcg aatgtaaadc ttttgggcat gaagtctga atctgacgcg gaatggctat 540
   ggatcgacgc agtatattcg tttttctcca gatttcacat ttggatttga agaaagcctc 600
   gaagttgata cgaaccctct tttagggcgc ggaaaattcg cgacggacc agcggtgacc 660
35  ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgcttgatg gaatcgccat taaccggaac 720
   cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgat tacgagatgt cgggcttaga agtgtccttt 780
   gaagaactgc gcacgtttgg cggatcatgat gcaaaattta ttgatagtct gcaagaaac 840
   gaatttcggc tgtactatta caataaattc aaagacattg catcaacctt aaacaaggcg 900
```

ES 2 488 217 T3

aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgtttt caaagaaaa 960
 tacctcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa atttgataaa 1020
 ctgtataaaa tgctcaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt cttcaaggtc 1080
 ttgaatcggg aaacctatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
 5 aaagttaact acaccatcta tgatggcttt aatctgcgca atacgaatct ggcggcgaac 1200
 tttaacggcc agaacaccga aatcaacaac atgaacttta ctaaactgaa aaattttacc 1260
 ggcttgtttg aattctataa gctcctgtgt gtccgcggta ttatcaccag caaaaccaa 1320
 tccttgggcg gtggtggcga aaacctgtac ttccagggcg gtggcgggtg tgataagggc 1380
 tataacaagg cttcaatga tttatgcatc aaggatgaaca actgggactt gtttttctct 1440
 10 ccatctgaag ataattttac taacgacttg aacaaaggag aggaaattac ttccgatacc 1500
 aacatcgaag cagcgggaaga gaatattagt cttagatctta ttcaacaata ttacctgacc 1560
 tttaattttg ataacgagcc tgagaacatt tccattgaga atctcagctc tgacatcatc 1620
 ggccagctgg aactgatgcc gaatatcgaa cgctttccta atggaaagaa atatgaattg 1680
 gacaaataca ccatgttcca ctatctccgc ggcgaggagt ttgagcacgg caagtctcgt 1740
 15 attgctctga ccaattcggg aaacgaagcc cttttaaadc cttcgcgtgt gtacaccttt 1800
 ttctcaagcg attatgttaa aaaagtgaac aaggcgaccg aagcggcgat gtttttggga 1860
 tgggtggaac aactggtata tgactttacg gatgaaactt ctgaagtctc gaccaccgac 1920
 aaaattgccg atattaccat tatcattccc tatattggcc ctgactgaa cattggtaac 1980
 atgctgtata aagatgattt tgtggcgcc ctgatctttt caggcgctgt tatcctgctg 2040
 20 gaatttatcc cggaaatcgc cattccagta ctcggtacct ttgctgctgg gtcctatatc 2100
 gcaaacaaag ttttgactgt ccagacgatc gacaacgagc tcagtaaacg taacgaaaa 2160
 tgggatgagg tgtataagta tattgttacc aactggctcg ctaaagtaa caccagatt 2220
 gacctgattc gcaagaagat gaaagaagcg ctggaaaacc aagcagaagc gaccaaagct 2280
 attatcaact atcaatataa ccagtacaca gaggaagaaa agaataacat caacttcaac 2340
 25 atcgacgact tatctcaaa gctgaatgaa tctattaaca aagcgatgat taatattaac 2400
 aagttcttga accaatgtag tgtcagctat ctgatgaact cgatgatccc ttacggtgtg 2460
 aaacgtctgg aagacttcga tgcaagcctt aaagatgccc ttctgaagta tatttacgat 2520
 aatcgcggaa ctcttattgg ccaagtggat cgcttaaaag ataaagtcaa caacacgctg 2580
 agtacagaca tcccttttca gctgtctaaa tatgtggaca atcagcgctt gctgtccacg 2640
 30 tttacggaat acatcaaaaa catcatcaac actagtattc tgaacttgcg ttacgagagt 2700
 aacctctga ttgatctgag ccgttacgca tctaaaatca acatcggatc caaggtgaac 2760
 ttcgatccta tcgacaaaaa ccagattcaa ttgttcaact tagaatcgtc aaagattgaa 2820
 gttatcttaa aaaatgcgat tgtatataat tcaatgtacg aaaatttctc tacgagcttt 2880
 tggattcgta ttccgaataa tttcaacagt atctctttaa acaacgagta tactatcatc 2940
 35 aattgtatgg agaataacag cgggtggaaa gtgagcctta actatggtga aatcatctgg 3000
 actctgcagg aactcaaga aattaaaca cgcgtggtgt ttaaatactc acagatgatt 3060
 aacatctcgg attatattaa tcgctggatt tttgtgacaa ttactaaca cggctgaac 3120
 aacagcaaaa tttacattaa cggtcgcctg atcगतcaga aaccaatcag taatctcggg 3180
 aacattcacg catcgaataa tatcatgttc aaactggatg gttgtcgcga cacgcaccgt 3240

ES 2 488 217 T3

tacatttga tcaaatactt caatttattc gacaaagaac tcaacgaaaa ggagattaag 3300
gatctttatg acaatcagtc taattcgggt attctgaaag acttttgggg tgattacctt 3360
cagtacgata aaccgtatta tatgttaaac ttatatgata cgaataaata cgttgacgtc 3420
aacaacgttg gcattcgtgg ctatatgtat ctgaaagggc cgcgtggcag cgtgatgacc 3480
5 actaacattt acttaaactc ctccctctat cgcggtacta aatttattat caagaaatat 3540
gcctctggca acaaggacaa tatcgtacgc aataacgata gcgctacat taacgtggtg 3600
gtgaagaata aagaatatcg tctggcgacc aatgctagtc aggcgggcgt ggagaaaatt 3660
ctgtctgcac ttgaaatccc ggatgtgggt aatttatccc aggtggttgt gatgaaaagt 3720
aaaaatgacc aagggatcac caataaatgc aaaatgaatc tgcaagataa caacggcaac 3780
10 gacattgggtt ttatcggctt ccaccaattc aataatatcg cgaagcttgt ggcctcaaat 3840
tggtaacaac gtcagattga gcgacgctc cgcactttag gctgtagctg ggagttcatt 3900
ccggtagatg acggttgggg agaacgcca ttgcaccatc atcaccatca ctgagcggcc 3960
gcataatgct taagtcgaac agattgatat gtagctataa gtaattgtat gactgaacct 4020
aggctgctgc caccgctgag caataactag cataaccctt tggggcctct aaacgggtct 4080
15 tgaggggttt tttgctgata gtatactctc aggcattctat gagttgtaca cgtccgcata 4140
atcgaatta atacgactca ctatagggga attgtgagcg gataacaatt ccccatctta 4200
gtatattagt taagtataag aaggagatat accatggcg aatctctgtt caagggtccg 4260
cgtgattata accgatatc ttcttctatt tgtcatctga ctaacgaaag cgacggccac 4320
acgacttctc tgtacggtat cggtttcggt ccgttcatca ttaccaaca gcatctgttc 4380
20 cgccgtaaca acggtaccct gctggttcaa tctctgcacg gcgcttcaa ggtaaaagac 4440
accactacgc tgcagcagca cctggtcgac ggccgtgaca tgatcatcat ccgcatgccg 4500
aaagattttc cgccgttccc gcaaaaactg aagtttcgtg aaccgcaacg cgaagaacgt 4560
atttgctgg ttaccaccaa ctttcagacc aaaagcatgt cttctatggt ttccgatacc 4620
tcttgacct tcccaagcgg tgacggtatt ttctggaaac attggattca gaccaaagat 4680
25 ggtcagtgcg gctctccgct ggtgtctacg cgtgacggtt tcatcgttgg tatccattct 4740
gcttctaact tactaacac taacaactac tttacttccg ttccgaaaaa cttcatggag 4800
ctgctgacta accaagaggc ccagcagtg gtgtccggtt ggcgcctgaa cgcagattct 4860
gtactgtggg gtggtcataa ggtattcatg aacaaccgg aggagccgtt ccagccggtc 4920
aaagaggcga cccagctgat gaacgaactg gtttactctc agtaa 4965

30

<210> 94

<211> 2697

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Marco de lectura abierta para NociLHN/A-TEV

<400> 94

ES 2 488 217 T3

