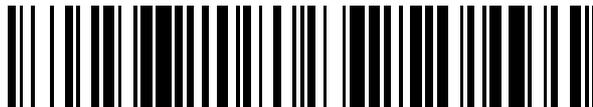


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 694**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/12** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2012** **E 12162102 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015** **EP 2505641**

54 Título: **Variantes de la T7 ARN polimerasa con sustituciones de Cisteína-Serina**

30 Prioridad:

**01.04.2011 EP 11160799**

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

**23.06.2015**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**GREIF, MICHAEL;**  
**RUDOLPH, CHRISTIAN;**  
**SOBEK, HARALD;**  
**THALHOFER, JOHANN-PETER y**  
**SCHMIDT, MANFRED**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 538 694 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

Variantes de la T7 ARN polimerasa con sustituciones de Cisteína-Serina

- 5 La invención pertenece a los campos de la biología molecular y la bioquímica de proteínas, particularmente al campo de la modificación de enzimas por ingeniería genética.

10 La presente invención tiene como objetivo proporcionar a la persona experta variantes nuevas de la polimerasa de T7. Una variante de T7 de acuerdo con la invención incluye una sustitución de Cisteína-Serina en la posición 723 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de T7. Una variante de T7 de acuerdo con la invención tiene una actividad enzimática de ARN polimerasa dependiente del ADN y una tendencia reducida a formar homodímeros intermoleculares por medio de la oxidación de grupos tiol. Las sustituciones de aminoácidos identificadas de acuerdo con la invención parecen tener solamente un impacto mínimo, en caso de tenerlo, en la actividad de la ARN polimerasa del polipéptido de T7. Las mutaciones de la invención pueden combinarse opcionalmente incluso con mutaciones adicionales, incluyendo mutaciones que proporcionan termoestabilidad potenciada en comparación con la referencia de tipo silvestre.

20 La invención proporciona variantes mejoradas de la T7 ARN polimerasa mediante la introducción de mutaciones que reducen uno o más grupos tiol (= mercapto, = -SH, = sulfhidrilo) de la enzima mientras que se retiene la actividad enzimática. Particularmente, son ventajosas cualesquiera de las sustituciones de aminoácidos por Ser en cualquiera de las posiciones Cys125, Cys347, Cys492, Cys515, Cys723, Cys839 y combinaciones de las mismas.

Antecedentes de la invención

25 La T7 ARN polimerasa (E.C. 2.7.7.6.; también mencionada en el presente documento como "polimerasa T7" o "T7") es una ARN polimerasa monomérica codificada por ADN de bacteriófagos que cataliza la formación del ARN en la dirección 5'→3'. En el proceso de iniciación de la transcripción, T7 reconoce una secuencia promotora específica, el promotor de T7. T7 consiste en 883 aminoácidos y tiene un peso molecular de 99 kDa. A nivel de la secuencia de aminoácidos, T7 es altamente homóloga con respecto a la T3 ARN polimerasa y, en menor grado, con respecto a la SP6 ARN polimerasa. La estructura tridimensional de T7 es muy similar a otras polimerasas con distintas especificidades de molde y de sustrato, a pesar de la baja similitud de secuencia. T7 consiste en distintos dominios, el dominio N-terminal, el "pulgar", la "palma" y los "dedos" (Sousa, R., y Mukherjee, S., Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 73 (2003) 1-41).

35 Se ha descrito la clonación y la expresión del gen que codifica T7 (Studier, *et al.*, documento US 4.952.496). Se ha estudiado T7 de manera exhaustiva mediante mutagénesis para explorar los cambios conformacionales durante la transcripción (Ma, K., *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. 102 (2005) 17612-17617), para facilitar el aclaramiento del promotor (Guillerez, J., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 102 (2005) 5958-5963) o para estudiar el fenómeno de ciclo abortivo (He, B., *et al.*, J. Mol. Biol. 265 (1997) 275-288). Bonner, G., *et al.*, J. Biol. Chem. 269 (1994) 25120-25128 describieron un conjunto de mutantes del sitio activo con tasas de elongación alteradas.

40 Debido a la especificidad del promotor y a la alta actividad enzimática de la ARN polimerasa, T7 es útil para una variedad de aplicaciones en biología molecular. En el campo de la expresión de proteínas recombinantes se usa T7 para la expresión de alto nivel de genes recombinantes en *E. coli* (Studier, F. W., y Moffat, B. A., J. Mol. Biol. 189 (1986) 113-130). La síntesis de oligorribonucleótidos definidos se describió por Milligan, J. F., *et al.*, Nucl. Aids Res. 15 (1987) 8783-8798.

50 La formación de enlaces disulfuro puede ocurrir durante o después de la síntesis de determinadas proteínas. Los enlaces disulfuro intramoleculares pueden contribuir significativamente a la estabilidad de las proteínas (Creighton, *et al.*, Trends in Biotechnol. (1995) 13, 18-23). Pero la formación de enlaces disulfuro también ocurre entre distintas moléculas de proteínas. Para tal fin, los restos de cisteína implicados en este proceso deben localizarse en la superficie de la molécula de proteína y tienen que estar expuestos a disolvente. Adicionalmente, los restos de cisteína deben tener una geometría y una distancia entre ellos adecuada que facilite la formación de un enlace disulfuro.

55 A través de la formación de uno o más enlaces disulfuro intermoleculares entre proteínas, pueden generarse complejos proteicos di-, tri-, tetra-, penta- y multiméricos de grado más alto. Sin embargo, la formación no controlada y desfavorable de dichos complejos proteicos mediante enlaces disulfuro en condiciones artificiales (por ejemplo, en preparaciones purificadas de proteínas) puede tener un impacto en la actividad o funcionalidad biológica (por ejemplo, enzimática). Por lo tanto, se han hecho esfuerzos para mantener las proteínas en condiciones reductoras. Un método muy común es la adición de agentes reductores a los tampones de almacenamiento; los ejemplos de dichos agentes reductores son mercaptoetanol, ditiotreitól (DTT), ditiogeritól (DTE) y otros. Sin embargo, los agentes reductores de los grupos tiol tienen una vida útil limitada ya que ellos mismos se oxidan por el oxígeno molecular. Como consecuencia, los agentes reductores del tiol pierden su actividad protectora con el paso del tiempo, y puede tener lugar de nuevo la oxidación de los restos de cisteína junto con la formación de enlaces disulfuro.

- Si una muestra de proteínas contiene una mezcla de distintos polipéptidos o si la muestra es un extracto en bruto, es posible que se formen multímeros entre moléculas de distintas especies proteicas (heteromultímeros). Si la mezcla contiene varios polipéptidos purificados de actividades definidas, la formación de heteromultímeros entre estas proteínas puede influir negativamente en dichas actividades, afectando a los polipéptidos individuales por separado o a todos los miembros de la muestra.
- El polipéptido de la T7 ARN polimerasa contiene 12 cisteínas, teniendo cada una tiol libre como grupo funcional (King, G. C., *et al.*, *Biochemistry* 25 (1986) 36-40).
- Cuando los grupos tiol de dos restos de cisteína se acercan entre sí, una reacción de oxidación puede generar una unidad de cisteína con un enlace disulfuro (-S-S-). El almacenamiento de la T7 ARN polimerasa en ausencia de agentes reductores tiol da como resultado una actividad enzimática reducida. La reducción de la actividad se correlaciona con la formación de dímeros, trímeros e incluso multímeros de la enzima. La cinética de la formación de los enlaces disulfuro es fuertemente dependiente de parámetros como la concentración de proteínas, el tiempo de reacción, la temperatura y la presencia o ausencia de agentes oxidantes. Por lo tanto, en la práctica, el porcentaje de multímeros presentes en una muestra puede variar dependiendo del origen, la edad y la composición de la muestra. Incluso durante el procedimiento de purificación puede observarse algunas veces la formación de enlaces disulfuro.
- En los multímeros de T7 tales como dímeros, trímeros o incluso multímeros de grado más alto, se cree que la razón de la actividad reducida de la polimerasa se debe a una accesibilidad reducida de los sitios activos. Además, una flexibilidad reducida de los esqueletos del polipéptido individual podía tener un impacto negativo en la función enzimática. Aunque la actividad de la polimerasa puede restaurarse mediante la adición de reactivos -SH de preparación reciente, se requiere el control continuo de la actividad residual de la enzima. Con el fin de salvaguardar y/o regenerar la actividad enzimática y/o proporcionar una preparación enzimática con una actividad de la polimerasa de T7 definida se necesita manipular adicionalmente el material con frecuencia (por ejemplo, retirar y analizar muestras, hacer que las preparaciones de T7 reaccionen con agentes reductores, etc.).
- El DTNB [ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico), también conocido como reactivo de Ellman] es un agente químico que se usa para cuantificar el número o la concentración de grupos tiol en un polipéptido. Un grupo tiol reacciona con el DTNB, escindiendo el enlace disulfuro para producir 2-nitro-5-tiobenzoato (NTB<sup>-</sup>), el cual se ioniza al dianión NTB<sup>2-</sup> en agua a pH neutro y alcalino. El ion NTB<sup>2-</sup> tiene un color amarillo y puede determinarse, por ejemplo, espectrofotométricamente. La reacción de los grupos tiol y el DTNB es rápida y estequiométrica, liberando un mol de tiol un mol de NTB. Mukherjee, S., *et al.*, *Cell* 110 (2002) 81-91 determinaron la reactividad de la T7 ARN polimerasa con DTNB. Para un polipéptido nativo de la enzima polimerasa de T7 de tipo silvestre se encontró el equivalente a aproximadamente 2 restos de Cys reactivos. En un análisis anterior, (King, G. C., *et al.*, anteriormente mencionado) encontraron 5 restos de Cys químicamente accesibles en la enzima nativa. Sin embargo, ambos estudios llevaron al mismo resultado en cuanto a que para la enzima T7 de tipo silvestre desnaturalizada el número de restos de cisteína reactivos determinados fue 12.
- Mukherjee, S., *et al.* (anteriormente mencionado) también divulga una variante de la T7 ARN polimerasa "con las Cys minimizadas" en la que 7 de las 12 cisteínas presentes en la enzima T7 de tipo silvestre se mutaron a Serina. La construcción de la variante con las Cys minimizadas se alcanzó mediante la generación consecutiva de sustituciones Cisteína-Serina (Cys-Ser) en las posiciones 530, 510, 515, 347, 723, 839 y 125. De acuerdo con los autores, "los restos de cisteína restantes están enterrados, y la mutación de los mismos redujo la actividad de polimerasa". Para el polipéptido de la variante de T7 "con las Cys minimizadas" nativo se localizaron menos de 0,2 restos de Cys accesibles por medio del DTNP. Se obtuvieron resultados similares con otro reactante, Fe-BABE, que es un reactivo que se conjuga con Cisteínas y que contiene Fe<sup>2+</sup> quelado (Greiner, D. P., *et al.* *Bioconjug. Chem.* 8 (1997) 44-48).
- Parece que la Cys347 es importante entre los restos de Cys de la T7 ARN polimerasa de tipo silvestre. La actividad enzimática de la polimerasa T7 se pierde después de la amidometilación de este resto (King, G.C., *et al.*, anteriormente mencionado). Parece que la Cys347 es la diana principal en la reacción de amidometilación, mientras que la Cys723 y la Cys839 son dianas secundarias con una tendencia menor a reaccionar.
- Jeruzalmi D. *et al.* *EMBO J.* 17 (2002) 81-91 divulgan la estructura tridimensional de una polimerasa T7 en complejo con el inhibidor transcripcional lisozima T7. Este documento se refiere al documento de Jeruzalmi D. *et al.* *J. Molecular Biology* 274 (1997) 748-756 anteriormente publicado, que describe un mutante de la T7 ARN polimerasa en un tampón acuoso con el agente reductor Ditriotreitol (DTT) en el que se sustituyeron tres restos de cisteína por serina, a saber, Cys347, Cys723 y Cys839. El documento se ocupa de la cristalización del mutante de la polimerasa T7 así como de un complejo del mutante con el inhibidor transcripcional de la lisozima T7. Por lo tanto, ni se divulgó la actividad de la ARN polimerasa, ni ninguna formación de homodímeros de la variante de la polimerasa de T7 en ausencia del agente reductor.
- Informes anteriores de variantes del polipéptido de *Zymomonas mobilis* con actividad levanosacarasa indican que las sustituciones por serina de la Cisteína pueden tener un impacto en la función biológica (Senthikumar, V., *et al.*,

Biotechnology Letters 25 (2003) 1653-1656). Por consiguiente, las sustituciones Cys-Ser impidieron la actividad formadora de levanos y se redujo la actividad de hidrólisis de la sacarosa.

5 Para la transcripción *in vitro*, pero también para métodos de amplificación *in vitro* tales como la NASBA ("Amplificación Basada en la Secuencia de Ácidos Nucleicos"), TMA ("amplificación mediada por Transcripción") y métodos relacionados, así como para otras aplicaciones, se desea que la estabilidad de la T7 ARN polimerasa aumente. Particularmente, se desea obtener una T7 ARN polimerasa con un tiempo de almacenamiento aumentado en la que se minimice cualquier pérdida de la actividad enzimática de la polimerasa. Es particularmente deseable una T7 ARN polimerasa que pueda almacenarse a temperatura ambiente con solamente una pequeña o ninguna  
10 pérdida de la actividad enzimática. Además, se desea combinar las características técnicas que conducen a unas características de almacenamiento potenciadas junto con otras características que dan lugar a termoestabilidad potenciada. Por ejemplo, temperaturas de reacción más altas de amplificación isotérmica podrían permitir la amplificación de ARN que tiene estructuras secundarias. También se ha mostrado con la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que altas temperaturas de hibridación permiten que un cebador hibride específicamente con su diana dando como resultado una amplificación altamente específica. Con la misma ventaja,  
15 en principio podrían aplicarse también enzimas más termoestables en amplificaciones isotérmicas.

Por lo tanto, existe una necesidad de una variante de la T7 ARN polimerasa con estabilidad mejorada, particularmente para dicha enzima con características de almacenamiento potenciadas. Particularmente existe una  
20 necesidad de una enzima con una tendencia reducida a formar multímeros con puentes disulfuro. Dichas propiedades conducen a características de almacenamiento potenciadas que son particularmente deseables. Incluso es más deseable una variante de la T7 ARN polimerasa que combine estas características con las de la actividad de polimerasa a temperaturas de reacción más altas que las de la enzima T7 de tipo silvestre.

25 El objetivo de la presente invención fue proporcionar variantes de la T7 ARN polimerasa con mutaciones de sustitución de Cys-Ser que conducen a una estabilidad mejorada. Además, la invención pretende proporcionar combinaciones de varias de estas mutaciones en una sola variante de T7 (mutante doble, triple, cuádruple, múltiple), con la condición de que las mutaciones combinadas conduzcan incluso a una estabilidad aumentada, es decir, a características de almacenamiento potenciadas. Incluso adicionalmente, la presente invención proporciona  
30 mutaciones que dan lugar a variantes de T7 que muestran además estabilidad potenciada en ensayos de desplegamiento térmico.

#### Sumario de la invención

35 En un primer aspecto de la invención se proporciona una solución acuosa en la cual está ausente un agente reductor con un grupo tiol, comprendiendo la solución acuosa un polipéptido, comprendiendo el polipéptido una variante de la T7 ARN polimerasa (variante de T7), teniendo la variante de T7 las propiedades de (i) actividad de ARN polimerasa dependiente de ADN, y (ii) una composición distinta de aminoácidos en comparación con el polipéptido de 883 aminoácidos de la T7 ARN polimerasa de SEC ID N°: 2 (referencia de tipo silvestre), en la que en  
40 la posición seleccionada de la 510 a la 530 de la variante de T7, numerada desde el extremo N-terminal de la referencia de tipo silvestre, está presente un resto de cisteína, en el que la variante de T7 comprende una o más sustituciones de aminoácidos de las que una (o la primera) está en la posición 723 donde la Serina sustituye al resto de Cisteína (Cys723Ser), y en la que está ausente la formación de homomultímeros en la solución acuosa de la variante de T7 como resultado de uno o más enlaces disulfuro intermoleculares.

45 En un segundo aspecto de la invención se proporciona un método para producir una solución acuosa con un polipéptido que comprende una variante de la T7 ARN polimerasa (variante de T7), teniendo la variante de T7 las propiedades de (i) actividad ARN polimerasa dependiente de ADN, y (ii) una composición distinta de aminoácidos en comparación con el polipéptido de 883 aminoácidos de la T7 ARN polimerasa de SEC ID N°: 2 (referencia de tipo silvestre), en el que está ausente la formación de homomultímeros en la solución acuosa como resultado de uno o más enlaces disulfuro intermoleculares, comprendiendo el método las etapas de (a) proporcionar la variante de T7  
50 sustituyendo la Cys723 de la referencia de tipo silvestre, numerada desde el extremo N-terminal, por Serina (Cys723Ser); (b) incluir opcionalmente además la variante de T7 una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser y Cys839Ser; (c) incluir opcionalmente además en la variante de T7 una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que  
55 consiste en Val426Leu, Val426Ile, Val426Phe, Ser633Val, Ser633Met, Val650Leu, Thr654Leu, Ala702Val y Val795Ile; (d) retrotranscribir de la secuencia de aminoácidos del polipéptido, comprendiendo el polipéptido la variante de T7 obtenida en las etapas (a), (b) y (c), obteniendo de ese modo una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, (e) expresar una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la etapa (d) en un sistema de expresión, y purificar posteriormente el polipéptido expresado a partir del sistema de expresión por medio de una cromatografía usando una fase móvil acuosa en la cual está ausente un agente reductor con un grupo tiol; obteniendo de este modo una solución acuosa con el polipéptido que comprende la variante de T7.