atgccgttcg taaacaaaca gttcaactat aaagaccag tcaacggcgt ggacattgcc 60
 tatatcaaaa tcccgaatgc ggggtcaaatg cagcccgtga aagcatttaa aatccataac 120
 aaaatttggg tgatcccga ggcgcatagc ttcacgaacc cggaagaagg agatttaaac 180
 ccaccgcctg aggctaaaca ggtcccgggtg tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
 5 gacaatgaaa aggacaacta cctgaaagggt gttaccaaac tgttcgagcg catttattcg 300
 acagatctcg gtcgcatggt gctgacttct attgtgcgcg gcattccggt ttggggtggt 360
 agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
 gatgggagct accggtccga agagcttaac ctcgtaatca ttggcccag cgcgatatt 480
 atccaattcg aatgtaaact ttttgggcat gaagtctga atctgacgcg gaatggctat 540
 10 ggatcgagc agtatattcg ttttctcca gatttcacat ttggatttga agaaagcctc 600
 gaagttgata cgaaccctct tttaggcgcg ggaaaattcg cgacggacc agcggtgacc 660
 ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgcttgatg gaatcgccat taaccggaac 720
 cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgat tacgagatgt cgggcttaga agtgccttt 780
 gaagaactgc gcacgtttgg cggcatgat gcaaaattta ttgatagtct gcaagaaaac 840
 15 gaatttcggc tgtactatta caataaattc aaagacattg catcaacctt aaacaaggcg 900
 aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgtttt caaagaaaa 960
 tacctcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa atttgataaa 1020
 ctgtataaaa tgctcaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt cttcaaggctc 1080
 ttgaatcgga aaacatctt gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
 20 aaagttaact acaccatcta tgatggcttt aatctgcgca atacgaatct ggcggcgaac 1200
 tttaacggcc agaacaccga aatcaacaac atgaacttta ctaaactgaa aaattttacc 1260
 ggcttgtttg aattctataa gctcctgtgt gtccgcggta ttatcaccag caaagaaaac 1320
 ctgtacttcc agttcgggtg ttttaccggc gctcgtaaat ctgcacgtaa acgcaagaat 1380
 caggctctgg ctggtggcgg tggctctggt ggtggcggta gcgcggtgg cggttctgcg 1440
 25 ctcaatgatt tatgcatcaa ggtgaacaac tgggacttgt ttttctctcc atctgaagat 1500
 aattttacta acgacttgaa caaaggagag gaaattactt ccgataccaa catcgaagca 1560
 gcggaagaga atattagtct agatcttatt caacaatatt acctgacctt taattttgat 1620
 aacgagcctg agaacatttc cattgagaat ctgagctctg acatcatcgg ccagctggaa 1680
 ctgatgccga atatcgaacg ctttccta at ggaaagaaat atgaattgga caaatacacc 1740
 30 atgttccact atctccgagc gcaggagttt gagcacggca agtctcgtat tgctctgacc 1800
 aattcggtaa acgaagccct tttaaatcct tcgctgtgt acacctttt ctcaagcgat 1860
 tatgttaaaa aagtgaaca ggcgaccgaa gcgcgatgt ttttgggatg ggtggaaca 1920
 ctggtatatg actttacgga tgaacttct gaagtctcga ccaccgaca aattgccgat 1980
 attaccatta tcattcccta tattggccct gactgaaca ttggtaacat gctgtataaa 2040
 35 gatgattttg tgggcgccct gatcttttca ggcgctgtta tcctgctgga atttatccc 2100
 gaaatcgcca ttccagtact cggtagcttt gcgctggtgt cctatatcgc aaacaaagt 2160
 ttgactgtcc agacgatcga caacgcgctc agtaaacgta acgaaaaatg ggatgaggtg 2220
 tataagtata ttgttaccaa ctggctcgct aaagtaaca cccagattga cctgattcgc 2280
 aagaagatga aagaagcgtt ggaaaacca gcagaagcga ccaaagctat tatcaactat 2340

ES 2 488 217 T3

caatataacc agtacacaga ggaagaaaag aataacatca acttcaacat cgacgactta 2400
 tcttcaaagc tgaatgaatc tattaacaaa gcgatgatta atattaacaa gttcttgaac 2460
 caatgtagtg tcagctatct gatgaactcg atgatccctt acgggtgtgaa acgtctggaa 2520
 gacttcgatg caagccttaa agatgccctt ctgaagtata tttacgataa tcgcggaact 2580
 5 cttattggcc aagtggatcg cttaaaagat aaagtcaaca acacgctgag tacagacatc 2640
 ccttttcagc tgtctaaata tgtggacaat cagcgccacc atcaccatca ccactaa 2697

<210> 95

<211> 898

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> NociLHN/A-TEV

15

<400> 95

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

ES 2 488 217 T3

Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile
 500 505 510
 Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu Asp
 515 520 525
 5 Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro Glu
 530 535 540
 Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu
 545 550 555 560
 Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu
 10 565 570 575
 Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu His
 580 585 590
 Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu Leu
 595 600 605
 15 Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys Lys
 610 615 620
 Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu Gln
 625 630 635 640
 Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr Asp
 20 645 650 655
 Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu
 660 665 670
 Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu Ile
 675 680 685
 25 Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala Ile
 690 695 700
 Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val
 705 710 715 720
 Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys
 30 725 730 735
 Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val
 740 745 750
 Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu Glu
 755 760 765
 35 Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln
 770 775 780
 Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu
 785 790 795 800
 Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn

ES 2 488 217 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| | | 805 | | 810 | | 815 | | | | | | | | | | | | | | |
| | Lys | Phe | Leu | Asn | Gln | Cys | Ser | Val | Ser | Tyr | Leu | Met | Asn | Ser | Met | Ile | | | | |
| | | | | 820 | | | | | 825 | | | | | 830 | | | | | | |
| | Pro | Tyr | Gly | Val | Lys | Arg | Leu | Glu | Asp | Phe | Asp | Ala | Ser | Leu | Lys | Asp | | | | |
| 5 | | | 835 | | | | 840 | | | | 845 | | | | | | | | | |
| | Ala | Leu | Leu | Lys | Tyr | Ile | Tyr | Asp | Asn | Arg | Gly | Thr | Leu | Ile | Gly | Gln | | | | |
| | | 850 | | | | 855 | | | | | 860 | | | | | | | | | |
| | Val | Asp | Arg | Leu | Lys | Asp | Lys | Val | Asn | Asn | Thr | Leu | Ser | Thr | Asp | Ile | | | | |