65 En un cuarto aspecto de la invención se proporciona un método para sintetizar una molécula de ARN, que comprende las etapas de (a) proporcionar una solución acuosa con polipéptidos de una variante de la T7 ARN polimerasa (variante de T7) de acuerdo con el primer aspecto de la invención; (b) proporcionar una molécula de

ADN molde que comprende un promotor de T7, estando el promotor de T7 ligado funcionalmente a una secuencia de nucleótidos diana que se va a transcribir; (c) poner en contacto la solución acuosa con el ADN molde de la etapa (b) con la variante de T7 de la etapa (a) en presencia de ribonucleósidos trifosfato, formando de este modo una mezcla de reacción, (d) incubar la mezcla de reacción en condiciones que permitan actividad de ARN polimerasa; sintetizando de este modo la molécula de ARN.

En un cuarto aspecto de la invención se proporciona una mezcla de reacción que comprende una solución acuosa con un polipéptido variante de la T7 ARN polimerasa (variante de T7) de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en el que la solución acuosa además comprende una molécula de ADN molde que comprende un promotor de T7 ligado funcionalmente a una secuencia de nucleótidos diana para su transcripción, y ribonucleósidos trifosfato.

En un quinto aspecto de la invención se proporciona un kit que comprende, en envases separados, una solución acuosa con un polipéptido variante de la T7 ARN polimerasa (variante de T7) de acuerdo con el primer aspecto de la invención y un tampón con uno o más ribonucleósidos trifosfato.

#### Descripción detallada de la invención

Los inventores han descubierto sorprendentemente que las mutaciones Cys-Ser divulgadas por Mukherjee, S., *et al.* (anteriormente mencionado) no tienen el mismo impacto sobre la formación de enlaces disulfuro en la polimerasa T7. Muy sorprendentemente se ha descubierto que Cys723 es el resto más importante en referencia a la formación de homomultímeros. En un menor grado Cys839 está implicada en la formación de puentes disulfuro en los homomultímeros. En una variante de T7 con solamente una sustitución Cys723Ser, la formación de homomultímeros está ausente de modo detectable. En una variante de T7 con solamente una sustitución de C839S, la formación de multímeros se reduce sustancialmente. De manera muy destacable, incluso una variante de T7 con una sustitución de aminoácidos séxtuple [C125S, C347S, C492S, C515S, C723S, C839S] es indistinguible de una variante de T7 con solamente una sustitución C723S, en cuanto a lo concerniente a la formación de homomultímeros. Incluso más sorprendentemente, la variante de T7 séxtuple y también las variantes de T7 con una sola sustitución C723S o una sola sustitución C839S muestran una actividad ARN polimerasa similar a la de la T7 de tipo silvestre. Las mutaciones de sustitución de aminoácidos en las posiciones C125, C347, C492, C515, C723 y C839 son muy útiles y ventajosas para construir enzimas variantes de la polimerasa T7 con una tendencia reducida a formar multímeros con puentes disulfuro.

En la presente invención se muestra que particularmente la Cys723 es un resto de cisteína crítico de la polimerasa T7 que contribuye a la formación de enlaces disulfuro. Para las variantes Cys723Ser, incluso después de un almacenamiento a largo plazo de dichas variantes purificadas, el análisis por medio de electroforesis en gel con SDS revela únicamente una sola banda en condiciones no reductoras. Esto indica que la formación de homodímeros se suprime completamente mediante la introducción de esta mutación puntual específica. No se descubrió que ninguna otra sustitución Cys-Ser produjera un efecto similar en una variante de T7 con actividad de ARN polimerasa, es decir, en una enzima activa.

Además, se muestra que incluso la combinación de seis mutaciones dentro de un gen da como resultado una enzima activa. El mutante séxtuple (Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser, Cys723Ser, Cys839Ser) también muestra una sola banda en condiciones no reductoras (y también en condiciones reductoras). Esto indica que la formación de dímeros puede suprimirse completamente mediante la introducción de mutaciones de sustitución Cys-Ser de acuerdo con la invención.

La presente invención tiene como objetivo proporcionar a la persona experta nuevas variantes de la polimerasa T7, es decir, variantes que se caracterizan por una composición de aminoácidos distinta en comparación con el polipéptido de la T7 ARN polimerasa de tipo silvestre (referencia de tipo silvestre). Dicha "variante" es una forma alélica de la proteína T7 de tipo silvestre, en la que la variante de T7 se genera por medio de la sustitución de aminoácidos. Una variante de T7 de acuerdo con la invención se caracteriza además por una actividad enzimática de ARN polimerasa dependiente de ADN, y una tendencia reducida a formar dímeros intramoleculares por medio de la oxidación de grupos tiol. Parece que las sustituciones de aminoácidos identificadas de acuerdo con la invención solamente tienen un impacto mínimo, en caso de tenerlo, en la función biológica del polipéptido de la polimerasa T7, incluyendo la actividad de ARN polimerasa. Las mutaciones pueden combinarse opcionalmente incluso con mutaciones adicionales, incluyendo mutaciones que proporcionan una termoestabilidad potenciada en comparación con la referencia de tipo silvestre.

En esta descripción de la presente invención se usan determinados términos con un significado particular o se definen por primera vez. Para los fines de la invención, los términos usados se definen por sus definiciones aceptadas en la técnica, cuando tales existan, excepto cuando esas definiciones entren en conflicto o entren en conflicto parcialmente con las definiciones expuestas más adelante. En el caso de un conflicto en la definición, el significado de un término se define por primera vez por cualquiera de las definiciones expuestas en este documento.

El término “comprende” que se usa en la descripción de la invención y en las reivindicaciones significa “incluye, pero no se limita necesariamente a”.

Los artículos “un” “uno” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a “uno o más” o “al menos uno”) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un aminoácido” significa un aminoácido o más de un aminoácido.

Si no se afirma lo contrario, se entiende que el término “aproximadamente” en combinación con un valor numérico n (“aproximadamente n”) indica un valor x en el intervalo dado por el valor numérico  $\pm$  el 5 % del valor, es decir  $n - 0,05 \cdot n \leq x \leq n + 0,05 \cdot n$ . En el caso del término “aproximadamente” en combinación con un valor numérico n este describe una realización preferente de la invención, el valor n es el más preferente, si no se indica lo contrario.

Una secuencia de nucleótidos “codifica” un péptido o un polipéptido cuando al menos una porción del ácido nucleico, o su complementario, pueden traducirse directamente para proporcionar la secuencia de aminoácidos del péptido o la proteína, o cuando el ácido nucleico aislado puede usarse, solo o como parte de un vector de expresión, o para expresar el péptido o la proteína *in vitro*, en una célula hospedadora procariota o en una célula hospedadora eucariota.

Cuando una secuencia de nucleótidos es monocatenaria, deberá entenderse que la secuencia complementaria de esa secuencia de nucleótidos también está incluida dentro del alcance de la presente invención.

La porción codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido o un polipéptido comienza con un codón de iniciación que codifica Metionina que, de este modo, se convierte en el aminoácido del extremo N-terminal del producto primario de traducción. Como parte de los procesos postraduccionales, la Metionina N-terminal se escinde frecuentemente, por ejemplo, mediante una Metionina aminopeptidasa que es una enzima ubicua. En tal caso, el producto de traducción primario puede dar lugar a una mezcla que comprende miembros sin la Metionina N-terminal y miembros que retienen este aminoácido en el extremo N-terminal. También es posible que la forma de la enzima sin la metionina N-terminal sea la única que pueda aislarse. Sin embargo, las secuencias de aminoácidos de la polimerasa T7 de tipo silvestre y las variantes de T7 de acuerdo con la invención se describen en el listado de secuencias incluyendo la metionina N-terminal. Pero la presente invención también abarca las variantes de T7 que no incluyen la metionina N-terminal.

Para los fines de denominación abreviada de las variantes de la polimerasa T7 que se describen en el presente documento, debe observarse que para cada mutación, un número se refiere al resto/posición del aminoácido a lo largo de la secuencia de aminoácidos de referencia de la proteína de la polimerasa T7 de tipo silvestre dada en la SEC ID N°: 2. Para la identificación de los aminoácidos se usan abreviaturas de tres letras así como el alfabeto de una sola letra de los aminoácidos, es decir, ácido Aspártico Asp D, Isoleucina Ile I, Treonina Thr T, Leucina Leu L, Serina Ser S, Tirosina Tyr Y, ácido Glutámico Glu E, Fenilalanina Phe F, Prolina Pro P, Histidina His H, Glicina Gly G, Lisina Lys K, Alanina Ala A, Arginina Arg R, Cisteína Cys C, Triptófano Trp W, Valina Val Ve, Glutamina Gln Q, Metionina Met M, Asparagina Asn N. Un aminoácido en una posición particular en una secuencia de aminoácidos se da por su abreviatura de tres letras y un número. Por consiguiente, cualquiera de “Cys723” y “C723” denota el resto de Cisteína en la posición del aminoácido 723 de la SEC ID N°: 2. En cualquier mutante de T7 y/o variante de T7 que se divulga en el presente documento, una sustitución por un aminoácido distinto se da como la abreviatura de tres letras añadiéndole después el número que indica la posición. Por ejemplo, “Cys723Ser” (= [Cys723Ser]) o “C723S” (= [C723S]) denotan la sustitución de la Cys en la posición 723 en la SEC ID N°: 2 por Ser (véase N° 6 de la Tabla 3). Una sustitución Cys723Ser (= C723S) da como resultado una secuencia de aminoácidos tal como se da en la SEC ID N°: 12, codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 11. Las sustituciones de aminoácidos mucho más preferentes se divulgan en la Tabla 1a más adelante (véase el Ejemplo 1). Las variantes particularmente preferentes de acuerdo con la invención se caracterizan por una pluralidad de sustituciones (preferentemente de 2 a 4) de aminoácidos. Mucho más preferentemente, las sustituciones de aminoácidos para las combinaciones con una o más de las mutaciones mostradas en la Tabla 1a se enumeran en la Tabla 1b.

El término “polipéptido” o “proteína” denota un polímero compuesto de una pluralidad de monómeros de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. Preferentemente, el polímero comprende 50 o más monómeros. Un polipéptido o una proteína preferente de acuerdo con la invención es una variante de T7. Un “enlace peptídico” es un enlace covalente entre un primer aminoácido y un segundo aminoácido en el que el grupo  $\alpha$  amino del primer aminoácido está unido al grupo  $\alpha$  carboxilo del segundo aminoácido.

Un “multímero”, en el contexto de la presente invención, se entiende como aquel que es parte de un conjugado formado mediante la unión covalente de dos o más (= una pluralidad de) miembros, siendo cada miembro un polipéptido con uno o más grupos tiol reactivos y estéricamente accesibles (por ejemplo, pero que no se limitan a restos de Cys). Después de la formación del conjugado, dos o más miembros se unen mediante al menos un puente disulfuro (-S-S-). Los miembros adyacentes se unen mediante uno o más puentes disulfuro, y los miembros pueden estar unidos a otros miembros mediante puentes disulfuro adicionales. Un conjugado con miembros idénticos (es decir, miembros de la misma especie del polipéptido) también se menciona como un homomultímero. Dependiendo del número de miembros individuales unidos al conjugado, el multímero puede mencionarse como un dímero,

trímero, tetrámero, pentámero, hexámero, etc. Un heteromultímero contiene al menos dos especies distintas de polipéptidos.

Un "agente reductor con un grupo tiol", también mencionado como un "reactivo -SH" denota un agente reductor capaz de impedir la formación de un enlace disulfuro de dos restos que contienen grupos -SH de uno o más polipéptidos. Particularmente, el agente reductor con un grupo tiol es capaz de impedir la formación de multímeros de un polipéptido de T7 con un polipéptido de T7 adicional o el polipéptido de otra especie que contenga un grupo -SH. Los reactivos -SH particulares dentro de esta definición incluyen mercaptoetanol, ditioneitol (DTT), ditioneitol (DTE).

Las variantes de T7 de la invención también comprenden proteínas de fusión con un marcador de afinidad tal como, pero que no se limita a marcador de Histidina (marcador His). Bien conocido por los expertos en la materia, un marcador His es una secuencia de aminoácidos que contiene varias, preferentemente de 3 a 7, más preferentemente 6 Histidinas consecutivas. En una secuencia del marcador His las Histidinas representan la porción esencial. Pero de modo facultativo existen algunos aminoácidos adicionales comprendidos en el marcador His. Por ejemplo, una secuencia N-terminal de la T7 que incluye un marcador His puede comprender la secuencia N-Met His His His His His His Gly Ser-. Para este fin véase la SEC ID N°: 74 que comprende la secuencia de aminoácidos anterior. En el presente marcador His ejemplar, los aminoácidos Gly y Ser forman un enlazador con el extremo N-terminal de la variante de T7. Los aminoácidos enlazadores son parte del marcador His y típicamente se originan como un artefacto de clonación de la secuencia de nucleótidos que codifica el marcador His (por ejemplo SEC ID N°: 73). Preferentemente, la secuencia enlazadora del marcador His comprende de 1 a 5 aminoácidos.

De acuerdo con la invención, la Metionina N-terminal de una variante de T7 puede reemplazarse por un marcador His. Como alternativa, la secuencia N-terminal de la variante de T7 de acuerdo con la invención puede extenderse por el marcador His. En tal caso, el extremo N-terminal del producto de traducción primario de la variante de T7 comprende una metionina N-terminal seguida del marcador His, seguido de la Metionina codificada por el codón de iniciación de la secuencia de nucleótidos que codifica la T7 original.

La purificación de un polipéptido de tipo silvestre o variante de T7 con un marcador de His se realiza eficazmente mediante cromatografía de afinidad de metales inmovilizados. Este método es un método ampliamente empleado para purificar proteínas recombinantes que contienen un marcador de afinidad corto que consiste en restos de Histidina (marcador His). La cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (descrita por Porath, J., *et al.*, Nature 258 (1975) 598-599) se basa en la interacción entre un ion metálico de transición ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) inmovilizado en una matriz de afinidad de partículas quelantes de metales y cadenas laterales de aminoácidos específicas. La histidina es el aminoácido que muestra la interacción más fuerte con las matrices de iones metálicos inmovilizados, como grupos donantes de electrones en el anillo de imidazol de la Histidina formando fácilmente enlaces de coordinación con el metal de transición inmovilizado.

Un "vector" se define como un ADN que puede comprender, es decir portar, y mantener un fragmento de ADN de acuerdo con la invención, incluyendo, por ejemplo, fagos y plásmidos. Estos términos se entienden por los expertos en la materia de la ingeniería genética. La expresión "casete de expresión" denota una secuencia de nucleótidos que codifica una preproteína, ligada operativamente a un promotor y un terminador. Como para los vectores que contienen un casete de expresión, el término "vector" y la expresión "vector de expresión" se usan como sinónimos.

El término "oligonucleótido" se usa para una molécula de ácido nucleico, ADN (o ARN), con menos de 100 nucleótidos de longitud. Preferentemente, un oligonucleótido es de aproximadamente 75, aproximadamente 50 o menos nucleótidos de longitud.

"Transformación" significa introducir ADN en un organismo, es decir, un organismo hospedador, de modo que el ADN sea replicable, bien como un elemento extracromosómico o mediante integración en el cromosoma.

El término "expresión" y el verbo "expresar" denotan la transcripción de las secuencias de ADN y/o la traducción del ARNm transcrito en un organismo hospedador dando como resultado una preproteína, es decir, sin incluir procesos postraduccionales.

Un "promotor" es una secuencia de nucleótidos reguladora que estimula la transcripción. Estos términos se entienden por los expertos en la materia de la ingeniería genética. A igual que un promotor, un "elemento promotor", estimula la transcripción pero constituye un subfragmento de una secuencia promotora más larga.

La expresión "ligado operativamente" se refiere a la asociación de dos o más fragmentos de ácidos nucleicos en un solo vector de modo que la función de uno afecte al otro. Por ejemplo, un promotor está ligado operativamente a una secuencia codificante, es decir, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o una preproteína, cuando esta es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia codificante, es decir, que la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor.

El objetivo de la presente invención fue desarrollar nuevos mutantes de la T7 ARN polimerasa sin o con una tendencia sustancialmente reducida a formar enlaces disulfuro intramoleculares y generar multímeros. Las estructuras de rayos x de alta resolución de la T7 ARN polimerasa disponibles a partir de los bancos de datos se inspeccionaron cuidadosamente para identificar los restos de cisteína de las estructuras de la proteína donde podrían generarse mutaciones.

Los restos de cisteína identificados se reemplazaron por restos de Serina. Las sustituciones Cys-Ser se crearon por primera vez como mutaciones puntuales. Además, se combinaron varias sustituciones Cys-Ser distintas (hasta seis) en secuencias codificantes separadas de variantes de T7.

Las variantes de T7 designadas se sintetizaron, clonaron, expresaron y purificaron. Se examinó la actividad y la capacidad de las enzimas mutantes para formar multímeros y se comparó con la enzima de tipo silvestre. Se descubrió sorprendentemente que no todas, pero determinadas variantes tienen una tendencia sustancialmente reducida a formar homomultímeros intramoleculares mediante enlaces disulfuro; es decir, solamente determinadas variantes de T7 siguen siendo monoméricas después de un almacenamiento a largo plazo, incluso en presencia de oxígeno, sin tener el requisito de tratarse repetidamente con reactivos -SH.

Otro hallazgo sorprendente fue que las sustituciones Cys-Ser identificadas por la presente invención no parecen tener un impacto negativo en la actividad de la ARN polimerasa. Por el contrario, las sustituciones Cys-Ser de acuerdo con la invención pueden combinarse incluso con sustituciones de aminoácidos adicionales, por ejemplo mutaciones que aumentan la estabilidad térmica de la T7 ARN polimerasa.

De acuerdo con la invención, una primera realización es un polipéptido que comprende una variante mejorada de la T7 ARN polimerasa (variante de T7), teniendo la variante de T7 las propiedades de (i) actividad de ARN polimerasa dependiente de ADN, y (ii) una composición distinta de aminoácidos en comparación con el polipéptido de 883 aminoácidos de la T7 ARN polimerasa de SEC ID N°: 2 (referencia de tipo silvestre), y siendo la mejora de la variante de T7 la ausencia en solución acuosa de formación de homomultímeros como resultado de uno(s) enlace(s) disulfuro intermoleculares, en la que en la posición seleccionada de la 510 a la 530 de la variante de T7, numerada del extremo N-terminal de la referencia de tipo silvestre, está presente un resto de cisteína, y en la que la variante de T7 comprende una o más sustitución(es) de aminoácidos de las cuales una (o la primera) está en la posición 723 donde la Serina sustituye al resto de Cisteína (Cys723Ser).