| | 865 | | | | 870 | | | | | | 875 | | | | | 880 | | | | |
| 10 | Pro | Phe | Gln | Leu | Ser | Lys | Tyr | Val | Asp | Asn | Gln | Arg | His | His | His | His | | | | |
| | | | | | 885 | | | | | | 890 | | | | | 895 | | | | |
| | His | His | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

15 <210> 96
 <211> 2709
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Marco de lectura abierta para DynLHN/A-TEV

<400> 96
 atgccgttcg taaacaaca gttcaactat aaagaccag tcaacggcgt ggacattgcc 60
 25 tatatcaaaa tcccgaatgc gggcaaatg cagcccgtga aagcatttaa aatccataac 120
 aaaatttggg tgatcccgga gcgcatatcg ttcacgaacc cggaagaagg agatttaaac 180
 ccaccgctg aggctaaaca ggtcccggg tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
 gacaatgaaa aggacaacta cctgaaagg gttaccaaac tgttcgagcg catttattcg 300
 acagatctcg gtcgcatggt gctgacttct attgtgacg gattccggt ttgggggtgg 360
 30 agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
 gatgggagct accggtccga agagctaac ctcgtaatca ttggcccag cgcgatatt 480
 atccaattcg aatgtaaata ttttgggcat gaagtctga atctgacg gaaatggctat 540
 ggatcgagcg agtatattcg ttttctcca gatttcacat ttggatttga agaaagcctc 600
 gaagtgata cgaacctct ttttaggcg ggaatttcg cgacggacc agcggtgacc 660
 35 ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgcttgatg gaatcgccat taaccgaac 720
 cgtgttttca aggtgaatac gaacgctat tacgagatg cgggcttaga agtgccttt 780
 gaagaactgc gcacgttgg cggcatgat gcaaaattta ttgatagtct gcaagaaac 840
 gaatttcggc tgtactatta caataaattc aaagacattg catcaacctt aaacaaggcg 900
 aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgtttt caaagaaaa 960

ES 2 488 217 T3

tacctcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa atttgataaa 1020
ctgtataaaa tgctcaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt cttcaaggtc 1080
ttgaatcggg aaacctatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
aaagttaact acaccatcta tgatggcttt aatctgcgca atacgaatct ggcggcgaac 1200
5 tttaacggcc agaacaccga aatcaacaac atgaacttta ctaaactgaa aaattttacc 1260
ggcttgtttg aattctataa gctcctgtgt gtccgtggta ttatcaccag caaagaaaac 1320
ctgtacttcc agtatggcgg tttcctcgtc cgcattcgtc ctaagcttaa atgggataac 1380
caggctcttg ctggtgggtg tggctctggt ggtggcggta gcggcgggtg tggttctgca 1440
ctcaatgatt tatgtatcaa ggtgaacaac tgggacttgt ttttctctcc atctgaagat 1500
10 aattttacta acgacttgaa caaaggagag gaaattactt ccgataccaa catcgaagca 1560
gcggaagaga atattagtct agatcttatt caacaatatt acctgacctt taattttgat 1620
aacgagcctg agaacatctt cattgagaat ctgagctctg acatcatcgg ccagctggaa 1680
ctgatgccga atatcgaacg ctttcctaataa ggaaagaaat atgaattgga caaatacacc 1740
atgttccact atctccgcgc gcaggagttt gagcacggca agtctcgtat tgctctgacc 1800
15 aattcggtaa acgaagccct tttaaatcct tcgcgtgtgt acaccttttt ctcaagcgat 1860
tatgttaaaa aagtgaacaa ggcgaccgaa gcggcgtatg ttttgggatg ggtggaacaa 1920
ctggtatatg actttacgga tgaacttctt gaagtctcga ccaccgacaa aattgccgat 1980
attaccatta tcattcccta tattggccct gactgaaca ttggtaacat gctgtataaa 2040
gatgatthttg tgggcgcctt gatcttttca ggcgctgtta tcctgctgga atttatcccg 2100
20 gaaatcgcca ttccagtact cggtagcttt gcgctgggtg cctatatcgc aaacaaagt 2160
ttgactgtcc agacgatcga caacgcgctc agtaaacgta acgaaaaatg ggatgaggtg 2220
tataagtata ttgttaccaa ctggctcgtc aaagtaaaca cccagattga cctgattcgc 2280
aagaagatga aagaagcgtt ggaacaccaa gcagaagcga ccaaagctat tatcaactat 2340
caatataacc agtacacaga ggaagaaaag aataacatca acttcaacat cgacgactta 2400
25 tcttcaaagc tgaatgaatc tattaacaaa gcgatgatta atattaacaa gttcttgaac 2460
caatgtagtg tcagctatct gatgaactcg atgatccctt acggtgtgaa acgtctggaa 2520
gacttcgatg caagccttaa agatgccctt ctgaagtata tttacgataa tcgcggaact 2580
cttattggcc aagtggatcg cttaaaagat aaagtcaaca acacgctgag tacagacatc 2640
ccttttcagc tgtctaaata tgtggacaat cagcgcctgc tgtccacgca ccatcaccat 2700
30 caccactaa 2709

<210> 97

<211> 902

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DynLHN/A-TEV

ES 2 488 217 T3

<400> 97

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

ES 2 488 217 T3

Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
 305 310 315 320
 Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
 325 330 335
 5 Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
 340 345 350
 Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
 355 360 365
 Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
 10 370 375 380
 Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
 385 390 395 400
 Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
 405 410 415
 15 Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
 420 425 430
 Gly Ile Ile Thr Ser Lys Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Tyr Gly Gly Phe
 435 440 445
 Leu Arg Arg Ile Arg Pro Lys Leu Lys Trp Asp Asn Gln Ala Leu Ala
 20 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
 465 470 475 480
 Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser
 485 490 495
 25 Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile
 500 505 510
 Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu Asp
 515 520 525
 Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro Glu
 30 530 535 540
 Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu
 545 550 555 560
 Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu
 565 570 575
 35 Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu His
 580 585 590
 Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu Leu
 595 600 605
 Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys Lys

ES 2 488 217 T3

610 615 620
 Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu Gln
 625 630 635 640
 Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr Asp
 5 645 650 655
 Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu
 660 665 670
 Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu Ile
 675 680 685
 10 Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala Ile
 690 695 700
 Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val
 705 710 715 720
 Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys
 15 725 730 735
 Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val
 740 745 750
 Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu Glu
 755 760 765
 20 Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln
 770 775 780
 Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu
 785 790 795 800
 Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn
 25 805 810 815
 Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile
 820 825 830
 Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys Asp
 835 840 845
 30 Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly Gln
 850 855 860
 Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp Ile
 865 870 875 880
 Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser Thr
 35 885 890 895
 His His His His His His
 900

<210> 98

ES 2 488 217 T3

<211> 320

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Fragmento de ADN que codifica una región de bucle di-cadena
que comprende un dominio de unión de Galanina al sitio de escisión
de proteasa TEV integrado

10 <400> 98

gaattctaca agctgctgtg cgtggacggc atcattacct ccaaaactaa atctgaaaac 60
ctgtacttcc agggctggac tttgaactct gctgggtatc tcctgggcc acatgcggtt 120
gctcttgctg gtggcgggtg ctctggcggg ggcggtagcg gcggtggcgg ttctgcaacta 180
gtgcttcagt gtatcaaggc taacaactgg gatttattct tcagcccag tgaagacaac 240
15 ttaccaacg acctgaacaa aggtgaagaa atcacctcag atactaacat cgaagcagcc 300
gaagaaaaca tcagtctaga 320

<210> 99

<211> 106

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de bucle di-cadena que comprende un dominio de unión de galanina
25 al sitio de escisión de proteasa TEV integrado

<400> 99

Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Asp Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr
1 5 10 15
30 Lys Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly
20 25 30
Tyr Leu Leu Gly Pro His Ala Val Ala Leu Ala Gly Gly Gly Ser
35 40 45
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Val Leu Gln Cys
35 50 55 60
Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn
65 70 75 80
Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile Thr Ser Asp Thr Asn

ES 2 488 217 T3

85 90 95
 Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
 100 105

5 <210> 100
 <211> 2703
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Marco de lectura abierta para GalLHN/A-TEV

<400> 100
 atgccgttcg taaacaaca gttcaactat aaagaccag tcaacggcgt ggacattgcc 60
 15 tatatcaaaa tcccgaatgc gggcacaatg cagcccgtga aagcatttaa aatccataac 120
 aaaatttggg tgatcccga gcgcgatagc ttcacgaacc cggaagaagg agatttaaac 180
 ccaccgcctg aggctaaaca ggtcccggcg tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
 gacaatgaaa aggacaacta cctgaaagggt gttaccaaac tgttcgagcg catttattcg 300
 acagatctcg gtcgcatggt gctgacttct attgtgagcg gcattccggt ttggggtggt 360
 20 agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
 gatgggagct accggtccga agagctaac ctcgtaatca ttggcccag cgcgatatt 480
 atccaattcg aatgtaaact ttttggcat gaagtcctga atctgacgag gaatggctat 540
 ggatcgagcg agtatattcg tttttctcca gatttcacat ttggatttga agaaagcctc 600
 gaagttgata cgaaccctct tttaggcgcg ggaaaattcg cgacggacc agcggtgacc 660
 25 ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgcttgatg gaatcgccat taaccggaac 720
 cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgat tacgagatg cgggcttaga agtgtccttt 780
 gaagaactgc gcacgtttg cggcatgat gcaaaattta ttgatagtct gcaagaaac 840
 gaatttcggc tgtactatta caataattc aaagacattg catcaacctt aaacaaggcg 900
 aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgtttt caaagaaaa 960
 30 tactcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgctg ataaactgaa atttgataaa 1020
 ctgtataaaa tgctaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt cttcaaggct 1080
 ttgaatcggg aaacctatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
 aaagttaact acaccatcta tgatggcttt aatctgagca atacgaatct ggcggcgaac 1200
 ttaaacggcc agaacaccga aatcaacaac atgaacttta ctaaactgaa aaattttacc 1260
 35 ggcttggttg aattctacaa gctgctgtgc gtggacggca tcattacctc caaaactaaa 1320
 tctgaaaacc tgtacttcca gggctggact ttgaactctg ctggttatct cctgggcca 1380
 catgcggttg ctcttctggt tggcgggtggc tctggcgggt gcggtagcgg cgggtggcgg 1440
 tctgcactag tgcttcagt tatcaagggt aacaactggg atttattctt cagcccagat 1500
 gaagacaact tcaccaacga cctgaacaaa ggtgaagaaa tcacctcaga tactaacatc 1560

ES 2 488 217 T3

gaagcagccg aagaaaacat cagtctagat cttattcaac aatattacct gacctttaat 1620
 ttgataacg agcctgagaa catttccatt gagaatctca gctctgacat catcggccag 1680
 ctggaactga tgccgaatat cgaacgcttt cctaattgaa agaaatatga attggacaaa 1740
 tacaccatgt tccactatct ccgcgcgag gagtttgagc acggcaagtc tcgtattgct 1800
 5 ctgaccaatt cggtaaacga agccctttta aatccttcgc gtgtgtacac ctttttctca 1860
 agcgattatg ttaaaaaagt gaacaaggcg accgaagcgg cgatgttttt gggatgggtg 1920
 gaacaactgg tatatgactt tacggatgaa acttctgaag tctcgaccac cgacaaaatt 1980
 gccgatatta ccattatcat tccctatatt ggccctgcac tgaacattgg taacatgctg 2040
 tataaagatg attttgtggg cgccctgatc ttttcaggcg ctgttatcct gctggaattt 2100
 10 atcccggaaa tcgccattcc agtactcggg acctttgcgc tgggtgccta tatcgcaaac 2160
 aaagttttga ctgtccagac gatcgacaac gcgctcagta aacgtaacga aaaatgggat 2220
 gaggtgtata agtatattgt taccaactgg ctcgctaaag taaacacca gattgacctg 2280
 attcgcaaga agatgaaaga agcgctggaa aaccaagcag aagcgacca agctattatc 2340
 aactatcaat ataaccagta cacagaggaa gaaaagaata acatcaactt caacatcgac 2400
 15 gacttatctt caaagctgaa tgaatctatt aacaaagcga tgattaatat taacaagttc 2460