El trabajo experimental que subyace a las selecciones anteriores básicamente siguió un enfoque racional para introducir las sustituciones de aminoácidos predeterminadas en las posiciones seleccionadas del polipéptido de T7. Los aminoácidos Cisteína y Serina difieren únicamente en que el átomo de azufre del primero se reemplaza por oxígeno en el segundo. Sin embargo, la electronegatividad del átomo de oxígeno proporciona a la cadena lateral de la Serina un efecto polar aumentado, en comparación con el grupo -SH que contiene la cadena lateral de la Cisteína. Por lo tanto, una o más sustituciones Cys-Ser cambian las propiedades fisicoquímicas de una variante de T7.

La modificación de las secuencias de nucleótidos que codifican la enzima es un método preferente en el campo de la modificación de proteínas (Winter, G., *et al.*, Nature 299 (1982) 756-758). El conocimiento de la estructura de una enzima, combinado con los datos bioquímicos detallados concernientes a los principios subyacentes a su función y estabilidad, puede proporcionar una oportunidad para diseñar racionalmente enzimas con propiedades adicionales mejoradas. Los ejemplos de dichas mejoras adicionales son especificidad potenciada, espectro de sustrato alterado y termoestabilidad.

Fersht y Serrano explicaron los principios generales de la estabilidad de las proteínas derivados de los experimentos de modificación de proteínas (Fersht, A. R., y Serrano, L., Curr. Opin. Struct. Biol. 3 (1993) 75-83). Se describieron las interacciones específicas entre los aminoácidos de una proteína y el efecto en la estabilidad. Con respecto a la estabilización de una proteína se ejemplificó una mejora mediante el "relleno" de las cavidades hidrófobas del núcleo interno de una proteína con restos de aminoácidos hidrófobos. Se mostró que esto significa que la interacción hidrófoba total de la proteína en el núcleo de la proteína aumentó y que se alcanzó un aumento de la termoestabilidad de la proteína diana. Desarrollos adicionales del campo de la estabilización de la estructuras proteicas se revisaron por Lee, B., y Vasmatis, G., Current Opinion Biotechn. 8 (1997) 423-428.

Aún en más detalle, la presente divulgación realiza los siguientes artículos.

1. Una solución acuosa en la que está ausente un agente reductor con un grupo tiol, comprendiendo la solución acuosa un polipéptido, comprendiendo el polipéptido una variante de la T7 ARN polimerasa (variante de T7), teniendo la variante de T7 las propiedades de (i) actividad de ARN polimerasa dependiente de ADN, y (ii) una composición distinta de aminoácidos en comparación con el polipéptido de 883 aminoácidos de la T7 ARN polimerasa de SEC ID N°: 2 (referencia de tipo silvestre), en la que en la posición seleccionada de la 510 a la de 530 de la variante de T7, enumerada a partir del extremo N-terminal de la referencia de tipo silvestre, está presente un resto de Cisteína, en la que la variante de T7 comprende una o más sustituciones de aminoácidos de las cuales una (o la primera) está en la posición 723

donde la Serina sustituye al resto de Cisteína (Cys723Ser),  
y en la que está ausente la formación de un homomultímero en la solución acuosa de la variante de T7 como resultado de uno o más enlaces disulfuro intermoleculares.

5 2. La solución acuosa de acuerdo con el artículo 1, en la que el número de aminoácidos sustituidos en el polipéptido en la variante de T7 es de 1 a 10.

10 3. La solución acuosa de acuerdo con el artículo 2, en la que el polipéptido de la variante de T7 además comprende una sustitución Cisteína-Serina seleccionada del grupo que consiste en Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser y Cys839Ser.

15 4. La solución acuosa de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 2 y 3, en la que el polipéptido de la variante de T7 además comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Val426Leu, Val426Ile, Val426Phe, Ser633Val, Ser633Met, Val650Leu, Thr654Leu, Ala702Val y Val795Ile.

20 5. La solución acuosa de acuerdo con el artículo 4, en la que el polipéptido de la variante de T7 comprende las sustituciones de aminoácidos Val426Leu, Val650Leu, Ala702Val y Val795Ile.

20 6. La solución acuosa de acuerdo con el artículo 4, en la que el polipéptido de la variante de T7 comprende las sustituciones de aminoácidos Val426Leu, Ala702Val y Val795Ile.

25 7. La solución acuosa de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1 a 6, en la que el polipéptido comprende la variante de T7 y un marcador His N-terminal.

25 8. La solución acuosa de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1 a 7, en la que el polipéptido comprende la variante de T7 con una Metionina N-terminal.

30 9. Un método para producir una solución acuosa con un polipéptido que comprende una variante de la T7 ARN polimerasa (variante de T7), teniendo la variante de T7 las propiedades de (i) actividad de ARN polimerasa dependiente de ADN, y (ii) una composición distinta de aminoácidos en comparación con el polipéptido de 883 aminoácidos de la T7 ARN polimerasa de SEC ID N<sup>o</sup>: 2 (referencia de tipo silvestre), en el que está ausente la formación de homomultímeros en la solución acuosa como un resultado de uno o más enlaces disulfuro intramolecular(es), el método comprende las etapas de:

35 (a) proporcionar la variante de T7 sustituyendo en la referencia de tipo silvestre la Cys723, numerada a partir del extremo N-terminal, por Serina (Cys723 Ser);

(b) incluir además opcionalmente en la variante de T7 una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser y Cys839Ser;

40 (c) incluir opcionalmente además en la variante de T7 una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Val426Leu, Val426Ile, Val426Phe, Ser633Val, Ser633Met, Val650Leu, Thr654Leu, Ala702Val y Val795Ile;

45 (d) retrotranscribir la secuencia de aminoácidos del polipéptido, comprendiendo el polipéptido la variante de T7 obtenida en las etapas (a), (b) y (c), obteniendo de ese modo una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido;

(e) expresar una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la etapa (d) en un sistema de expresión, y purificar posteriormente el polipéptido expresado a partir del sistema de expresión por medio de una cromatografía usando una fase móvil acuosa en la que está ausente un agente reductor con un grupo tiol;

50 obteniendo de ese modo en la etapa (e) una solución acuosa con el polipéptido que comprende la variante de T7.

55 10. El método de acuerdo con el artículo 9, en el que la solución acuosa obtenida en la etapa (e) se almacena en ausencia de un agente reductor con un grupo tiol.

60 11. El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 9 y 10, en el que una cantidad de aproximadamente 1 µg a 3 µg de la proteína de la variante de T7 purificada a partir de la solución acuosa está de libre un modo detectable de homomultímeros tal como se determina mediante electroforesis en gel con SDS poliacrilamida y la tinción del gel de electroforesis con el Kit Colorante Simply Blue Safe de Invitrogen.

60 12. Un método para sintetizar una molécula de ARN, que comprende las etapas de

65 (a) proporcionar una solución acuosa con un polipéptido de una variante de la T7 ARN polimerasa (variante de T7) de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1 a 8;

(b) proporcionar una molécula de ADN molde que comprende un promotor de T7, estando el promotor de T7 ligado funcionalmente a una secuencia de nucleótidos diana que se va a transcribir;

5 (c) poner en contacto la solución acuosa con el ADN molde de la etapa (b) con la variante de T7 de la etapa (a) en presencia de ribonucleósidos trifosfato, formando de este modo una mezcla de reacción;

(d) incubar la mezcla de reacción en condiciones que permitan la actividad de ARN polimerasa;

10 sintetizando de ese modo la molécula de ARN.

13. Una mezcla de reacción que comprende una solución acuosa con un polipéptido de la variante de la T7 ARN polimerasa (variante de T7) de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1 a 8, en la que la solución acuosa además comprende una molécula de ADN molde que comprende un promotor de T7 ligado funcionalmente a una secuencia de nucleótidos diana para su transcripción y ribonucleósidos trifosfato.

14. Un kit que comprende, en envases separados, una solución acuosa con un polipéptido de una variante de la T7 ARN polimerasa (variante de T7) de acuerdo con cualquiera de los artículos 1 a 8 y un tampón con uno o más ribonucleósidos trifosfato.

15. Un polipéptido que comprende una variante mejorada de la T7 ARN polimerasa (variante de T7), teniendo la variante de T7 las propiedades de (i) actividad de ARN polimerasa dependiente de ADN, y (ii) una composición distinta de aminoácidos en comparación con el polipéptido de 883 aminoácidos de la T7 ARN polimerasa de SEC ID N°: 2 (referencia de tipo silvestre), y la mejora de la variante de T7 siendo la ausencia de formación de homomultímeros en una solución acuosa como un resultado de un enlace(s) disulfuro intermolecular(es), en la que en la posición seleccionada de la 510 a la 530 de la variante de T7, numerada a partir del extremo N-terminal de la referencia de tipo silvestre, está presente un resto de Cisteína, y en la que la variante de T7 comprende una o más sustituciones de aminoácidos de las cuales una (o la primera) está en la posición 723 donde la Serina sustituye al resto de Cisteína (Cys723Ser).

16. El polipéptido de acuerdo con el artículo 15, en el que el número de aminoácidos sustituidos en la variante de T7 es de 1 a 10.

17. El polipéptido de acuerdo con el artículo 16, en el que la variante de T7 además comprende una sustitución Cisteína-Serina seleccionada del grupo que consiste en Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser y Cys839Ser.

18. El polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 15 a 17, en el que la solución acuosa está libre de un modo detectable de homomultímeros tal como se determina mediante electroforesis en SDS poliacrilamida de hasta aproximadamente 3 µg de proteína (preferentemente de aproximadamente 2 µg a aproximadamente 3 µg de proteína, más preferentemente hasta aproximadamente 2,9 µg) del polipéptido de la variante de T7 en forma purificada y la tinción del gel de electroforesis con el Kit Colorante Simply Blue Safe (Invitrogen).

19. El polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 16 a 18, en el que la variante de T7 además comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Val426Leu, Val426Ile, Val426Phe, Ser633Val, Ser633Met, Val650Leu, Thr654Leu, Ala702Val y Val795Ile.

20. El polipéptido de acuerdo con el artículo 19, en el que la variante de T7 comprende una sustitución de aminoácidos Val426Leu, Val650Leu, Ala702Val y Val795Ile.

21. El polipéptido de acuerdo con el artículo 19, en el que la variante de T7 comprende las sustituciones de aminoácidos Val426Leu, Ala702Val y Val795Ile.

22. El polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 15 a 21, en el que el polipéptido comprende la variante de T7 y un marcador His N-terminal.

23. El polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 15 a 22, en el que el polipéptido comprende la variante de T7 con una Metionina N-terminal.

24. El polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 15 a 23 en una solución acuosa.

25. El polipéptido de acuerdo con al artículo 24, en el que un agente reductor con un grupo tiol está ausente de la solución acuosa.

26. Un método para producir un polipéptido que comprende una variante mejorada de la T7 ARN polimerasa (variante de T7), teniendo la variante de T7 las propiedades de (i) actividad de ARN polimerasa dependiente de ADN, y (ii) una composición distinta de aminoácidos en comparación con el polipéptido de 883 aminoácidos de la

T7 ARN polimerasa de SEC ID N°: 2 (referencia de tipo silvestre) y siendo la mejora de la variante de T7 la ausencia de formación de homomultímeros en una solución acuosa como un resultado de un enlace(s) disulfuro intermolecular(es), el método comprende las etapas de

- 5 (a) proporcionar la variante de T7 sustituyendo la Cys723, en la referencia de tipo silvestre, numerada a partir del extremo N-terminal por Serina (Cys723Ser);
- (b) incluir opcionalmente además en la variante de T7 una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser y Cys839Ser;
- 10 (c) incluir opcionalmente además en la variante de T7 una o más sustituciones de aminoácidos;
- (d) retrotranscribir la secuencia de aminoácidos del polipéptido, comprendiendo el polipéptido la variante de T7 obtenida en las etapas (a), (b) y (c), obteniendo de ese modo una secuencia de nucleótidos que codifica el
- 15 polipéptido;
- (e) expresar una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la etapa (d) en un sistema de expresión, y aislar el polipéptido expresado del sistema de expresión;
- 20 produciendo de ese modo el polipéptido.

27. El método de acuerdo con el artículo 26, en el que en la etapa (c) la una o más sustitución(es) de aminoácidos se selecciona(n) del grupo que consiste en Val426Leu, Val426Ile, Val426Phe, Ser633Val, Ser633Met, Val650Leu, Thr654Leu, Ala702Val y Val795Ile.

- 25 28. Un método para producir una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótidos que codifica una variante mejorada de la T7 ARN polimerasa (variante de T7), teniendo la variante de T7 las propiedades de (i) actividad de ARN polimerasa dependiente de ADN, y (ii) una composición distinta de aminoácidos en comparación con el polipéptido de 883 aminoácidos de la T7 ARN polimerasa de SEC ID N°: 2 (referencia de tipo silvestre), y siendo la mejora de la variante de T7 la ausencia de la formación de homomultímeros en una solución acuosa como resultado de enlaces disulfuro intramoleculares, comprendiendo el método las etapas de
- 30 (a) retrotranscribir una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 15 a 23 o una secuencia de aminoácidos de un polipéptido obtenible mediante el método de acuerdo al artículo 26 o el artículo 27, obteniendo de ese modo una secuencia de ácido nucleico; seguido de
- 35 (b) sintetizar una molécula de ácido nucleico con la secuencia del ácido nucleico obtenida después de realizar la etapa (a);
- 40 produciendo de este modo la molécula de ácido nucleico que codifica la variante de T7.

29. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de un miembro del grupo que consiste en las SEC ID N°: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69 y 71.

- 45 30. Un vector de expresión que comprende una o más secuencias de nucleótidos capaces de controlar la transcripción y/o traducción y están ligadas funcionalmente a (a) una molécula de ácido nucleico obtenible mediante el método del artículo 28, o (b) una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el artículo 29.
- 50 31. Un organismo hospedador capaz de expresar recombinantemente un polipéptido, en el que el organismo hospedador se transforma con un vector de expresión de acuerdo con el artículo 30.

32. El organismo hospedador de acuerdo con el artículo 31, en el que el organismo hospedador es *Escherichia coli*.

- 55 33. Un método para sintetizar una molécula de ARN, que comprende las etapas de
- (a) proporcionar una variante del polipéptido de la T7 ARN polimerasa (variante de T7) de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 15 a 23;
- 60 (b) proporcionar una molécula de ADN molde que comprende un promotor de T7, estando el promotor de T7 ligado funcionalmente a una secuencia de nucleótidos diana para su transcripción;
- (c) poner en contacto en una solución acuosa el molde de ADN de la etapa (b) con la variante de T7 de la etapa (a) en presencia de ribonucleósidos trifosfato, formando de este modo una mezcla de reacción;
- 65 (d) incubar la mezcla de reacción en condiciones que permitan la actividad de ARN polimerasa;

sintetizando de ese modo la molécula de ARN.

34. El método de acuerdo con el artículo 33, en el que en una cualquiera de las etapas (a), (b), (c) y (d) está ausente un agente reductor con un grupo tiol.

35. El método de acuerdo con el artículo 33, en el que en una cualquiera de las etapas (a), (b), (c) y (d) está ausente un agente reductor seleccionado de mercaptoetanol, ditiotreitól, ditioeritritól.

36. Una mezcla de reacción que comprende, en una solución acuosa, una molécula de ADN molde que comprende un promotor de T7 funcionalmente ligado a una secuencia de nucleótidos diana para su transcripción, ribonucleósidos trifosfato, y una variante del polipéptido de la ARN polimerasa T7 (variante de T7) de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 15 a 23, y en la mezcla de reacción está ausente un agente reductor con un grupo tiol.

37. Una mezcla de reacción que comprende en una solución acuosa una molécula de ADN molde que comprende un promotor de T7 ligado funcionalmente a una secuencia de nucleótidos diana para su transcripción, ribonucleósidos trifosfato y una variante del polipéptido de la T7 ARN polimerasa (variante de T7) de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 15 a 23, y en la que la mezcla de reacción está ausente un agente reductor seleccionado de mercaptoetanol, ditiotreitól, ditioeritritól.

38. Un kit que comprende, en envases separados, una variante de un polipéptido de la T7 ARN polimerasa (variante de T7) de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 15 a 23 y un tampón con uno o más ribonucleósidos trifosfato, en el que la variante de T7 está en una solución acuosa, y en el que en la mezcla de la solución acuosa está ausente un agente reductor con un grupo tiol.

39. Un kit que comprende, en envases separados, una variante de un polipéptido de la T7 ARN polimerasa (variante de T7) de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 15 a 23 en un tampón con uno más ribonucleósidos fosfato, en el que la variante de T7 está en una solución acuosa, y en el que en la mezcla de la solución acuosa está ausente un agente reductor seleccionado de mercaptoetanol, ditiotreitól y ditioeritritól.

Los siguientes ejemplos, figuras y el listado de secuencias se proporcionan para ayudar a entender la presente invención, el verdadero alcance de la cual se expone en las reivindicaciones anexas. Se entiende que pueden hacerse modificaciones de los procedimientos expuestos sin apartarse del espíritu de la invención.

Descripción del listado de secuencias

- SEC ID N°: 1      Secuencia de ADN que codifica la ARN polimerasa T7 de tipo silvestre dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 1 en la Tabla 3
- SEC ID N°: 2      T7 ARN polimerasa dependiente de ADN de tipo silvestre, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 1 en la Tabla 3
- SEC ID N°: 3      Secuencia de ADN que codifica la variante Cys125Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 2 en la Tabla 3
- SEC ID N°: 4      Variante Cys125Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 2 en la Tabla 3
- SEC ID N°: 5      Secuencia de ADN que codifica la variante Cys347Ser de la ARN polimerasa T7 dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 3 en la Tabla 3
- SEC ID N°: 6      Variante Cys347Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 3 en la Tabla 3
- SEC ID N°: 7      Secuencia de ADN que codifica la variante Cys492Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 4 en la Tabla 3
- SEC ID N°: 8      Variante Cys492Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 4 en la Tabla 3
- SEC ID N°: 9      Secuencia de ADN que codifica la variante Cys515Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 5 en la Tabla 3
- SEC ID N°: 10     Variante Cys515Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 5 en la Tabla 3
- SEC ID N°: 11     Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 6 en la Tabla 3

## ES 2 538 694 T3

5	SEC ID N°: 12	Variante Cys723Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 6 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 13	Secuencia de ADN que codifica la variante Cys839Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 7 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 14	Variante Cys839Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 7 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 15	Secuencia de ADN que codifica la variante Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser, Cys723Ser, Cys839Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 8 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 16	Variante Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser, Cys723Ser, Cys839Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 8 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 17	Secuencia de ADN que codifica la variante Val426Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 9 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 18	Variante Va1426Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 9 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 19	Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Va1426Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 10 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 20	Variante Cys723Ser, Va1426Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal, correspondiente a N° 10 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 21	Secuencia de ADN que codifica la variante Val426Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 11 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 22	Variante Val426Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 11 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 23	Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Val426Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 12 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 24	Variante Cys723Ser, Val426Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 12 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 25	Secuencia de ADN que codifica la variante Val426Phe de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 13 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 26	Variante Val426Phe de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 13 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 27	Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Val426Phe de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 14 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 28	Variante Cys723Ser, Val426Phe de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 14 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 29	Secuencia de ADN que codifica la variante Ser633Met de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 15 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 30	Variante Ser633Met de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 15 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 31	Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Ser633Met de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 16 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 32	Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Ser633Met de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 16 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 33	Secuencia de ADN que codifica la variante Val650Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 17 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 34	Variante Val650Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 17 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 35	Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Val650Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 18 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 36	Variante Cys723Ser, Val650Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia e aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 18 en la Tabla 3



	SEC ID N°: 62	Variante Val426Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 31 en la Tabla 3
5	SEC ID N°: 63	Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Val426Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 32 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 64	Variante Cys723Ser, Val426Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 32 en la Tabla 3
10	SEC ID N°: 65	Secuencia de ADN que codifica la variante Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser, Cys723Ser, Cys839Ser, Val426Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 33 en la Tabla 3
15	SEC ID N°: 66	Variante Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser, Cys723Ser, Cys839Ser, Val426Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 33 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 67	Secuencia de ADN que codifica la variante Val426Leu, Val650Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 34 en la Tabla 3
20	SEC ID N°: 68	Variante Val426Leu, Val650Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 34 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 69	Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Val426Leu, Val650Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 35 en la Tabla 3
25	SEC ID N°: 70	Variante Cys723Ser, Val426Leu, Val650Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 35 en la Tabla 3
	SEC ID N°: 71	Secuencia de ADN que codifica la variante C125S, C347S, C492S, C515S, C723S, C839S, V426L, V650L, A702V, V795I de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 36 en la Tabla 3
30	SEC ID N°: 72	C125S, C347S, C492S, C515S, C723S, C839S, V426L, V650L, A702V, V795I de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 36 en la Tabla 3
35	SEC ID N°: 73	ADN que codifica la secuencia enlazadora con el marcador de Histidina (His6) N-terminal, fusionada a los dos primeros aminoácidos N-terminales de T7 (Met y Asn)
	SEC ID N°: 74	Secuencia de aminoácidos del marcador de Histidina N-terminal con una secuencia enlazadora (His6), fusionada a los dos primeros aminoácidos N-terminales de T7 (Met y Asn)
	SEC ID N°: 75	Marcador de histidina (aminoácidos); esta región puede abarcar de 3 a 7 restos de "His"
40	SEC ID N°: 76	Marcador-His6 (aminoácidos)

#### Descripción de las figuras

45	Figura 1	Gel de SDS poliacrilamida teñido, para los detalles véase el Ejemplo 5, Ejemplo 6 y Ejemplo 7. Las líneas designadas con M contienen el marcador de tamaño Mark 12 (Invitrogen). Las líneas 1 y 2 contienen la T7 ARN polimerasa de tipo silvestre. En ambas líneas la banda prominente de la proteína que migra más rápido representa el polipéptido de T7 monomérico. Las muestras de la T7 ARN polimerasa incubadas durante 16 horas a 37 °C se trataron con o sin con agentes reductores (DTT), y se sometieron a electroforesis.
50		Línea 1: muestra sin DTT Línea 2: muestra tratada con DTT. En la línea 1 las regiones marcadas con uno y dos asteriscos indican multímeros de T7. La región marcada con un asterisco contiene solamente una mancha débil. En la región marcada con dos asteriscos, pueden discernirse bandas separadas, indicando dímeros y homomultímeros de distintos órdenes más altos.
55	Figura 2	Gel de SDS poliacrilamida teñido, para los detalles véase el Ejemplo 5, Ejemplo 6 y Ejemplo 7. Las líneas designadas con M contienen el marcador de tamaño Mark 12 (Invitrogen). No se añadió agente reductor antes de la electroforesis.
60		Línea 1: T7 ARN polimerasa de tipo silvestre sin marcador His Línea 2: T7 ARN polimerasa de tipo silvestre incluyendo marcador His6 Línea 3: T7 variante de T7 N° 8 [Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser, Cys723Ser, Cys839Ser] incluyendo marcador His6 Línea 4: T7 variante de T7 N° 6 [Cys723Ser] incluyendo marcador His6 Línea 5: T7 variante de T7 N° 3 [Cys347Ser] incluyendo marcador His6 Línea 6: T7 variante de T7 N° 7 [Cys839Ser] incluyendo marcador His6 Línea 7: T7 variante de T7 N° 2 [Cys125Ser] incluyendo marcador His6
65		

Línea 8: T7 variante de T7 N° 4 [Cys492Ser] incluyendo marcador His6  
 Línea 9: T7 variante de T7 N° 5 [Cys515Ser] incluyendo marcador His6  
 Para homodímeros de diversos grados y homomultímeros de órdenes más altos pueden verse las líneas 1, 2, 5, 6, 7, 8 y 9. Las líneas 3 y 4 están libres de un modo detectable de homodímeros y/o multímeros.

Figura 3 Gel de SDS poliacrilamida teñido, para los detalles véase el Ejemplo 5, Ejemplo 6 y Ejemplo 7. Las líneas designadas con M contienen el marcador de tamaño Mark 12 (Invitrogen). Se añadió DTT 10 mM antes de la electroforesis, para proporcionar condiciones reductoras.

Línea 1: T7 ARN polimerasa de tipo silvestre sin marcador His  
 Línea 2: T7 ARN polimerasa de tipo silvestre incluyendo marcador His6  
 Línea 3: T7 variante de T7 N° 8 [Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser, Cys723Ser, Cys839Ser] incluyendo marcador His6  
 Línea 4: T7 variante de T7 N° 6 [Cys723Ser] incluyendo marcador His6  
 Línea 5: T7 variante de T7 N° 3 [Cys347Ser] incluyendo marcador His6  
 Línea 6: T7 variante de T7 N° 7 [Cys839Ser] incluyendo marcador His6  
 Línea 7: T7 variante de T7 N° 2 [Cys125Ser] incluyendo marcador His6  
 Línea 8: T7 variante de T7 N° 4 [Cys492Ser] incluyendo marcador His6  
 Línea 9: T7 variante de T7 N° 5 [Cys515Ser] incluyendo marcador His6

Ejemplo 1

Diseño de mutaciones de intercambio de aminoácidos en el polipéptido de T7

Se inspeccionaron las estructuras de rayos X de la T7 ARN polimerasa depositadas en el Banco de Datos de Proteínas (<http://www.wwpdb.org/pdb>; códigos: 1cez [referentes a Cheetham, G. M. T., et al., Nature 399 (1999) 80-83], y de 1s77 [referente a Yin, Y. W., y Steitz, T. A., Cell 116 (2004) 393-404]) para identificar sitios candidatos para la introducción de mutaciones. Para tal fin, se localizaron los restos de cisteína en modelos tridimensionales y se identificaron los restos de Cys de la superficie del polipéptido de T7 que podían ser accesibles en principio para la formación de enlaces disulfuro intramoleculares. Además, se identificaron aminoácidos candidatos teniendo en mente el objetivo de aumentar la estabilidad de la proteína.

Las posiciones de la secuencia de aminoácidos de la T7 de tipo silvestre seleccionadas (de acuerdo con SEC ID N°: 2) se muestran en la Tabla 1a que muestra las Cisteínas candidatas. La Tabla 1b proporciona las mutaciones de sustitución de aminoácidos de las que se espera que aumenten la estabilidad de la proteína polimerasa T7. También se indica la razón principal subyacente del diseño de las mutaciones, con el fin de aumentar la estabilidad de una variante del polipéptido de T7 frente a la referencia de tipo silvestre. Por lo tanto, la mayor parte de las sustituciones de aminoácidos se seleccionaron bien para rellenar las cavidades hidrófobas del núcleo o para estabilizar los bucles localizados en la superficie de la enzima.

Tabla 1a: mutaciones de aminoácidos de la T7 ARN polimerasa: diseño de una enzima con tendencia reducida a formar multímeros unidos mediante puentes disulfuro intramoleculares

<i>Resto de Cys en el polipéptido de T7 de TS, posiciones en la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 2)</i>	<i>Localización predicha</i>	<i>Mutación propuesta</i>
125	superficie	Ser
216	enterrado	-
271	enterrado	-
347	superficie	Ser
467	enterrado	-
492	superficie	Ser
510	enterrado	-
515	superficie	Ser
530	enterrado	-
540	enterrado	-
723	superficie	Ser
839	superficie	Ser

Tabla 1b: mutaciones de aminoácidos de la T7 ARN polimerasa: diseño de una enzima con termoestabilidad aumentada

Aminoácido, TS	Posición	Mutación	Razón fundamental
Val	426	Leu, Ile, Phe, Trp	Rellenar la cavidad del núcleo de la proteína
Ser	633	Val, Leu, Met	Estabilizar el bucle
Val	650	Leu	Estabilizar el bucle
Thr	654	Leu	Estabilizar el bucle
Ala	702	Val	Rellenar la cavidad del núcleo de la proteína
Val	795	Ile	Rellenar la cavidad del núcleo de la proteína

- 5 Con el fin de proporcionar una secuencia codificante para cualquiera de los mutantes de T7 que se presentan en el presente documento, se usó como base la secuencia de nucleótidos SEC ID N°: 1 que codifica el polipéptido de T7 de la referencia de tipo silvestre. Los codones de nucleótidos correspondientes a los restos de aminoácidos de las posiciones indicadas en las Tablas 1a y 1b se mutaron, con el fin de codificar el aminoácido cambiado en la posición respectiva. Las mutaciones se diseñaron preferentemente de acuerdo con el sesgo de uso de codones de los genes de clase II de *E. coli* (Hénaut, A., y Danchin, A., Analysis and Predictions from *Escherichia coli* sequences. *Escherichia coli* and *Salmonella*, Vol. 2, Capítulo 114 (1996) 2047-2066, Neidhardt FC ed., ASM press, Washington, D. C.), tal como se proporcionan en la Tabla 2.
- 10

Tabla 2: uso de codones en *E. coli*

Aminoácido	Codón	Clase			Aminoácido	Codón	Clase		
		I	u	III			I	II	III
Phe	T T T	55,09	29,08	67,14	Leu	C T T	9,7	5,56	19
	T T C	44,91	70,92	32,86		C T C	10,4	8,03	9,04
Leu	T T A	10,99	3,44	20,09		C T A	3,09	0,83	6,81
	T T G	13,02	5,47	15,05		C T G	52,79	76,67	29,99
Ser	T C T	13,26	32,41	19,63	Pro	C C T	13,71	11,23	28,3
	T C C	15,02	26,56	11,34		C C C	11,19	1,63	16,26
	T C A	10,83	4,79	22,09		C C A	18,63	15,25	31,5
	T C G	16,88	7,39	10,6		C C G	56,47	71,89	23,94
Tyr	T A T	54,42	35,23	69,6	His	C A T	56,8	29,77	61,69
	T A C	45,58	64,77	30,4		C A C	43,2	70,23	38,31
Terminación	T A A				Gln	C A A	33,4	18,65	37,06
	T A G					C A G	66,6	81,35	62,94

15

Aminoácido	Codón	Clase			Aminoácido	Codón	Clase		
		I	u	III			I	II	III
Cys	T G T	40,9	38,85	55,71	Arg	C G T	38,99	64,25	26,05
	T G C	59,1	61,15	44,29		C G C	42,23	32,97	21,94
Terminación	T G A					C G A	5,52	1,07	12,8
Trp	T G G	100	100	100		C G G	8,97	0,8	13,62
Ile	A T T	51,2	33,49	47,57	Val	G T T	23,74	39,77	34,33
	A T C	44,37	65,94	26,65		G T C	22,48	13,45	18,95
	A T A	4,43	0,57	25,78		G T A	14,86	19,97	21,78
Met	A T G	100	100	100		G T G	38,92	26,81	24,94
Thr	A C T	14,85	29,08	26,83	Ala	G C T	14,52	27,54	22,86
	A C C	46,83	53,6	24,45		G C C	27,62	16,14	23,67
	A C A	10,52	4,67	27,93		G C A	19,63	24,01	31,27
	A C G	27,81	12,65	20,8		G C G	38,23	32,3	22,19
Asn	A A T	40,87	17,25	64,06	Asp	G A T	62,83	46,05	70,47
	A A C	59,13	82,75	35,94		G A C	37,17	53,95	29,53
Lys	A A A	75,44	78,55	72,21	Glu	G A A	68,33	75,35	66,25
	A A G	24,56	21,45	27,79		G A G	31,67	24,65	33,75
Ser	A G T	13,96	4,52	18,73	Gly	G G T	32,91	50,84	31,79
	A G C	30,04	24,33	17,61		G G C	43,17	42,83	24,51
Arg	A G A	1,75	0,62	15,63		G G A	9,19	1,97	24,75
	A G G	1,54	0,29	9,96		G G G	14,74	4,36	18,95

5 Los genes que sirvieron como la base para los datos de la Tabla 2 se agruparon usando un análisis de correspondencia factorial en tres clases. La clase I contiene genes implicados en la mayor parte de los procesos metabólicos. Los genes de clase II corresponden a genes altamente y continuamente expresados durante el crecimiento exponencial. Los genes de clase III están implicados en la transferencia horizontal de ADN. Se puede observar que la distribución de los codones en los genes de clase III es mayor o incluso menor, mientras que está extremadamente sesgada en los genes de clase II (en particular, se seleccionan en contra de los codones terminados en A).

10 Las mutaciones al nivel del codón que se introdujeron en la secuencia codificante de T7 se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: polimerasa T7 y variantes de la misma

Nº	Enzima/variante de T7	Codón de TS	Codón mutado	SEC ID Nº:
1	Tipo silvestre		-	1, 2
2	Cys125Ser	TGC	AGC	3, 4
3	Cys347Ser	TGT	AGC	5, 6
4	Cys492Ser	TGC	AGC	7, 8

ES 2 538 694 T3

Nº	Enzima/variante de T7	Codón de TS	Codón mutado	SEC ID Nº:
5	Cys515Ser	TGC	AGC	9, 10
6	Cys723 Ser	TGC	AGC	11, 12
7	Cys839Ser	TGT	AGC	13, 14
8	Cys125Ser	TGC	AGC	15, 16
	Cys347Ser	TGT	AGC	
	Cys492Ser	TGC	AGC	
	Cys515Ser	TGC	AGC	
	Cys723Ser	TGC	AGC	
	Cys839Ser	TGT	AGC	
9	Val426Leu	GTT	CTG	17, 18
10	Cys723Ser	TGC	AGC	19, 20
	Val426Leu	GTT	CTG	
11	Val426Ile	GTT	ATC	21, 22
12	Cys723Ser	TGC	AGC	23, 24
	Val426Ile	GTT	ATC	
13	Val426Phe	GTT	TTC	25, 26
14	Cys723Ser	TGC	AGC	27, 28
	Val426Phe	GTT	TTC	
15	Ser633Met	TCA	ATG	29, 30
16	Cys723Ser	TGC	AGC	31, 32
	Ser633Met	TCA	ATG	
17	Val650Leu	GTG	CTG	33, 34
18	Cys723Ser	TGC	AGC	35, 36
	Val650Leu	GTG	CTG	
19	Thr654Leu	ACC	CTG	37, 38
20	Cys723Ser	TGC	AGC	39, 40
	Thr654Leu	ACC	CTG	
21	Ala702Val	GCT	GTT	41,42
22	Cys723Ser	TGC	AGC	43,44
	Ala702Val	GCT	GTT	
23	Val795Ile	GTA	ATC	45,46
24	Cys723Ser	TGC	AGC	47,48
	Val795Ile	GTA	ATC	
25	Ala702Val	GCT	GTT	49,50
	Val795Ile	GTA	ATC	
26	Cys723Ser	TGC	AGC	51,52
	Ala702Val	GCT	GTT	
	Val795Ile	GTA	ATC	

ES 2 538 694 T3

Nº	Enzima/variante de T7	Codón de TS	Codón mutado	SEC ID Nº:
27	Val426Leu	GTT	CTG	53,54
	Ala702Val	GCT	GTT	
28	Cys723Ser	TGC	AGC	55, 56
	Val426Leu	GTT	CTG	
	Ala702Val	GCT	GTT	
29	Val426Leu	GTT	CTG	57, 58
	Val795Ile	GTA	ATC	
30	Cys723Ser	TGC	AGC	59,60
	Val426Leu	GTT	CTG	
	Val795Ile	GTA	ATC	
31	Val426Leu	GTT	CTG	61,62
	Ala702Val	GCT	GTT	
	Val795Ile	GTA	ATC	
32	Cys723Ser	TGC	AGC	63,64
	Val426Leu	GTT	CTG	
	Ala702Val	GCT	GTT	
	Val795Ile	GTA	ATC	
33	Cys125Ser	TGC	AGC	65,66
	Cys347Ser	TGT	AGC	
	Cys492Ser	TGC	AGC	
	Cys515Ser	TGC	AGC	
	Cys723Ser	TGC	AGC	
	Cys839Ser	TGT	AGC	
	Val426Leu	GTT	CTG	
	Ala702Val	GCT	GTT	
	Val795Ile	GTA	ATC	
34	Val426Leu	GTT	CTG	67,68
	Val650Leu	GTG	CTG	
	Ala702Val	GCT	GTT	
	Val795Ile	GTA	ATC	
35	Cys723Ser	TGC	AGC	69, 70
	Val426Leu	GTT	CTG	
	Val650Leu	GTG	CTG	
	Ala702Val	GCT	GTT	
	Val795Ile	GTA	ATC	

Nº	Enzima/variante de T7	Codón de TS	Codón mutado	SEC ID Nº:
36	Cys125Ser	TGC	AGC	71,72
	Cys347Ser	TGT	AGC	
	Cys492Ser	TGC	AGC	
	Cys515Ser	TGC	AGC	
	Cys723Ser	TGC	AGC	
	Cys839Ser	TGT	AGC	
	Val426Leu	GTT	CTG	
	Val650Leu	GTG	CTG	
	Ala702Val	GCT	GTT	
	Val795Ile	GTA	ATC	

A nivel de los aminoácidos, se muestran variantes de T7 en las SEC ID Nº: 4 a 72 con números pares.