 ttgaaccaat gtagtgcag ctatctgatg aactcgatga tcccttacgg tgtgaaacgt 2520
 ctggaagact tcgatgcaag ccttaaagat gcccttctga agtatattta cgataatcgc 2580
 ggaactctta ttggccaagt ggatcgctta aaagataaag tcaacaacac gctgagtaca 2640
 gacatccctt ttcagctgtc taaatatgtg gacaatcagc gccaccatca ccatcaccac 2700
 20 taa 2703

<210> 101

<211> 900

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> GalLHN/A-TEV

30 <400> 101

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

ES 2 488 217 T3

Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
 385 390 395 400
 Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
 405 410 415
 5 Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Asp
 420 425 430
 Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
 435 440 445
 Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Pro His Ala Val Ala
 10 450 455 460
 Leu Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 465 470 475 480
 Ser Ala Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe
 485 490 495
 15 Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu
 500 505 510
 Glu Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser
 515 520 525
 Leu Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu
 20 530 535 540
 Pro Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln
 545 550 555 560
 Leu Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr
 565 570 575
 25 Glu Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe
 580 585 590
 Glu His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala
 595 600 605
 Leu Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val
 30 610 615 620
 Lys Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val
 625 630 635 640
 Glu Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr
 645 650 655
 35 Thr Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro
 660 665 670
 Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala
 675 680 685
 Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile

ES 2 488 217 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|
| | 690 | | 695 | | 700 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Ala | Ile | Pro | Val | Leu | Gly | Thr | Phe | Ala | Leu | Val | Ser | Tyr | Ile | Ala | Asn | | | | | |
| | 705 | | | | 710 | | | | | 715 | | | | | 720 | | | | | | |
| | Lys | Val | Leu | Thr | Val | Gln | Thr | Ile | Asp | Asn | Ala | Leu | Ser | Lys | Arg | Asn | | | | | |
| 5 | | | | 725 | | | | | 730 | | | | | 735 | | | | | | | |
| | Glu | Lys | Trp | Asp | Glu | Val | Tyr | Lys | Tyr | Ile | Val | Thr | Asn | Trp | Leu | Ala | | | | | |
| | | | 740 | | | | | 745 | | | | | 750 | | | | | | | | |
| | Lys | Val | Asn | Thr | Gln | Ile | Asp | Leu | Ile | Arg | Lys | Lys | Met | Lys | Glu | Ala | | | | | |
| | | 755 | | | | | 760 | | | | | | 765 | | | | | | | | |
| 10 | Leu | Glu | Asn | Gln | Ala | Glu | Ala | Thr | Lys | Ala | Ile | Ile | Asn | Tyr | Gln | Tyr | | | | | |
| | | 770 | | | | | 775 | | | | | | 780 | | | | | | | | |
| | Asn | Gln | Tyr | Thr | Glu | Glu | Glu | Lys | Asn | Asn | Ile | Asn | Phe | Asn | Ile | Asp | | | | | |
| | 785 | | | 790 | | | | | | | | 795 | | | 800 | | | | | | |
| | Asp | Leu | Ser | Ser | Lys | Leu | Asn | Glu | Ser | Ile | Asn | Lys | Ala | Met | Ile | Asn | | | | | |
| 15 | | | 805 | | | | | | 810 | | | | | 815 | | | | | | | |
| | Ile | Asn | Lys | Phe | Leu | Asn | Gln | Cys | Ser | Val | Ser | Tyr | Leu | Met | Asn | Ser | | | | | |
| | | | 820 | | | | | 825 | | | | | 830 | | | | | | | | |
| | Met | Ile | Pro | Tyr | Gly | Val | Lys | Arg | Leu | Glu | Asp | Phe | Asp | Ala | Ser | Leu | | | | | |
| | | 835 | | | | | 840 | | | | | | 845 | | | | | | | | |
| 20 | Lys | Asp | Ala | Leu | Leu | Lys | Tyr | Ile | Tyr | Asp | Asn | Arg | Gly | Thr | Leu | Ile | | | | | |
| | | 850 | | | | | 855 | | | | | | 860 | | | | | | | | |
| | Gly | Gln | Val | Asp | Arg | Leu | Lys | Asp | Lys | Val | Asn | Asn | Thr | Leu | Ser | Thr | | | | | |
| | 865 | | | 870 | | | | | | | 875 | | | 880 | | | | | | | |
| | Asp | Ile | Pro | Phe | Gln | Leu | Ser | Lys | Tyr | Val | Asp | Asn | Gln | Arg | His | His | | | | | |
| 25 | | | 885 | | | | | | 890 | | | | | 895 | | | | | | | |
| | His | His | His | His | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 900 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

<210> 102

30 <211> 314

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Fragmento de ADN que codifica una región de bucle di-cadena

que comprende un dominio de unión de nociceptina al sitio de

escisión de proteasa TEV integrado

ES 2 488 217 T3

<400> 102

gaattctata agctcctgtg tgtccgcggt attatcacca gcaaagaaaa cctgtacttc 60
cagttcggtg gttttaccgg cgctcgtaaa tctgcacgta aacgcaagaa tcaggctctg 120
gctggtggcg gtggctctgg tgggtggcgg agcggcggtg gcggttctgc gctcaatgat 180
5 ttatgcatca aggtgaacaa ctgggacttg tttttctctc catctgaaga taattttact 240
aacgacttga acaaaggaga ggaaattact tccgatacca acatcgaagc agcgggaagag 300
aatattagtc taga 314

<210> 103

10 <211> 104

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Región de bucle di-cadena que comprende un dominio de unión de nociceptina
al sitio de escisión de proteasa TEV integrado

<400> 103

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

<210> 104

35 <211> 314

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 488 217 T3

<220>

<223> Fragmento de ADN que codifica una región de bucle di-cadena que
comprende un dominio de unión de dinorfina al sitio de escisión
de proteasa TEV integrado

5

<400> 104

gaattctata agtcctgtg tgtccgtggt attatcacca gcaaagaaa cctgtacttc 60
cagtatggcg gtttcctgcg tcgcattcgt cctaagctta aatgggataa ccaggctctt 120