- 5 Las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos mutados de T7 que se expresaron en *E. coli* se muestran incluso en la SEC ID Nº: 3 a 71 con números impares. Las secuencias de nucleótidos se representan incluyendo los codones de iniciación para la metionina N-terminal pero sin ninguna otra estructura N-terminal artificial adicional tal como las marcadores His.
- 10 Bien conocido en la técnica, un marcador His (en la bibliografía también mencionada como marcador poli-His) es un motivo de aminoácidos en las proteínas que típicamente consiste en al menos seis restos de His consecutivos (His6). Aunque se prefiere el extremo N-terminal de una variante de T7 para la adición del marcador His, el extremo C terminal de polipéptido puede servir como una alternativa.
- 15 Para aclararlo, un marcador His N-terminal puede localizarse entre la Metionina en el extremo N-terminal del polipéptido respectivo de la variante de T7 y el aminoácido posterior de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 2, es decir Asn. Como alternativa, el marcador His puede adjuntarse a la metionina N-terminal de la variante de T7. Cuando esta se adjunta en el extremo C terminal del polipéptido de la variante de T7 el marcador His forma los aminoácidos C terminales.
- 20 Las variantes de T7 se modificaron adicionalmente de modo que cada polipéptido contenía un marcador His en su extremo N-terminal para facilitar la purificación.
- 25 Aparte de las Histidinas, el marcador His puede comprender adicionalmente más aminoácidos dependiendo del diseño de la secuencia de nucleótidos que codifique el marcador His. Por lo tanto, un enlazador de oligonucleótidos con los sitios de restricción típicamente añade de 1 a 5 aminoácidos más al fragmento de nucleótido que codifica los restos His consecutivos en el marcador His.
- 30 Las secuencias de aminoácidos de las variantes de T7 de las Tablas 1a y 1b, y las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las variantes de T7 se muestran en el listado de secuencias de esta divulgación. No se muestra ningún marcador His en tanto que estas pueden diferir en su secuencia, dependiendo del vector de clonación particular usado. Sin embargo, no se espera que las diferencias concernientes a número de Histidinas y la secuencia enlazadora, de acuerdo con las realizaciones preferentes, tengan un impacto en las variantes de T7 de acuerdo con la invención.

### 35 Ejemplo 2

Clonación de los ácidos nucleicos que codifican variantes de la T7 ARN polimerasa

- 40 Todos los procedimientos moleculares se realizaron de acuerdo con métodos convencionales (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., *Molecular cloning: A Laboratory Manual* segunda Edición, B.27 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press NY (EE.UU.)). Las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos de tipo silvestre y de T7 mutante se sintetizaron mediante una estrategia de síntesis combinatoria tal como se describe (van den Brulle, J., *et al.*, *Biotechniques* 45(3) (2008) 340-343).

- 45 Para la expresión de cada una de las variantes de T7, se clonó la respectiva secuencia de ADN codificante en vectores de expresión adecuados de tal modo que la secuencia codificante de T7 mutada se inserta con la

orientación correcta bajo el control de un promotor apropiado, preferentemente un promotor inducible, particularmente preferentemente los promotores lac, lacUV5, tac o T5. Los vectores de expresión preferidos son los plásmidos pUC con promotores lac o lacUV5 o los plásmidos pKK. Por clarificación, una secuencia codificante ejemplar comprende un ADN que codifica un polipéptido seleccionado de uno cualquiera de la SEC ID N°: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69 y 71, que opcionalmente incluye una modificación adicional tal como un marcador His.

Los genes sintetizados se clonaron en un plásmido pUC18. La cepa receptora para las transformaciones fue *E. coli* XL-1 blue. Los clones transformados crecieron a 37 °C en medio LB que contenía ampicilina (100 µg/ml). Los plásmidos se aislaron y se digirieron usando *EcoRI* y *HindIII*. Los fragmentos resultantes se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y se extrajo la banda respectiva que correspondía a la secuencia codificante de la variante de la polimerasa T7. Los fragmentos aislados se ligaron en el plásmido de expresión pKKT5 (derivado de pKK177-3 [Kopetzki, E., *et al.*, Mol. Gen. Genet. 216 (1989) 149-155] mediante el intercambio de los promotores tac por el promotor T5 derivado del plásmido pDS [Bujard, H., *et al.*, Methods Enzymol. 155 (1987) 416-433] que se digirió con *EcoRI* y *HindIII*.

Los plásmidos se transformaron en *E. coli* UT5600 (que alojaba el plásmido pUBS520). Los clones crecieron a 37 °C en medio LB que contenía ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml).

### Ejemplo 3

Expresión de polipéptidos de la polimerasa de T7 variante

Las cepas de expresión transformadas de *E. coli* obtenidas tal como se describe en el Ejemplo 2 se cultivaron a 37 °C en medio LB que contenía ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). La inducción de la expresión recombinante se realizó a una densidad óptica de 0,7 (medida a 578 nm) añadiendo IPTG a una concentración final de 1 mM. Después de 5 horas las células se recogieron mediante centrifugación y se congelaron a -20 °C.

### Ejemplo 4

Purificación de de polipéptidos de la polimerasa de T7 variante

Se prefiere el siguiente protocolo de purificación de acuerdo con la invención. Los polipéptidos de T7 de tipo silvestre con marcadores His6 y las variantes de la T7 ARN polimerasa se purificaron de manera rutinaria hasta la homogeneidad usando métodos cromatográficos. Se omitieron los aditivos reductores como el 2-mercaptoetanol o el DTT durante todo el proceso de purificación. Las células congeladas (típicamente 2,1 g) se suspendieron en 30 ml de tampón de lisis (Tris 50 mM/HCl, pH 8,0 ajustado a temperatura ambiente, NaCl 0,2 M, EDTA 2 mM). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 15 min, se sonicaron las células. Después de la adición de 1 ml de Polimina P los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min (centrífuga Eppendorf). Se dializó el sobrenadante contra Tampón A (fosfato potásico 20 mM, pH 7,7, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, glicerol al 5 %). Después de la centrifugación, el conjunto se aplicó sobre una columna de S-Sepharose™ ff (1,6 x 10 cm) a un caudal de 5 ml/min. Se realizó la elución usando un gradiente de NaCl (de 0 M a 1 M en Tampón A). Las fracciones se controlaron corriendo alícuotas en un gel de SDS. Se agruparon las fracciones que contenían la T7 ARN polimerasa. Después de la diálisis contra un Tampón B (50 Tris mM/HCl, pH 8,0 (pH ajustado a 25 °C), NaCl 1 M) se aplicó cada solución enzimática a una columna quelante de Ni de Sepharose™ ff (4 ml). Se lavó la columna usando Tampón B. Se eluyó la T7 ARN polimerasa en Tampón B usando un gradiente de imidazol de 0 M a 1 M. Se agruparon las fracciones que contenían la enzima. Después de la diálisis contra tampón de almacenamiento (Tris 25 mM/HCl, pH 7,5 [pH ajustado a 25 °C], NaCl 10 mM, EDTA 0,1 mM) se almacenaron los conjuntos a -20 °C.

El protocolo de purificación alternativo incluye el uso de aditivos reductores (menos preferentemente): la polimerasa de T7 de tipo silvestre con marcadores His6 y las variantes de T7 se purificaron por separado hasta la homogeneidad usando una cromatografía de matriz de afinidad de quelantes metálicos. Típicamente, se suspendieron las células congeladas húmedas (2,1 g) en 30 ml de Tampón C (Tris 50 mM/HCl, pH 8,1 [pH ajustado a temperatura ambiente], NaCl 1 M). Se añadieron 315 µl de una solución de lisozima a la suspensión (10 mg/ml). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 15 min, se sonicaron las células (6 x 2 min). Se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 15 min. Se aplicó una fracción del sobrenadante (25 ml) en una columna quelante de Ni de Sefarosa (1 ml). Se lavó la columna usando un Tampón C modificado que contenía adicionalmente imidazol 10 mM. Los polipéptidos con marcadores His6 se eluyeron en un gradiente lineal (imidazol 10 mM-500 mM en Tampón C). Se agruparon las fracciones que contenían enzimas. Después de la diálisis contra el tampón de almacenamiento (fosfato potásico 10 mM, KCl 200 mM, EDTA 0,1 mM, mercaptoetanol 30 mM como un agente reductor, glicerol al 50 %, Tween 20 al 0,1 %, pH 7,9) se almacenaron los conjuntos a -20 °C.

### Ejemplo 5

Electroforesis en gel de SDS poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras de las variantes de T7 se prepararon de acuerdo con un procedimiento que se describe en el Ejemplo 4. La T7 ARN polimerasa y las variantes de la misma se analizaron mediante electroforesis en gel en geles de poliacrilamida que contenían dodecilsulfato de sodio (SDS). Se usaron geles de gradiente (NuPAGE, 4-12 %, Bis-Tris Gel, Invitrogen). Típicamente, se mezclaron las muestras de proteínas (0,26 mg/ml, 18 ml) con 6  $\mu$ l del tampón de la muestra, LDS NuPAGE (dodecil sulfato de Litio; el LDS también puede sustituirse por dodecil sulfato de sodio), (4x, Invitrogen). Después de calentarlas durante 2 min a 85 °C, las muestras (20  $\mu$ l) se aplicaron sobre el gel. La cantidad total de proteína en una sola línea del gel fue de entre 1  $\mu$ g y 3  $\mu$ g. Los geles se corrieron en Tampón de Ejecución con SDS (1x MES, Invitrogen) a 200 V durante 1 hora.

Las bandas de las proteínas en los geles se tiñeron usando el Kit Colorante Simply Blue Safe (número de producto LT6060 de Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó un marcador de peso molecular de proteínas (Mark 12, Invitrogen) para determinar el peso molecular aparente y para identificar las formas monoméricas y homopoliméricas de la T7 ARN polimerasa y/o las variantes de T7.

Como una muestra de referencia, se usó una T7 ARN polimerasa comercialmente disponible (sin marcador His) (T7 de tipo silvestre comercialmente disponible de Roche Applied Science, Mannheim, Alemania).

#### Ejemplo 6

Aplicación de condiciones para la formación de homodímeros y multímeros de orden más alto

La enzima T7 y sus variantes se purificaron de acuerdo con el Ejemplo 4 usando el procedimiento preferente sin un agente reductor. Con el fin de comparar las tendencias para formar dímeros intramoleculares y multímeros de órdenes más altos, se incubaron preparaciones separadas de la polimerasa T7 de tipo silvestre (Nº 1 en la Tabla 3) y de sus variantes (Nº 2 a 8 mostradas en la Tabla 3) en condiciones que favorecían la formación de homomultímeros. Para este fin, se incubaron las muestras de enzimas purificadas a una concentración de proteínas de 0,2 mg/ml a 0,3 mg/ml individualmente a 37 °C durante 16 horas en Tris/HCl 25 mM, pH 7,5 (pH ajustado a 25 °C), EDTA 0,1 mM, NaCl 100 mM en las condiciones ambientales contrarias. Esto incluye la exposición a oxígeno atmosférico.

#### Ejemplo 7

Análisis de la formación de homodímeros

La capacidad para formar dímeros se estudió para la T7 de tipo silvestre y sus variantes en condiciones de estrés. Para tal fin, se incubaron las muestras en un tampón sin agentes reductores. Los monómeros, dímeros y multímeros de orden más alto de las proteínas se determinaron mediante electroforesis en gel con SDS tal como se describe en el Ejemplo 5.

Las muestras de la T7 ARN polimerasa de tipo silvestre (0,2 a 0,3 mg/ml) se incubaron a 37 °C durante 16 horas en Tris/HCl 25 mM, pH 7,5 (ajustado a 25 °C), EDTA 0,1 mM, NaCl 100 mM. Se recogieron alícuotas y se aplicaron en los geles con SDS en condiciones reductoras (se añadió DTT 10 mM) o en condiciones no reductoras (se omitió el DTT, sin ningún agente reductor adicional). Tal como se muestra en la Figura 1, la muestra enzimática de la T7 de tipo silvestre contenía formas monoméricas y diméricas después de la incubación en condiciones no reductoras (en el presente caso sin DTT, línea 1). El análisis de la muestra en condiciones reductoras (con DTT) mostró que la proteína se transformó completamente a la forma monomérica (línea 2).

Además, las muestras de la T7 de tipo silvestre y las variantes de T7 (0,2 a 0,3 mg/ml cada una) se incubaron a 37 °C durante 16 horas en Tris/HCl 25 mM, pH 7,5 (ajustado a 25 °C), EDTA 0,1 mM, NaCl 100 mM. Se recogieron alícuotas y se aplicaron sobre los geles con SDS en condiciones reductoras o en condiciones no reductoras. Después de la incubación, se sometió una muestra de cada preparación tratada a electroforesis de SDS poliacrilamida tal como se describe en el Ejemplo 5. Los resultados se representan en la Figura 2 (agentes reductores ausentes) y Figura 3 (DTT 10 mM añadido).

Cada línea con la T7 de tipo silvestre o la variante de T7 de las Figuras 1, 2 y 3 representa una cantidad de 2,9  $\mu$ g de proteína.

El hallazgo más sorprendente fue, que entre las variantes de T7 con las sustituciones Cys-Ser ensayadas, todas las que tenían una mutación Cys723Ser no mostraron trazas detectables de homodímeros o en ningún homomultímero de orden más alto en los geles con SDS en las condiciones especificadas en el Ejemplo 5. Este efecto no solamente se observó en las variantes de T7 con una sola sustitución Cys-Ser. También se obtuvo el mismo efecto (es decir, los homomultímeros estuvieron ausentes de un modo detectable) cuando la Cys723Ser se combinó con cualquier otra sustitución tal como se muestra en la Tabla 3. Estos resultados sugieren en gran medida que la mutación Cys723Ser puede combinarse ventajosamente con otras mutaciones de sustitución conduciendo por lo tanto a variantes con formación de homomultímeros suprimida.

Se observó que el efecto de cualquier otra de las mutaciones de sustitución Cys-Ser seleccionadas del grupo que consiste en Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser y Cys839Ser no fue comparable, ya que los homodímeros o cualquiera de los homomultímeros de orden más alto fueron detectables en cantidades variables. En los geles con SDS las variantes de T7 con Cys839Ser solamente mostraron una reducción detectable de la formación de homodímeros pero no la ausencia de homomultímeros.

Tal como es muestra en la Figura 1, la sustitución Cys723Ser sola es sorprendentemente eficaz en la supresión de la formación de los homodímeros (y homomultímeros). No obstante, es deseable la acumulación de más sustituciones Cys-Ser en el polipéptido de T7, con el fin de minimizar la formación de heterodímeros y multímeros, es decir, suprimir los enlaces disulfuro covalentes con otras proteínas excepto con el polipéptido de T7. A este respecto, se ha descubierto que una variante de T7 que comprende Cys723Ser y una o más sustituciones adicionales seleccionadas de Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser y Cys839Ser es muy ventajosa.

#### Ejemplo 8

Análisis de la actividad ARN polimerasa dependiente de ADN

Se usó un ensayo basado en la transcripción no radiactiva (Método A) para medir la actividad de la T7 ARN polimerasa de tipo silvestre y las variantes obtenidas tal como se describe en el Ejemplo 3. La actividad enzimática se midió en 40 µl de tampón de reacción (Tris/HCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, NTP 1 mM (en cada uno), polidocanol al 0,002 % [v/v], espermidina 4 mM, pH 8,0, 1 µg de plásmido pSPT18 escindido (es decir linealizado) con Sspl). Se añadió una variante de la enzima polimerasa de T7 o una T7 de tipo silvestre en forma diluida. Después de la incubación a 37 °C durante 30 min se añadió EDTA (0,4 M, 4 µl) para detener la reacción.

Posteriormente, se mezcló cada mezcla de reacción (como una alícuota de 100 µl) con 100 µl de SYBR Green II (diluido 1:4.000) y se añadió un volumen de 1.890 µl de tampón TE 1x. Se midió la fluorescencia fotométricamente (longitud de onda de excitación: 485 nm, longitud de onda de emisión 530 nm) usando un fluorímetro (Cary Eclipse, Varian). Como una enzima de referencia, se usó la T7 ARN polimerasa comercialmente disponible (Roche Applied Science, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Como alternativa (Método B), se hizo la cuantificación del ARN usando un Ensayo de ARN Quant-iT (Invitrogen) en una plataforma Termocicladora LC480 (Roche Applied Science, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Como una referencia enzimática, se usó la T7 ARN polimerasa comercialmente disponible (Roche Applied Science, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Para ensayar la enzima T7 y las variantes de la misma en condiciones no reductoras, se hicieron análisis comparativos en los que en cada caso se incluyó el DTT en un primer experimento, y se omitió el DTT en un segundo experimento en la mezcla de reacción.

Después de la incubación tal como se describe en el Ejemplo 6, se ensayó también la actividad enzimática de las muestras que contenían los multímeros de proteína.