gctggtggtg gtggctctgg tgggtggcggg agcggcggtg gtggttctgc actcaatgat 180
10 ttatgtatca aggtgaacaa ctgggacttg tttttctctc catctgaaga taattttact 240
aacgacttga acaaaggaga ggaaattact tccgatacca acatcgaagc agcgggaagag 300
aatattagtc taga 314

<210> 105

15 <211> 104

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Región de bucle di-cadena que comprende un dominio de unión de dinorfina
al sitio de escisión de proteasa TEV integrado

<400> 105

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

ES 2 488 217 T3

<210> 106

<211> 750

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> Marco de lectura abierto que codifica la variante 7 de proteasa TEV

<400> 106

| | | |
|----|--|-----|
| 10 | ccatggatgg gtggcgaatc tctgttcaag ggtccgcg | 60 |
| | attataaacc gatatcttct | |
| | actatttgtc atctgactaa cgaaagcgac ggccacacga | 120 |
| | cttctctgta cggtatcgg | |
| | ttcgggccgt tcatcattac caacaagcat ctgttccgcc | 180 |
| | gtaacaacgg taccctgctg | |
| | gttcaatctc tgcacggcgt cttcaaggta aaagacacca | 240 |
| | ctacgctgca gcagcacctg | |
| | gtcgcaggcc gtgacatgat catcatccgc atgccgaaag | 300 |
| | atthttccgcc gttcccgcaa | |
| 15 | aaactgaagt ttcgtgaacc gcaacgcgaa gaacgtattt | 360 |
| | gcctggttac caccaacttt | |
| | cagacaaaa gcatgtcttc tatggtttcc gatactctt | 420 |
| | gcaccttccc aagcggtgac | |
| | ggtatthttct ggaaacattg gatccagacc aaagatggtc | 480 |
| | agtgcggctc tccgctggtg | |
| | tctacgcgctg acggtttcat cgttggtatc cattctgctt | 540 |
| | ctaacttcac taactactaac | |
| | aactacttta cttccgttcc gaaaaacttc atggagctgc | 600 |
| | tgactaacca agaggcccag | |
| 20 | cagtgggtgt ccggttggcg cctgaacgca gattctgtac | 660 |
| | tgtgggtgg tcataaggt | |
| | ttcatgaaca aaccggagga gccgttccag ccggtcaaag | 720 |
| | aggcgacca gctgatgaac | |
| | gaactggttt actctcagta atgaaagctt | 750 |

<210> 107

25 <211> 3791

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> MLA que codifica la variante 7 de p10-TEV y polH-DynLHn/A-TEV

<400> 107

| | | |
|----|---|-----|
| | agatcttatg cgcccgact cgagtcatta gtggtgatgg | 60 |
| | tgatggtggg ttgacagaag | |
| | tctctgatta tcaacatact tcgacagttg gaacgggatg | 120 |
| | tctgttgaca gagtgttg | |
| 35 | taccttatct ttcagacggc caactggcc aatgagcgtt | 180 |
| | cccctgttat cgtagatgta | |
| | cttaagaagg gcgtctttca gcgaggcgtc gaagtctcc | 240 |
| | agtctcttta caccatatgg | |
| | gatcattgag ttcataagat atgatacact gcattggtg | 300 |
| | aggaacttgt taatgtttat | |
| | cattgccttg tttatgctct cgttgagttt actagagagg | 360 |
| | tcgtcaatgt tgaagttgat | |

ES 2 488 217 T3

| | | |
|----|--|------|
| | gttgttcttt tcctcctcgg tgtactgggt gtactgatag ttaatgatgg cttttgtcgc | 420 |
| | ttcagcctgg ttctccagcg cctccttcat ctttttcctg atgaggtcga tttgggtggt | 480 |
| | gaccttagcg agccagttag tcacgatgta tttgtacact tcatcccact tctcgtttct | 540 |
| | ttttgacaga gcattatcga ttgtttggac agtgaggacc ttgttagcaa tgtagctgac | 600 |
| 5 | caaagcgaag gtaccaagaa caggaatagc gatctctggg atgaactcca acaaaatcac | 660 |
| | tgctcccagag aaaatcaacg caccgacgaa gtcgtccttg tacagcatat tgccgatggt | 720 |
| | aagagcaggt ccaatgtagg gtatgatgat agtgatgtct gcgatcttgt ccgtagtgcga | 780 |
| | aacttcaacta gtctcgtcgg tgaatcgta aaccaactgt tcaaccaac ccagaaacat | 840 |
| | cgctgcttcg gttgccttat tcaccttctt aacgtaatcc gaactgaaga aggtgtagac | 900 |
| 10 | acgagaagga ttgagaagag cctcgttgac cgagttagtg agggcgattc tactttttcc | 960 |
| | gtgctcaaac tcttgagctc tgaggtagtg gaacatcgtg tatttgtcca attcgtactt | 1020 |
| | cttgccgtta gggaaatctc cgatattggg catgagtcc agctgtccga tgatgtcgtc | 1080 |
| | gctcagattt tcgatagaaa tgttttccgg ctcgttatcg aaattgaacg tgagatagta | 1140 |
| | ctgctgaatc aggtctagac taatattctc ttccgctgct tcgatgttg taticggaagt | 1200 |
| 15 | aatttctct cctttgttca agtcgttagt aaaattatct tcagatggag agaaaaaca | 1260 |
| | gtcccagttg ttcaccttga tacataaatc attgagtgc gaaccaccac cgccgctacc | 1320 |
| | gccaccacca gagccaccac caccagcaag agcctggta tcccattta gcttaggacg | 1380 |
| | aatgcgacgc aggaaaccgc catactggaa gtacaggttt tctttgctgg tgataatacc | 1440 |
| | acggacacac aggagcttat agaattcaaa caggccggtg aaattcttga gcttttgtaa | 1500 |
| 20 | gttcatgtta ttgatctcgg tattctgacc attgaaagta gccgccaat tgggttctct | 1560 |
| | aaggttaaag ccatcataga tgggtgtagt caccttggc acgatattga tcttaaacac | 1620 |
| | agctttgtcg aagttaagat aagtcttgcg gttcaatacc ttgaagaact taacaaagtt | 1680 |
| | gtcctcggta tagatctctg taagcathtt gtacagcttg tcaaacttga gtttgtccac | 1740 |
| | ggaaaacttt ccggaggtgt cctcggaaag caagtacttt tccttaaaga cgttcttcat | 1800 |
| 25 | atactgaagg ctacccgtgg tgccgactat acttttagcc ttattcagcg tactggcaat | 1860 |
| | atctttgaat ttgtttagt aatacagtct gaactcattc tcttgcaagg agtcgatgaa | 1920 |
| | cttagcatcg tgtccaccga aggtacgaag ttcttcgaag gagacttcca gaccggacat | 1980 |
| | ctcatagtat gcgttggtgt tcaccttgaa aacgcggttt ggattgatgg caattccgta | 2040 |
| | cagtctatgg cctgcgtgaa tcagctcgtg agccaaggtc accgcgggat ctgtggcgaa | 2100 |
| 30 | cttgccagcg cccaacaacg gattagtgtc aacctcaat gactcttca agccgaaagt | 2160 |
| | gaaatcgggg gaaaacctga tgtattgagt agaaccataa ccgtttctgg tcaggttcag | 2220 |
| | cacctcatgg ccgaaggact tacattcaaa ctgaatgatg tcggcagagg gaccgatgat | 2280 |
| | caccaagttg agttcctctg aacggtagga gccgtcaggt tggatcacgt tgatacagtt | 2340 |
| | tgtatcgatc actttcagct ctgtatctat ggttgatccg ccccaaaagg ggattccacg | 2400 |
| 35 | gacgatggaa gtgagcagca tgcgaccgag gtcagtggaa tagatacgtc cgaaaagttt | 2460 |
| | ggtcactccc ttgaggtaat tgtctttctc gttatctgtc gacaagtacg tggagtcata | 2520 |
| | gtaggacacc ggcacctgct tggcctctgg tggcggattc aatctcctt cttcggggtt | 2580 |
| | agtgaaggty tctctttcgg gaatgacca tatcttgta tgaatcttga aggcctaac | 2640 |
| | aggctgcatt tgaccggcat tcggaatctt gatatacgca atatcgactc cgttgacagg | 2700 |

ES 2 488 217 T3

gtccttatag ttgaattgct tgttgacaaa tcccatggga ttatatttat aggttttttt 2760