El apartado A de la Tabla 4 indica la actividad enzimática del polipéptido de T7 de tipo silvestre de la muestra representado en la Figura 1, línea 1 que muestra la presencia de dímeros y multímeros de orden más alto en un grado significativo. El apartado B de la tabla corresponde a la proteína de la línea 2 de la Figura 1. En tanto es evidente en el ensayo, la actividad enzimática es inferior en ausencia de cualquier agente reductor y aumenta después de la adición de DTT. Se obtiene un efecto comparable con otros agentes reductores con uno o más grupos tiol, tales como mercaptoetanol o DTE.

Tabla 4: actividad de la T7 ARN polimerasa de tipo silvestre en condiciones no reductoras y reductoras

	Organización del ensayo	fluorescencia (unidades arbitrarias)
A	agente no reductor	8,09
B	DTT 10 mM en la mezcla de reacción	12,43

Los datos muestran que la enzima tratada en condiciones no reductoras muestra una actividad significativamente reducida. Este efecto se correlaciona directamente con la presencia de dímeros de proteína y multímeros de orden más alto en la preparación enzimática.

Además, se determinó el efecto de la sustitución Cys-Ser en los polipéptidos de las variantes de T7; todos los ensayos se realizaron en presencia de DTT 10 mM. En cada ensayo la concentración de la respectiva polimerasa T7/variante de T7 fue de 6,7 µg/ml. La tabla 5 muestra los datos ejemplares de las actividades enzimáticas del

polipéptido de T7 de tipo silvestre y el mutante. Las asignaciones de T7 se hicieron de acuerdo con las que se dan en la Tabla 3 anterior.

Tabla 5: actividad de los polipéptidos de la T7 ARN polimerasa de tipo silvestre y de la variante de T7

polipéptido de T7	fluorescencia (unidades arbitrarias)
tipo silvestre, N° 1	46,4
variante de T7 N° 6	45,9
variante de T7 N° 8	49,2

Muy sorprendentemente, no se observó un impacto negativo con respecto a la actividad enzimática incluso cuando se acumularon seis sustituciones, es decir, Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser, Cys723Ser y Cys839Ser en el mismo polipéptido (variante de T7 N° 8, de acuerdo con la Tabla 3).

**Ejemplo 9**

Análisis de termoestabilidad: tiempo de semivida

Se hicieron sustituciones adicionales en el polipéptido de T7, con el fin de potenciar adicionalmente la estabilidad térmica del polipéptido. Las variantes de T7 de N° 37 a 48 se muestran en la Tabla 6 más adelante.

Para determinar la estabilidad de la polimerasa T7 de tipo silvestre y de las variantes de T7 se determinó el tiempo de semivida a 50 °C. Las muestras de la enzima de tipo silvestre y las variantes purificadas (véase los Ejemplos 3 y 4) se incubaron de tampón de almacenamiento (fosfato potásico 10 mM, KCl 200 mM, EDTA 0.1 mM, mercaptoetanol 30 mM, glicerol al 50 %, Tween 20 al 0,1 %, pH 7,9) a 50 °C. Se tomaron las muestras en distintos puntos temporales (10, 20 y 30 min) y se midió la actividad enzimática residual tal como se describe en el Ejemplo 3. El tiempo de semivida  $T_{1/2}$  expresado como un número de minutos [min] significa que en este punto temporal la actividad de la variante de T7 respectiva es el 50 % de la actividad en el punto temporal en el que comenzó el experimento, es decir, cuando se aplicó a la exposición a 50 °C. La Tabla 6 resume los resultados de las mediciones.

Tabla 6: Tiempos de semivida a 50 °C de la T7 ARN polimerasa de tipo silvestre y las variantes de T7 (mutaciones puntuales y mutaciones combinadas)

N°	Enzima T7	$T_{1/2}$ [min]	N°	Enzima T7	$T_{1/2}$ [min]
<i>Referencia</i>			<i>Dos sustituciones de aminoácidos</i>		
1	Tipo silvestre	6,0 - 9,7	44	Ala702Val Val795Ile	22,0
<i>Una sola sustitución de aminoácidos</i>			<i>Sustituciones de tres aminoácidos</i>		
37	Val426Leu	25,0	45	Val426Leu Ala702Val	39,0
38	Val426Ile	17,0	46	Val426Leu Val795Ile	40,0
39	Ser633Met	13,0			
40	Val650Leu	13,0	<i>Cuatro sustituciones de aminoácidos</i>		
41	Thr654Leu	13,0	47	Val426Leu Ala702Val Val795Ile	312,0
42	Ala702Val	22,0			
43	Val795Ile	29,0	48	Val426Leu Val650Leu Ala702Val Val795Ile	64,0

Con respecto a los tiempos de semivida a 50 °C, los inventores observaron varios efectos sorprendentes. En primer lugar, existían intercambios de un solo aminoácido sin ningún impacto notable en la termoestabilidad, es decir, mutaciones que no causaron una diferencia sustancial en comparación con la referencia de tipo silvestre (N° 1). En este primer grupo, se combinaron todas las variantes de T7 con un valor de  $T_{1/2}$  entre 5 y 12 (incluyendo 5 y 12) (no mostrado). En un segundo grupo de variantes de T7 (no mostrado), se descubrió que los mutantes tenían tiempos de semivida a 50 °C incluso más cortos, en comparación con la referencia de tipo silvestre. Adicionalmente, los mutantes que habían perdido su actividad enzimática completamente se combinaron en el segundo grupo. Se descubrió que un tercer grupo de mutaciones de intercambio de aminoácidos potenciaba el tiempo de semivida a

50 °C por encima de los valores encontrados con la referencia de tipo silvestre. Un valor mayor que 12 se consideró como un indicativo de un aumento sustancial en la termoestabilidad en la variante de T7 respectiva. El tercer grupo comprende las mutaciones de acuerdo con N° 37 a 48 tal como se muestra en la Tabla 6.

5 Sorprendentemente, algunas de las sustituciones de aminoácidos de las que, de acuerdo con las predicciones teóricas, se predijo que tenían un efecto positivo deseado en la termoestabilidad no condujeron a los resultados esperados.

10 Muy sorprendentemente, las sustituciones de aminoácidos que se muestran en la Tabla 6 pudieron combinarse con cualquiera de las seis sustituciones Cys-Ser descritas anteriormente, es decir, con Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser, Cys723Ser y Cys839Ser, en las que se obtuvieron los polipéptidos de las variantes de T7 con una actividad de ARN dependiente de ADN. Incluso más sorprendentemente, se descubrió que las variantes de T7 que combinaban (a) bien Cys723Ser o todas las seis sustituciones Cys-Ser anteriores con (b) una sola, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos tal como se muestra en la Tabla 6 eran más termoestables que el polipéptido de T7 de tipo silvestre. Combinando la termoestabilidad con una tendencia reducida a formar puentes disulfuro intramoleculares, las variantes de T7 N° 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 35 y 36 (de acuerdo con la Tabla 3) son particularmente ventajosas y mucho más preferentes.

#### 20 Ejemplo 10

Determinación de la concentración de proteínas en las soluciones

25 Las concentraciones de proteínas se determinaron midiendo la densidad óptica a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar de  $E_{280\text{ nm}} = 1,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  tal como se describe (He, B., *et al.*, *Protein Expr Purif* 9 (1997) 142-151).

#### LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> F. Hoffmann-LaRoche AG, Basilea (CH)  
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (DE)

<120> Variantes de T7 ARN polimerasa con sustituciones de Cisteína-Serina

35 <130> 27368 FT

<150> EP11160799

<151> 01-04-2011

40 <160> 76

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2655

45 <212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> misc\_feature

50 <222> (1)..(2655)

<223> Secuencia de ADN que codifica la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN de tipo silvestre, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 1 en la Tabla 3

<400> 1

55

ES 2 538 694 T3

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg	60
ttcaacactc tggctgacca ttacggtgag cgtttagctc gogaacagtt ggccttgag	120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa	180
gctggtgagg ttgcggataa cgctgccgcc aagcctctca tcactaccct actccctaag	240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaaag ctaagcgcg caagcgcccg	300
acagccttcc agttcctgca agaaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag	360
accactctgg cttgcctaac cagtgctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca	420
atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgaect tgaagctaag	480
cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa	540
gcatttatgc aagtgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg	600
tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc	660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac	720
tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcaggtgcg	780
ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagtcc ctcttaagcc gtggactggc	840
attactggtg gtggctattg ggctaacggt cgctcgtctc tggcgctggt gcgtactca	900
agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt	960
aacattgcgc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg cgccaacgta	1020
atcaccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc	1080

ES 2 538 694 T3

ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtcgtgttta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggtc aggaaggtta ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaactg tgcgggtgct gataaggctc cgttccctga ggcgatcaag 1440  
 ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500  
 tgggtggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgcgt tctgctttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgtttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680  
 ttgcttcccta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aatctctga gaaagtcaag ctgggcaacta aggcactggc tggtaaatgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920  
 tccaaagagt tcggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040  
 atttggaat ctgtgagcgt gacggtggtc gctgcggtg aagcaatgaa ctggcttaag 2100  
 tctgctgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttccg 2160  
 aagcgttgcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220  
 aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttctcggctc agttccgctt acagcctacc 2280  
 attaacacca acaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgtcctc 2340  
 aactttgtac acagccaaga cggtagccac ctctgtaaga ctgtagtgtg ggcacacgag 2400  
 aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt caccactcct tcggtagcat tccggctgac 2460  
 gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggtg acacatatga gtcttgtgat 2520  
 gtactggctg atttctacga ccagttcgtc gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580  
 atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatctttaga gtcggacttc 2640  
 gcgttcgcgt aataa 2655

<210> 2  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> *Escherichia coli*

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)

<223> T7 ARN polimerasa dependiente de ADN de tipo silvestre, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a Nº 1 en la Tabla 3

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

Ala Phe Ala

<210> 3  
<211> 2655  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Polinucleótido codificante sintético

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2655)

15 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys125Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 2 en la Tabla 3

<400> 3

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgetatcccg      60
ttcaacactc tggetgacca ttacggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggcccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa      180
gctggtgagg ttgCGgataa cgctgCGgCC aagcctctca tCactaccct actcCctaa      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcGcgG caagcGcccc      300
acagccttcc agttctcGca agaaatcaag cCGgaagcCG tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg ctagcctaac cagtGctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcGca      420
    
```

atcggtcggg ccattgagga cgaggctegc ttcggtcgta tcegtgacct tgaagctaag 480  
 cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa 540  
 gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg 600  
 tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc 660  
 attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac 720  
 tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcagggtcg 780  
 ctggctgcea tctctccgat gttecaacct tgogtagtte ctectaagcc gtggactggc 840  
 attactggtg gtggctattg ggctaacggt cgtcgtcctc tggcgctggt gcgtactcac 900  
 agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgagggtga caaagcgatt 960  
 aacattgccc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcttagcggg cgccaacgta 1020  
 ataccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagtte 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtcgtgttta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggta aggaaggtta ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag 1440  
 ttattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgccgta agtctccact ggagaacact 1500  
 tggtaggctg agcaagatte tccgttctgc ttcttgcgt tctgcttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc accgcctgag ctataactgc tccctccgc tggcgttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatcc agcaactctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680  
 ttgcttcta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcaactgg tggtaaatgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgt ggttacggg 1920  
 tccaaagagt tcggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040  
 atttggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggtt gagcaatgaa ctggcttaag 2100  
 tctgctgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc 2160  
 aagcgttgcg ctgtgcattg ggtaaactct gatggttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220  
 aagcctatc agacgcgctt gaacctgatg ttctcggtc agttccgctt acagcctacc 2280  
 attaacacca acaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgtctct 2340  
 aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgtaga ctgtagtgtg ggcacacgag 2400

```

aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cacgactcct tcggtacat tccggtgac      2460
gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtcttgtgat      2520
gtactggctg atttctacga ccagttcgcg gaccagttgc acgagtctca attggacaaa      2580
atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc      2640
gcgttcgcgt aataa                                                              2655

```

<210> 4  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)

<223> Variante Cys125Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 2 en la Tabla 3

<400> 4

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

				660						665						670
Ala	Ala	Gly	Tyr	Met	Ala	Lys	Leu	Ile	Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Val	Thr	
		675					680					685				
Val	Val	Ala	Ala	Val	Glu	Ala	Met	Asn	Trp	Leu	Lys	Ser	Ala	Ala	Lys	
	690					695					700					
Leu	Leu	Ala	Ala	Glu	Val	Lys	Asp	Lys	Lys	Thr	Gly	Glu	Ile	Leu	Arg	
705					710					715					720	
Lys	Arg	Cys	Ala	Val	His	Trp	Val	Thr	Pro	Asp	Gly	Phe	Pro	Val	Trp	
				725					730					735		
Gln	Glu	Tyr	Lys	Lys	Pro	Ile	Gln	Thr	Arg	Leu	Asn	Leu	Met	Phe	Leu	
			740					745					750			
Gly	Gln	Phe	Arg	Leu	Gln	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Asn	Lys	Asp	Ser	Glu	
		755					760					765				
Ile	Asp	Ala	His	Lys	Gln	Glu	Ser	Gly	Ile	Ala	Pro	Asn	Phe	Val	His	
	770					775					780					
Ser	Gln	Asp	Gly	Ser	His	Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Val	Trp	Ala	His	Glu	
785					790					795					800	
Lys	Tyr	Gly	Ile	Glu	Ser	Phe	Ala	Leu	Ile	His	Asp	Ser	Phe	Gly	Thr	
				805					810					815		
Ile	Pro	Ala	Asp	Ala	Ala	Asn	Leu	Phe	Lys	Ala	Val	Arg	Glu	Thr	Met	
			820					825					830			
Val	Asp	Thr	Tyr	Glu	Ser	Cys	Asp	Val	Leu	Ala	Asp	Phe	Tyr	Asp	Gln	
		835					840					845				
Phe	Ala	Asp	Gln	Leu	His	Glu	Ser	Gln	Leu	Asp	Lys	Met	Pro	Ala	Leu	
	850					855					860					
Pro	Ala	Lys	Gly	Asn	Leu	Asn	Leu	Arg	Asp	Ile	Leu	Glu	Ser	Asp	Phe	
865					870					875					880	
Ala	Phe	Ala														

<210> 5  
 <211> 2655  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polinucleótido codificante sintético

5 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2655)  
<223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys347Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a Nº 3 en la Tabla 3

10 <400> 5

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccc      60
ttcaacactc tggctgacca ttacgggtgag cgttttagctc gcgaacagtt ggcccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaaa      180
gctgggtgagg ttgctgataa cgctgccgcc aagcctctca tcactaccct actccctaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaaag ctaagcgcg caagcgcccc      300
acagccttcc agttcctgca agaaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg cttgcctaac cagtgctgac aatacaaccg ttcaggetgt agcaagcgca      420
atcggctcggg ccattgagga cgaggctcgc ttccggtcgt tccgtgacct tgaagctaag      480
cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg      600
tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccocg tgcaggtgcg      780
ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctectaagcc gtggactggc      840
attactggtg gtggctattg ggctaaccgt cgtcgtcctc tggcgtggt gcgtactcac      900
agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt      960
aacattgcgc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg cgccaacgta     1020
atcaccaagt ggaagcatag cccggctcag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc     1080
cogatgaaac cggaaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct     1140
gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc     1200
atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg     1260
gactggcgcg gtcgtgttta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc     1320
aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggtg aggaaggtta ctactggctg     1380
aaaatccacg gtgcaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttcctga gcgcatcaag     1440
ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact     1500
tgggtgggctg agcaagatc tccgttctgc ttccttgcgt tctgcttga gtacgctggg     1560
gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tccctccgc tggcgttga cgggtcttgc     1620

```

```

tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcgggtaac      1680
ttgcttccta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag      1740
attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag      1800
aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcaactggc tggtaaatgg      1860
ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcggtcag tcatgacgct ggcttacggg      1920
tccaaagagt tcggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat      1980
tccggcaagg gtctgatggt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg      2040
atitgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag      2100
tctgctgeta agctgctggc tgetgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc      2160
aagcgttgcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag      2220
aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggtc agttccgctt acagcctacc      2280
attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgctcct      2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgtaaga ctgtagtggtg ggcacacgag      2400
aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt caccactcct tcggtagcat tccggctgac      2460
gctgccaacc tgttcaaagc agtgccgcaa actatggttg acacatatga gtcttgatg      2520
gtactggctg atttctacga ccagttcgtc gaccagttgc acgagctcga attggacaaa      2580
atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc      2640
gcgttcgcgt aataa

```

5 <210> 6  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)

15 <223> Variante Cys347Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 3 en la Tabla 3

<400> 6

```

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

```

```

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

```

```

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

	820		825		830
	Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys	Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln			
	835	840	845		
	Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu				
	850	855	860		
	Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe				
	865	870	875	880	
	Ala Phe Ala				

- 5 <210> 7
- <211> 2655
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Polinucleótido codificante sintético
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1)..(2655)
- 15 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys492Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 4 en la Tabla 3
- <400> 7

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg      60
ttcaacactc tggctgacca ttacggtgag cgtttagetc gcgaacagtt ggcccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaaa      180
gctggtgagg ttgcgataa cgctgccgcc aagcctctca tcaactacct actccctaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcgcgg caagcgcccg      300
acagccttcc agttcctgca agaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg cttgctaac cagtgtgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca      420
atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag      480
cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg      600
tggttctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcaggtgcg      780
ctggttgcca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctctaagcc gtggactggc      840
attactggtg gtggctattg ggctaacggt cgtcgtcctc tggcgctggt gcgtactcac      900