 attacaaaac tgttacgaaa acagtaaaat acttatttat ttgcgagatg gttatcattt 2820
 taattatctc catgatccaa taacctagaa taaaggccga cttttaattc aaccaaacac 2880
 aatatattat agttaaataa gaattattat caaatcattt gtatattaat taaaatacta 2940
 5 tactgtaaat tacattttat ttacaatcac agatccatat gggcgagtca ttgttcaagg 3000
 gaccgagaga ttacaacccc atctcgtcgt caatctgcca cttgacaaac gaatccgacg 3060
 gtcacactac ttctctgtac ggtatcggct tcggaccttt catcatcacc aacaagcatt 3120
 tgtttaggag aaacaacggt acaactcctg tccagtcctt gcacggcgta ttcaaagtca 3180
 aagataccac gactctgcaa cagcatctgg tcgacggaag ggacatgata atcattcgca 3240
 10 ttctaaaga cttcccacc ttccctcaaa agctcaagtt tcgtgagccc cagcgtgagg 3300
 agaggatttg tcttgtcacg actaacttc agaccaaadc tatgtctagc atggtcagcg 3360
 atacctcgtg cacttttcca agcggcgatg gaatcttttg gaagcactgg attcagacaa 3420
 aggacggcca atgcggttct cctctcgtaa gtacgcgcga cggattcatc gtgggtattc 3480
 actccgcttc caacttcacc aacaccaaca actatttcac tagcgtgcca aagaatttca 3540
 15 tgaattgct caccaaccag gaggccaac aatgggtag tggttggcgt cttaatgcgg 3600
 actcagtgct gtggggaggc cataaagttt tcatgaataa gccggaggaa cttttcaac 3660
 ccgtgaagga agcaacacag ctcatgaatg agctggttta ctcacagtga taactcgagc 3720
 aatctgatac tagtaataaa agatgtttat tttcattaga tgtgtgtgtt ggttttttgt 3780
 ctatagcatg c 3791

20

REIVINDICACIONES

1. Un método intracelular para convertir una toxina clostridial de cadena sencilla que comprende una región de bucle dicadena en su forma dicadena, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 a) hacer crecer una célula que comprende una construcción de expresión dual a 37°C durante aproximadamente 3,5 horas, comprendiendo la construcción de expresión dual;
- i) un marco de lectura abierta que codifica una toxina clostridial de cadena sencilla, comprendiendo la toxina clostridial de cadena sencilla un dominio enzimático, un dominio de translocación, un dominio de unión y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV; y
- ii) un marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV;
- 10 b) hacer crecer la célula a 22°C durante aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas,
- en donde el crecimiento a la etapa (b) induce la expresión de la toxina clostridial de cadena sencilla y la proteasa TEV a partir de la construcción de expresión dual; y
- 15 en donde la proteasa TEV producida escinde la toxina clostridial de cadena sencilla en el sitio de escisión de proteasa TEV situado en la región de bucle dicadena, convirtiendo así la toxina clostridial de cadena sencilla en su forma de dicadena.
2. Un método intracelular para convertir una proteína de cadena sencilla en su forma dicadena, comprendiendo el método las etapas de
- a) hacer crecer una célula que comprende una construcción de expresión dual a 37°C durante aproximadamente 8 horas, comprendiendo la construcción de expresión dual;
- 20 i) un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla, comprendiendo la proteína de cadena sencilla un dominio enzimático, un dominio de translocación, un dominio de unión opioide al sitio de escisión de proteasa TEV integrado; y
- ii) un marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV;
- 25 b) hacer crecer la célula a aproximadamente 12 a aproximadamente 16°C durante aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas,
- en donde el crecimiento a la etapa (b) induce la expresión de la proteína de cadena sencilla y la proteasa TEV a partir de la construcción de expresión dual; y
- 30 en donde la proteasa TEV producida escinde la proteína de cadena sencilla en el sitio de escisión de proteasa TEV situado en el dominio de unión opioide al sitio de escisión TEV integrado, convirtiendo así la proteína de cadena sencilla en su forma dicadena.
3. Un método intracelular para convertir una proteína de cadena sencilla en su forma dicadena, comprendiendo el método las etapas de
- a) hacer crecer una célula que comprende una construcción de expresión dual a 37°C durante aproximadamente 8 horas, comprendiendo la construcción de expresión dual;
- 35 i) un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla, comprendiendo la proteína de cadena sencilla un dominio enzimático, un dominio de translocación, un dominio de unión que no es de toxina clostridial y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV; y
- ii) un marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV;
- 40 b) hacer crecer la célula a aproximadamente 12 a aproximadamente 16°C durante aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas,
- en donde el crecimiento a la etapa (b) induce la expresión de la proteína de cadena sencilla y la proteasa TEV a partir de la construcción de expresión dual; y
- en donde la proteasa TEV producida escinde la proteína de cadena sencilla en el sitio de escisión de proteasa TEV situado en la región de bucle dicadena, convirtiendo así la proteína de cadena sencilla en su forma dicadena.
- 45 4. Una construcción de expresión dual que comprende:

i) un marco de lectura abierta que codifica una toxina clostridial de cadena sencilla, comprendiendo la toxina clostridial de cadena sencilla un dominio enzimático, un dominio de translocación, un dominio de unión y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV; y

ii) un marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV.

5 5. Una construcción de expresión dual que comprende:

i) un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla, comprendiendo la proteína de cadena sencilla un dominio enzimático, un dominio de translocación, un dominio de unión opioide al sitio de escisión de proteasa TEV integrado; y

ii) un marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV.