```

agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt 960  
 aacattgocg aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tectagcggg cgccaacgta 1020  
 atcaccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtget 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtctgtttaa cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggta aggaaggta ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag 1440  
 ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gctagcgtca agtctccact ggagaacact 1500  
 tgggtgggctg agcaagatte tccgttctgc ttcttgcgt tctgctttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgtttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatcc agcaettctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680  
 ttgettccca gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactggc tggatcaatgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920  
 tccaaagagt tccgcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040  
 atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag 2100  
 tctgctgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc 2160  
 aagcgttcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220  
 aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttctcggctc agttccgctt acagcctacc 2280  
 attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgcctct 2340  
 aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgtaaga ctgtagtgtg ggacacgag 2400  
 aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cagcactcct tccgtaccat tccggctgac 2460  
 gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtcttgtgat 2520  
 gtactggctg atttctacga ccagttcgtc gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580  
 atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctcgtg acatcttaga gtcggacttc 2640  
 gcgttcgctg aataa 2655

<210> 8  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(883)

<223> Variante Cys492Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 4 en la Tabla 3

5

<400> 8

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Phe Ala

<210> 9  
 <211> 2655  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> Polinucleótido codificante sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2655)  
 15 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys515Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 5 en la Tabla 3

<400> 9

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg 60

ttcaacactc tggctgacca ttacggtgag cgttttagctc gcgaacagtt ggccttgag 120

catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc tcccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaaa 180  
 gctggtgagg ttgcgataa cgctgccgcc aagcctetca tcaactaccct actccctaag 240  
 atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcgcgg caagcgcccg 300  
 acagccttcc agttcctgca agaaatcaag cgggaagccg tagcgtacat caccattaag 360  
 accactctgg cttgectaac cagtgtgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca 420  
 atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag 480  
 cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa 540  
 gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg 600  
 tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc 660  
 attgagtaa ccggaatggt tagcttacac cgcctaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac 720  
 tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcagggtgcg 780  
 ctggctggca tctctccgat gttccaaact tgcgtagttc ctcttaagcc gtggactggc 840  
 attactggtg gtggctattg ggctaaccgt cgtcgtcctc tggcgctggt gcgtactcac 900  
 agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtga caaagcgatt 960  
 aacattgctc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tctagcgggt cgccaacgta 1020  
 atcaccaagt ggaagcattg tccggctcgg gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaaac cgggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtcgtgttca cgctgtgta atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggta aggaaggta ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcacaaag 1440  
 ttcatgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500  
 tggtyggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgcgt tcagcttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc accgectgag ctataactgc tcccttccgc tggcgtttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680  
 ttgcttcta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactggc tggccaatgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920  
 tccaaagagt tcggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040  
 atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag 2100

```

tctgctgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc      2160
aagcgttgcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag      2220
aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttctctgggtc agttccgctt acagcctacc      2280
attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgctcct      2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac ctctcgtaaga ctgtagtgtg ggcacacgag      2400
aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cacgactcct tcggtacatc tccggctgac      2460
gtgcggaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtcttctgat      2520
gtactggctg atttctaaga ccagttcgcct gaccagttgc acgagtctca attggacaaa      2580
atgccagcac ttcgggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc      2640
gcgttcgcgt aataa                                          2655

```

<210> 10

<211> 883

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante polipeptídica sintética

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(883)

<223> Variante Cys515Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 5 en la Tabla 3

<400> 10

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu

```



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11  
 <211> 2655  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Polinucleótido codificante sintético

10

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2655)  
 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 6 en la Tabla 3

15

<400> 11

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg      60
ttcaacactc tggctgacca ttacgggtgag cgtttagetc gegaacagtt ggccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa      180
gctggtgagg ttgctgataa cgctgccgcc aagcctctca tcaactacct actccctaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcgcgg caagcgcccg      300
acagccttcc agttcctgca agaaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg cttgcctaac cagtgctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca      420
atcggctcgg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag      480
cacttcaaga aaaacggtga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg      600
tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
tctgagacta togaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcaggtgcg      780
ctggetggca tctctcogat gttccaacct tgcgtagttc ctctaagcc gtggactggc      840
attactggtg gtggctattg ggctaaccgt cgtcgtcctc tggcgctggt gcgtactcac      900
agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt      960
aacattgcgc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tctagcgggt cgccaacgta     1020
atcaccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc     1080
ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct     1140
gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc     1200
atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg     1260
gactggcgcg gtcgtgttta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc     1320
  
```

ES 2 538 694 T3

```

aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggta aggaaggta ctactggctg 1380
aaaatccacg gtgcaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga ggcacatcaag 1440
ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500
tggtgggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgcgt tctgctttga gtacgctggg 1560
gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttcgcg tggcgtttga cgggtettgc 1620
tctggcatcc agcaettctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680
ttgcttecta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740
attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800
aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactggc tggccaatgg 1860
ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920
tccaaagagt tcggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980
tccggcaagg gtctgatggt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040
atitgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag 2100
tctgctgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc 2160
aagcgtagcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220
aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggtc agttccgctt acagcctacc 2280
attaacacca acaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tategctcct 2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgtaaga ctgtagtgtg ggcacacgag 2400
aagtacggaa tcgaatcttt tgcaactgatt cacgactcct tcggtaccat tccggctgac 2460
gctgcgaacc tgttcaaagc agtgccgcaa actatggttg acacatatga gtcttgtgat 2520
gtactggctg atttctacga ccagttcgcg gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580
atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctcogtg acatcttaga gtcggacttc 2640
gcgttcgctg aataa 2655

```

- 5 <210> 12
- <211> 883
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> Variante polipeptídica sintética
  
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(883)
- 15 <223> Variante Cys723Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 6 en la Tabla 3
  
- <400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Ala Phe Ala**

<210> 13  
 <211> 2655  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido codificante sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2655)

<223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys839Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 7 en la Tabla 3

<400> 13

**atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg 60**  
**ttcaacactc tggctgacca ttacggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggccttgag 120**  
**catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa 180**  
**gctggtgagg ttgCGgataa cgctgCGcc aagcctctca tcaactacct actccctaag 240**  
**atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcgcgg caagcgcgccg 300**  
**acagccttcc agttcctgca agaatcaag cCGgaagccg tagcgtacat caccattaag 360**  
**accactctgg cttgCctaac cagtgctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca 420**  
**atcggtcggg ccattgagga cgaggtcgc ttCGgtcgta tCGtgacct tgaagctaag 480**  
**cacttcaaga aaaacgTtga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa 540**  
**gcatttatgc aagTtgcga ggetgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg 600**

tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc 660  
 attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac 720  
 tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaacccg tgcaggtgcg 780  
 ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctccctaagcc gtggactggc 840  
 attactggtg gtggctattg ggctaacggt cgtcgtcctc tggcgctggt gcgtactcac 900  
 agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt 960  
 aacattgcbc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tccatagcggc cgccaacgta 1020  
 atcaccaagt ggaagcattg tccggctcag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaaac ccggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtcgtgttta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaa ccaatcggta aggaaggtaa ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaactg tgcgggtgct gataaggctc cgttccctga gcgcatcaag 1440  
 ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500  
 tggtagggctg agcaagatc tccgttctgc ttccttgct tctgcttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc accgctgag ctataactgc tccctccgc tggcgtttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680  
 ttgcttcta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attetacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggcg aatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactggc tggccaatgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgtttag tcatgacgct ggttacggg 1920  
 tccaaagagt tcggttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggtg ctggatacat ggctaagctg 2040  
 atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggtg aagcaatgaa ctggcttaag 2100  
 tctgctgcta agctgctggc tgetgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttccg 2160  
 aagcgttgcg ctgtgcattg gtaactcct gatggttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220  
 aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttctcggctc agttccgctt acagcctacc 2280  
 attaacacca acaaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tategctcct 2340  
 aactttgtac acagccaaga cggtagccac ctccgtaaga ctgtagtgtg ggcacacgag 2400  
 aagtacggaa tcgaatcttt tgcaactgatt cacgactcct tcggtaacct tccggctgac 2460  
 gctgccaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtctagcgat 2520  
 gtactggctg atttctacga ccagttcgtc gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580  
 atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtccgacttc 2640  
 gcgttcgctg aataa 2655

ES 2 538 694 T3

<210> 14  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

10

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)  
 <223> Variante Cys839Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 7 en la Tabla 3

15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His  
 165 170 175  
 Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser  
 180 185 190  
 Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp  
 195 200 205  
 Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr  
 210 215 220  
 Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp  
 225 230 235 240  
 Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr  
 245 250 255  
 Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val  
 260 265 270  
 Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala  
 275 280 285  
 Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala  
 290 295 300  
 Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala  
 325 330 335  
 Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile  
 340 345 350  
 Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp  
 355 360 365  
 Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Ala Val  
 370 375 380  
 Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe  
 385 390 395 400  
 Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe  
 405 410 415  
 Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe



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

<210> 15  
 <211> 2655  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido codificante sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2655)

ES 2 538 694 T3

<223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser, Cys723Ser, Cys839Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 8 en la Tabla 3

5

<400> 15

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccc      60
ttcaacactc tggetgacca ttacggtgag cgtttagctc gogaacagtt ggcccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa      180
gctggtgagg ttgeggataa cgctgccgcc aagcctctca tcactaccct actccctaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcgcg caagcgcccg      300
acagccttcc agttcctgca agaaatcaag cgggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg ctagcctaac cagtgctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca      420
atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag      480
cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg      600
tggtcttcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcaggtgcg      780
ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctccctaagcc gtggactggc      840
attactggtg gtggctattg ggctaaccgt cgtcgtcctc tggcgtggt gcgtactcac      900
agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt      960
aacattgctc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg cgccaacgta      1020
atcaccaagt ggaagcatag cccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc      1080
ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct      1140
gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc      1200
atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg      1260
gactggcgcg gtcgtgttta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc      1320
aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaa ccaatcggta aggaaggta ctactggctg      1380
aaaatccacg gtgcaaactg tgggggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag      1440
ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gctagcgcta agtctccact ggagaacact      1500
tggtgggctg agcaagatc tccgttctgc ttccttgogt tcagcttga gtacgtggg      1560
gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgttga cgggtcttgc      1620
tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac      1680
ttgcttcta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag      1740

```

ES 2 538 694 T3

**attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800**  
**aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcaactggc tggccaatgg 1860**  
**ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920**  
**tccaaagagt tccggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980**  
**tccggcaagg gtctgatggt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040**  
**atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag 2100**  
**tctgctgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc 2160**  
**aagcgtagcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220**  
**aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttctcggtc agttccgctt acagcctacc 2280**  
**attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgctcct 2340**  
**aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgtgaaga ctgtagtgtg ggcacacgag 2400**  
**aagtaocggaa tcgaatcttt tgcaactgatt caccactcct tcggtacat tccggctgac 2460**  
**gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtctagcgat 2520**  
**gtactggctg atttctacga ccagttcgcct gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580**  
**atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatctttaga gtcggacttc 2640**  
**gcgttcgcgt aataa 2655**

- 5 <210> 16
- <211> 883
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Variante polipeptídica sintética
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(883)
- 15 <223> Variante Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser, Cys723Ser, Cys839Ser de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 8 en la Tabla 3
- <400> 16



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Asp Thr Tyr Glu Ser Ser Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln

835
840
845

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

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

**Ala Phe Ala**

- 5 <210> 17
- <211> 2655
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> Polinucleótido codificante sintético
  
- 15 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1)..(2655)
- <223> Secuencia de ADN que codifica la variante ARN Val426Leu polimerasa de T7 dependiente de ADN de tipo silvestre, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 9 en la Tabla 3

<400> 17

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgetatcccc      60
ttcaacactc tggctgacca ttacgggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggcccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa      180
getggtgagg ttgctgataa cgetgcccgc aagcctctca tcactaccct actccctaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaaag ctaagcgcgg caagcgcgg      300
acagccttcc agttcctgca agaaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg cttgcctaac cagtgctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca      420
atcggctcgg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag      480
cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg      600
tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccog tgcagggtgcg      780
ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagtte ctctaagcc gtggactggc      840
attactggtg gtggctattg ggctaacggt cgtcgtcctc tggcgtggt gcgtactcac      900
agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt      960
aacattgcgc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg cgccaacgta     1020
    
```

20

ES 2 538 694 T3

atcaccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaaac cggaaagacat cgacatgaat cctgaggtct tcaccgcgtg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgetaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtcgtctgta cgtgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggtg aggaaggtta ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag 1440  
 ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500  
 tgggtgggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgcgt tctgctttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgtttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatcc agcaacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680  
 ttgcttecta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactgggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggacta aggcactggc tggccaatgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920  
 tccaaagagt tcggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatggt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040  
 atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag 2100  
 tctgctgcta agctgctggc tgcctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc 2160  
 aagcgttgcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220  
 aagcctatc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggtc agttccgctt acagcctacc 2280  
 attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgctcct 2340  
 aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgttaaga ctgtagtgtg ggcaacagag 2400  
 aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cacgactcct tcggtaccat tccggctgac 2460  
 gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacstatga gtcttgtgat 2520  
 gtactggctg atttctacga ccagttcgct gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580  
 atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc 2640  
 gcgttcgctg aataa 2655

- 5 <210> 18  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética
- 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)  
 <223> Variante Val426Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 9 en la Tabla 3

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro  
 485 490 495  
 Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu  
 500 505 510  
 Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr  
 515 520 525  
 Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln  
 530 535 540  
 His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn  
 545 550 555 560  
 Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys  
 565 570 575  
 Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn  
 580 585 590  
 Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys  
 595 600 605  
 Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly  
 610 615 620  
 Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly  
 625 630 635 640  
 Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln  
 645 650 655  
 Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln  
 660 665 670  
 Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr  
 675 680 685  
 Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys  
 690 695 700  
 Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg  
 705 710 715 720  
 Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp  
 725 730 735

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Phe Ala

<210> 19  
<211> 2655  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Polinucleótido codificante sintético

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2655)

15 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Val426Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 10 en la Tabla 3

<400> 19

```
atgaacacga ttaacatcgc tsagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctateccg      60
ttcaacactc tggctgacca ttacggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcaocg ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa      180
gctggtgagg ttgcggataa cgctgcccgc aagcctctca tcactaccct actecctaag      240
```

20

atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcgcgg caagcgcgg 300  
 acagccttcc agttectgca agaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag 360  
 accactctgg cttgcctaac cagtgtgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca 420  
 atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag 480  
 cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa 540  
 gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg 600  
 tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc 660  
 attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac 720  
 tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggeta tcgcaaccgg tgcagggtcg 780  
 ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctcttaagcc gtggactggc 840  
 attactggtg gtggctattg ggctaaccgt cgtcgtcctc tggcgtggt gcgtactcac 900  
 agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt 960  
 aacattgccc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg cgccaacgta 1020  
 atcaccaagt ggaagcattg tccggctcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaaac ccgaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtcgtctgta cgtctgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggta aggaaggtta ctactggctg 1380  
 aaaatccaag gtgcaaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag 1440  
 ttattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgta agtctccact ggagaacact 1500  
 tggtaggctg agcaagatc tccgttctgc ttecttgggt tctgcttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc accgcctgag ctataactgc tccctccgc tggcgttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatcc agcaactctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680  
 ttgcttcta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactggc tggccaatgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920  
 tccaaagagt tcggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040  
 atttggaat ctgtgagcgt gacgggtgta gctgcggtg aagcaatgaa ctggcttaag 2100  
 tctgctgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttccg 2160  
 aagcgtagcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220

```

aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggtc agttccgctt acagcctacc      2280
attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tategctcct      2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgttaaga ctgtagtggtg ggcacacgag      2400
aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cagcactcct tcggtacat tccggtgac      2460
getgcgaacc tgttcaaagc agtgccgcaa actatggttg acacatatga gtcttgatg      2520
gtactggctg atttctacga ccagttcgct gaccagttgc acgagtctca attggacaaa      2580
atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc      2640
gcgttcgctg aataa

```

- <210> 20
- <211> 883
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Variante polipeptídica sintética
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(883)
- 15 <223> Variante Cys723Ser, Val426Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 10 en la Tabla 3
- <400> 20

```

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

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

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

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

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

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

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

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser

```

115	120	125																												
Ala	Asp	Asn	Thr	Thr	Val	Gln	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Ile	Gly	Arg	Ala															
130						135						140																		
Ile	Glu	Asp	Glu	Ala	Arg	Phe	Gly	Arg	Ile	Arg	Asp	Leu	Glu	Ala	Lys															
145						150						155																		
His	Phe	Lys	Lys	Asn	Val	Glu	Glu	Gln	Leu	Asn	Lys	Arg	Val	Gly	His															
												165						170												
Val	Tyr	Lys	Lys	Ala	Phe	Met	Gln	Val	Val	Glu	Ala	Asp	Met	Leu	Ser															
												180						185												
Lys	Gly	Leu	Leu	Gly	Gly	Glu	Ala	Trp	Ser	Ser	Trp	His	Lys	Glu	Asp															
												195						200												
Ser	Ile	His	Val	Gly	Val	Arg	Cys	Ile	Glu	Met	Leu	Ile	Glu	Ser	Thr															
												210						215												
Gly	Met	Val	Ser	Leu	His	Arg	Gln	Asn	Ala	Gly	Val	Val	Gly	Gln	Asp															
												225						230												
Ser	Glu	Thr	Ile	Glu	Leu	Ala	Pro	Glu	Tyr	Ala	Glu	Ala	Ile	Ala	Thr															
												245						250												
Arg	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Gly	Ile	Ser	Pro	Met	Phe	Gln	Pro	Cys	Val															
												260						265												
Val	Pro	Pro	Lys	Pro	Trp	Thr	Gly	Ile	Thr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Trp	Ala															
												275						280												
Asn	Gly	Arg	Arg	Pro	Leu	Ala	Leu	Val	Arg	Thr	His	Ser	Lys	Lys	Ala															
												290						295												
Leu	Met	Arg	Tyr	Glu	Asp	Val	Tyr	Met	Pro	Glu	Val	Tyr	Lys	Ala	Ile															
												305						310												
Asn	Ile	Ala	Gln	Asn	Thr	Ala	Trp	Lys	Ile	Asn	Lys	Lys	Val	Leu	Ala															
												325						330												
Val	Ala	Asn	Val	Ile	Thr	Lys	Trp	Lys	His	Cys	Pro	Val	Glu	Asp	Ile															
												340						345												
Pro	Ala	Ile	Glu	Arg	Glu	Glu	Leu	Pro	Met	Lys	Pro	Glu	Asp	Ile	Asp															
												355						360												
Met	Asn	Pro	Glu	Ala	Leu	Thr	Ala	Trp	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Ala	Val															
												370						375												
																	380													