10 6. Una construcción de expresión dual que comprende:

i) un marco de lectura abierta que codifica una proteína de cadena sencilla, comprendiendo la proteína de cadena sencilla un dominio enzimático, un dominio de translocación, un dominio de unión que no es de toxina clostridial y una región de bucle dicadena que comprende un sitio de escisión de proteasa TEV; y

ii) un marco de lectura abierta que codifica una proteasa TEV.

15

FIG. 1.

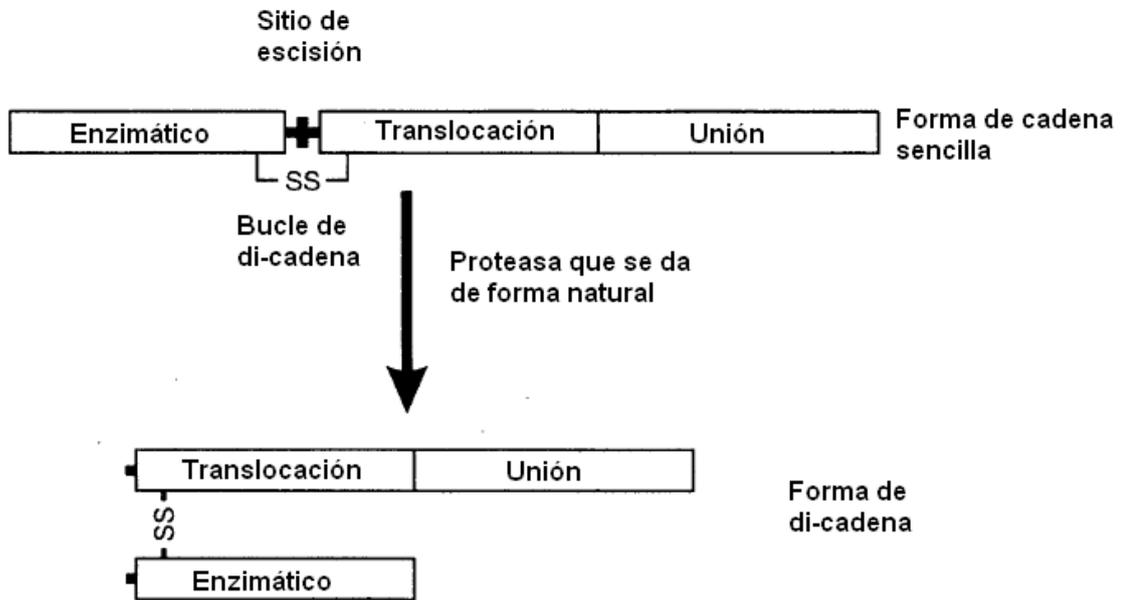


FIG. 2a.

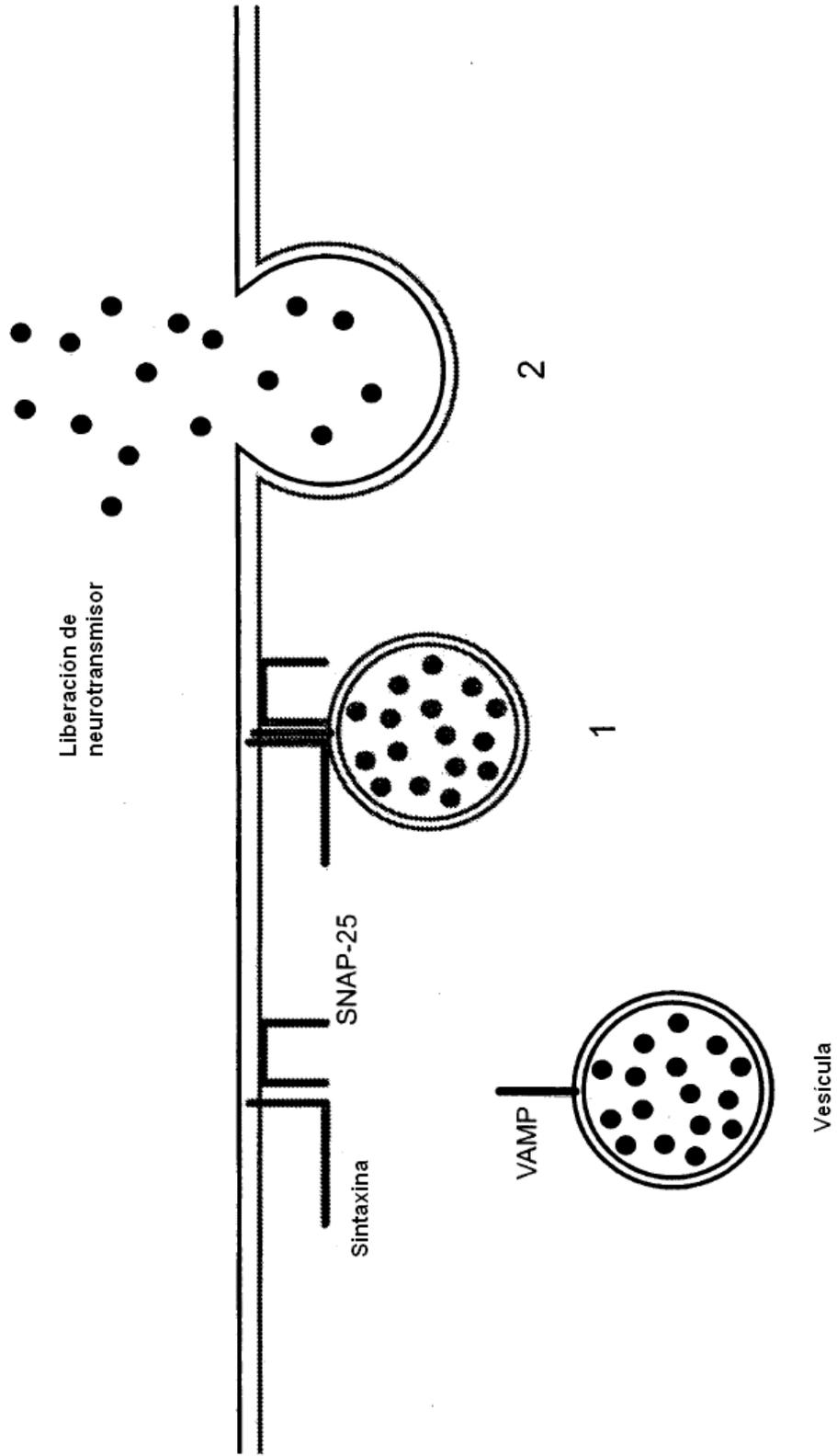


FIG. 2b.