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Phe Ala

<210> 1  
<211> 2655

ES 2 538 694 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<223> Polinucleótido codificante sintético

10 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2655)  
<223> Secuencia de ADN que codifica la variante Val426Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 11 en la Tabla 3

<400> 21

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccc      60
ttcaacactc tggctgacca ttacggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggcacctgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa      180
gctggtgagg ttgctgataa cgctgccgcc aagcctctca tcactaccct actccctaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaaag ctaagcggc caagcgcccc      300
acagccttcc agttcctgca agaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg cttgcctaac cagtgtgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca      420
atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag      480
cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg      600
tggtcttcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgc tgcagggtgc      780
ctggetggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagtte ctccctaagcc gtggactggc      840
attactggtg gtggctattg ggctaaccgt cgtcgtcctc tggcgctggt gcgtactcac      900
agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt      960
aacattgcgc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg cgccaacgta     1020
atcaccaagt ggaagcattg tcoggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc     1080
cogatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggetc tcaccgogtg gaaacgtgct     1140
gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagctc gccgtatcag ccttgagttc     1200
atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg     1260
gactggcgcg gtcgtatcta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc     1320
aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggtg aggaaggtta ctactggetg     1380
aaaatccacg gtgcaaacctg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga ggcgatcaag     1440

```

15

```

ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact      1500
tgggtgggctg agcaagattc tccgttotgc ttccttgcgt tctgcttga gtacgctggg      1560
gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgttga cgggtcttgc      1620
tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac      1680
ttgcttcccta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag      1740
attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag      1800
aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactggc tggccaatgg      1860
ctggottacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg      1920
tccaagaggt tcggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat      1980
tccggcaagg gtctgatggt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg      2040
atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggottaag      2100
tctgctgota agctgctggc tgetgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc      2160
aagcgttgcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggttcc ctgtgtggca ggaatacaag      2220
aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggtc agttccgctt acagcctacc      2280
attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgctcct      2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgtaaga ctgtagtgty ggcacacgag      2400
aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cagcactcct tcggtaacct tccggctgac      2460
gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtcttgtgat      2520
gtactggetg atttctacga ccagttcgtc gaccagttgc acgagtctca attggacaaa      2580
atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc      2640
gcgttcgctg aataa

```

- 5 <210> 22
- <211> 883
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Variante polipeptídica sintética
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(883)
- 15 <223> Variante Val426Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 11 en la Tabla 3
- <400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala

275		280		285
Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala 290		295		300
Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile 305		310		315
Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala 325				330
Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile 340				345
Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp 355				360
Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Ala Val 370				375
Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe 385				390
Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe 405				410
Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Ile Tyr Ala Val Ser Met Phe 420				425
Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys 435				440
Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly 450				455
Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys 465				470
Phe Ile Glu Gln Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro 485				490
Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu 500				505
Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr 515				520
Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln 530				535
				540

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

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

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

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

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

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

Ala Phe Ala

<210> 23  
 <211> 2655  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido codificante sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2655)

<223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Val426Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 12 en la Tabla 3

<400> 23

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg      60
ttcaacactc tggctgacca ttacggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggcccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaaa      180
gctggtgagg ttgCGgataa cgctgCCgCC aagcctctca tcaactaccct actccetaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtгааag ctaagcgcgg caagcgcCCg      300
acagccttcc agttcctgca agaaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg cttgectaac cagtgctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca      420
atcggteggy ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag      480
cacttcaaga aaaacgTTga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggegagggc      600
tggtcttcgt ggcstaagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
    
```

tctgagacta tCGaactcgc acctgaatac gctgaggcta tCGcaaccCG tgcaggTgcg 780  
ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagtTc ctCctaagcc gtggactggc 840  
attactggTg gtggctattg ggctaaccggT cgtcgtcctc tggcgtggtt gegtactcac 900  
agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggTgta caaagcgatt 960  
aacattgcgc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tCctagcggT cGCCaacgta 1020  
atcaccaagt ggaagcattg tccggTcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
ccgatgaaac cggaaagacat cgacatgaat cctgaggTc taccgcgTg gaaacgtgct 1140  
gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagTtC 1200  
atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
gactggcgcg gtcgtatcta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggta aggaaggTta ctactggctg 1380  
aaaatccacg gtgcaaaactg tgcgggtgTc gataaggTtC cgTtccctga ggcgatcaag 1440  
ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500  
tggtgggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgctt tctgctttga gtacgctggg 1560  
gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tccctccgc tggcgtttga cgggtcttgc 1620  
tctggcatcc agcacttctc cgcgatgTc cgagatgagg taggtggTcg cgcggTtaac 1680  
ttgcttCcta gtgaaaccgt tCaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
aacactggTg aatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactggc tggTcaatgg 1860  
ctggcttacg gtgttaactg cagtgtgact aagcgttCag tcatgacgct ggettacggg 1920  
tccaaagagt tCggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040  
atTtgggaat ctgtgagcgt gacggTgTta gctgcggTtG aagcaatgaa ctggcttaag 2100  
tctgctgcta agctgctggc tgctgaggTc aaagataaga agactggaga gattcttCgc 2160  
aagcgtagcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggTtTcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220  
aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggTc agTtccgctt acagcctacc 2280  
attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgtcct 2340  
aactttgtac acagccaaga cggtagccac ctctgtaaga ctgtagtgtg ggcacacgag 2400  
aagtacggaa tCGaatcttt tgcactgatt cacgactcct tCggTaccat tccggctgac 2460  
gctgcgaacc tgttcaaaagc agTgcgcgaa actatggttG acacatatga gtcttTgat 2520  
gtactggctg atttctacga ccagTtCgct gaccagTtgc acgagtctca attggacaaa 2580  
atgccagcac tccggctaa aggtaactTg aacctcggTg acatcttaga gtcggacttC 2640  
gcgttCgct aataa 2655

<210> 24  
<211> 883

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)  
 <223> Variante Cys723Ser, Val426Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 12 en la Tabla 3

<400> 24

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

15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Phe Ala

<210> 25

<211> 2655

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido codificante sintético

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(2655)

<223> Secuencia de ADN que codifica la variante Val426Phe de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a Nº 13 en la Tabla 3

<400> 25

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccc 60  
 ttcaaacactc tggctgacca ttacggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggcccttgag 120  
 catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaaa 180  
 gctggtgagg ttgctgataa cgctgccgcc aagcctctca tcaactaccct actccctaag 240  
 atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcgcgg caagcgcccc 300  
 acagccttcc agttcctgca agaaatcaag ccggaagcgg tagcgtacat caccattaag 360  
 accactctgg cttgctaacc cagtgtctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca 420  
 atcggctcggg ccattgagga cgaggctcgc ttccggtcgt tccgtgacct tgaagctaag 480  
 cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa 540  
 gcatttatgc aagtgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg 600  
 tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc 660  
 attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac 720  
 tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcaggtgcg 780  
 ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagtcc ctccctaagcc gtggactggc 840  
 attactggtg gtggctattg ggctaaccgt cgtcgtctcc tggcgctggt gcgtactcac 900  
 agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt 960  
 aacattgcgc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg cgccaacgta 1020  
 atcaccaagt ggaagcattg tccggtcagag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaaac cgggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgettgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtcgtttcta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggtg aggaaggtta ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag 1440  
 ttcatgaggg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500  
 tggtagggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgcgt tctgctttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgtttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680  
 ttgettcceta gtgaaaocgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactggc tggtaaatgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggettacggg 1920

ES 2 538 694 T3

```

tccaaagagt tcggttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat      1980
tccggcaagg gtctgatggt cactcagccg aatcaggetg ctggatacat ggctaagctg      2040
atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggta gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag      2100
tctgctgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc      2160
aagcgttgcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag      2220
aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggtc agttccgctt acagcctacc      2280
attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaac aggagtctgg tctcgtcct      2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgtgaaga ctgtagtgtg ggcacacgag      2400
aagtacggaa tcgaatcttt tgcaactgatt cacgactcct tcggtaccat tccggctgac      2460
gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtcttctgat      2520
gtaactggctg atttctacga ccagttcgtt gaccagttgc acgagtctca attggacaaa      2580
atgccagcac ttcggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggaactc      2640
gcgttcgctg aataa                                          2655

```

5 <210> 26  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)  
 <223> Variante Val426Phe de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 13 en la Tabla 3

<400> 26

```

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

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

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

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

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys

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

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

**Ala Phe Ala**

- 5 <210> 27
- <211> 2655
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> Polinucleótido codificante sintético
  
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1)..(2655)
- 15 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Val426Phe de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 14 en la Tabla 3
  
- <400> 27

```

atgaacacga ttaacategc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg      60
ttcaacaetc tggctgacca ttacggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggccectgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaaa      180
gctggtgagg ttgcgataa cgctgccgcc aagcctctca tcaactaccct actccctaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaaag ctaagcgcgg caagcgcccc      300
acagccttcc agttcctgca agaaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg cttgcctaac cagtgctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca      420
atcggtcggg ccattgagga cgaggetcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag      480
cacttcaaga aaaacggtga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg      600
tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcaggtgcg      780
ctggctgga tctctccgat gtccaacct tgcgtagttc ctactaagcc gtggactggc      840
attactggtg gtggctattg ggctaaccgt cgctgcctc tggcgctggt gcgtaactcac      900
agtaagaaaag cactgatgcg ctacgaagac gttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt      960
aacattgctc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaaag tcctagcggg cgccaacgta     1020
atcaccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc     1080
ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct     1140

```

20

ES 2 538 694 T3

gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtcgtttcta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggtta aggaaggtta ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag 1440  
 ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500  
 tgggtgggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgcgt tctgctttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tccctccgc tggcgtttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggctg cgcggttaac 1680  
 ttgcttecta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggacta aggcactggc tggtaaatgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920  
 tccaaagagt tccgcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040  
 atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggta gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag 2100  
 tctgctgcta agctgctggc tgotgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc 2160  
 aagcgtagcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220  
 aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggtc agttccgctt acagcctacc 2280  
 attaacacca acaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgctcct 2340  
 aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttecgtaaga ctgtagtgtg ggcacacgag 2400  
 aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cagcactcct tcggtaccat tccggctgac 2460  
 gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtcttgtgat 2520  
 gtactggctg atttctacga ccagttcgct gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580  
 atgccagcac ttcgggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatottaga gtccgacttc 2640  
 gcgttcgctg aataa 2655

<210> 28  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

10

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)

15

<223> Variante Cys723Ser, Val426Phe de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 14 en la Tabla 3

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr  
 245 250 255  
 Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val  
 260 265 270  
 Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala  
 275 280 285  
 Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala  
 290 295 300  
 Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala  
 325 330 335  
 Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile  
 340 345 350  
 Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp  
 355 360 365  
 Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val  
 370 375 380  
 Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe  
 385 390 395 400  
 Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe  
 405 410 415  
 Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Phe Tyr Ala Val Ser Met Phe  
 420 425 430  
 Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys  
 435 440 445  
 Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly  
 450 455 460  
 Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys  
 465 470 475 480  
 Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro  
 485 490 495

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag 480  
 cacttcaaga aaaacggtga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa 540  
 gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctetaagg gtctactcgg tggcgaggcg 600  
 tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc 660  
 attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac 720  
 tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgc tgcaggtgcg 780  
 ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagtte ctectaagcc gtggactggc 840  
 attactggtg gtggctattg ggctaaccgt cgctcgcctc tggcgctggt gcgtactcac 900  
 agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt 960  
 aacattgcgc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg cgccaacgta 1020  
 atcaccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtget 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtcgtgttta cgtgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggtg aggaaggtta ctactggtg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag 1440  
 ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500  
 tgggtggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgogt tctgctttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tccctccgc tggcgtttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatcc agcaacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680  
 ttgcttecta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcaacta aggcaactggc tggtaaatgg 1860  
 ctggttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgtatgg tcatgacgct ggcttacggg 1920  
 tccaaagagt tcggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaaggt gtctgatgtt cactcagccg aatcaggtg ctggatacat ggctaagctg 2040  
 atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggttaag 2100  
 tctgctgcta agctgctggc tgetgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc 2160  
 aagcgttgcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220  
 aagcetatc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggtc agttccgctt acagcctacc 2280  
 attaacacca acaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgtcct 2340

ES 2 538 694 T3

aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgtaaga ctgtagtggtg ggcacacgag 2400  
 aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cacgactcct tcggtaccat tccggctgac 2460  
 gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatgggtg acacatatga gtcttgtgat 2520  
 gtactggctg atttctacga ccagttcgct gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580  
 atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc 2640  
 gcgttcgcgt aataa 2655

<210> 30  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)

<223> Variante Ser633Met de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 15 en la Tabla 3

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Phe Ala

- <210> 31
- <211> 2655
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polinucleótido codificante sintético

5 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2655)

10 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Ser633Met de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 16 en la Tabla 3

<400> 31

```

atgaacacga ttaacategc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgetatcccc      60
ttcaacactc tggctgacca ttacggtgag cgttttagctc gcgaacagtt ggccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa      180
gctggtgagg ttgctgataa cgtgcccgcc aagcctctca tcaactacct actccctaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcggg caagcgcgcc      300
acagccttcc agttcctgca agaaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg cttgcctaac cagtgctgac aatacaaccg ttcaggetgt agcaagcgca      420
atcggctcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggctgta tccgtgacct tgaagctaag      480
cacttcaaga aaaacggtga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg      600
tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcaggtgcg      780
ctggctggca tetctecgat gttccaacct tgcgtagtte etcctaagcc gtggactggc      840
attactggtg gtggctattg ggetaacggt cgtegtctc tggcgtggt gcgtactcac      900
agtaagaaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt      960
aacattgctc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg cgccaacgta     1020
atcaccaagt ggaagcattg tccggtogag gacatecctg cgattgagcg tgaagaactc     1080
ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgctg gaaacgtgct     1140
gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc     1200
atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg     1260
gactggcgcg gtcgtgttta cgtgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc     1320
aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggta aggaaggtta ctactggctg     1380
aaaatccacg gtgcaactg tgcgggtgct gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag     1440
ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact     1500
tggtaggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgcgt tctgcttga gtacgctggg     1560
gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgttga cgggtcttgc     1620

```

```

tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac      1680
ttgcttecta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag      1740
attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag      1800
aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcaacta aggcactggc tggccaatgg      1860
ctggettacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgtatgg tcatgacgct ggcttacggg      1920
tccaaagagt tcggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat      1980
tccggcaagg gtctgatggt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg      2040
atitgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggetttag      2100
tctgctgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc      2160
aagcgtagcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag      2220
aagcctatlc agacgcgctt gaacctgatg ttctcgggtc agttccgctt acagcctacc      2280
attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tctcgtcct      2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgtaaaga ctgtagtgty ggcacacgag      2400
aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cacgactcct tcgggtaccat tccggctgac      2460
gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtcttgatg      2520
gtactggetg atttctacga ccagttcget gaccagttgc acgagtctca attggacaaa      2580
atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc      2640
gcgttcgctg aataa

```

5 <210> 32  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)  
 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Ser633Met de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 16 en la Tabla 3

<400> 32

```

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

```

```

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

```

```

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu

```

20



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Phe Ala

<210> 33  
 <211> 2655  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido codificante sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2655)

<223> Secuencia de ADN que codifica la variante Val650Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a Nº 17 en la Tabla 3

<400> 33

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgetatcccc 60
ttcaaacctc tggctgacca ttacggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggccttgag 120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttcgcgaaga tgtttgagcg tcaacttaa 180
gctggtgagg ttgoggataa cgctgccgcc aagcctctca tcactaccct actccctaag 240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcgcgg caagcgcgcc 300
acagccttcc agttcctgca agaaatcaag cgggaagccg tagcgtacat caccattaag 360
accactctgg cttgcctaac cagtgctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca 420
atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag 480
cacttcaaga aaaacggtga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa 540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg 600
tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc 660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac 720
tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac getgaggcta tcgcaaccgg tgcaggtgcg 780
ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctctaagcc gtggactggc 840
    
```

attactggtg gtggetattg ggctaacggt cgtcgtcctc tggcgtggt gcgtactcac 900  
 agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt 960  
 aacattgcbc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg cgcacaagta 1020  
 atcaoccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaaac cggagacat cgcacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggtccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtcgtgttta cgtgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggta aggaaggta ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaactg tgcgggtgct gataaggctc cgttccctga gcgcacaaag 1440  
 ttattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500  
 tgggtggctg agcaagattc tccgttctgc ttcttgcgt tctgcttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggtaac 1680  
 ttgcttcta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactggc tggtaaatgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920  
 tccaaagagt tcggcttccg tcaacaactg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040  
 atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag 2100  
 tctgctgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttccg 2160  
 aagcgttgcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220  
 aagcctatc agacgcgctt gaacctgatg ttctcggctc agtccgctt acagcctacc 2280  
 attaacacca acaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgtcctc 2340  
 aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgtaaga ctgtagtggt ggacacagag 2400  
 aagtacggaa tgaatcttt tgcaactgatt cacgactcct tcggtaccat tccggctgac 2460  
 gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtcttgatg 2520  
 gtactggctg atttctacga ccagttcgtt gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580  
 atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc 2640  
 gcgttcgctg aataa 2655

<210> 34  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(883) (883)

5 <223> Variante val650Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 17 en la Tabla 3

<400> 34

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp

```

10

	195						200						205			
Ser	Ile	His	Val	Gly	Val	Arg	Cys	Ile	Glu	Met	Leu	Ile	Glu	Ser	Thr	
	210					215					220					
Gly	Met	Val	Ser	Leu	His	Arg	Gln	Asn	Ala	Gly	Val	Val	Gly	Gln	Asp	
	225				230					235					240	
Ser	Glu	Thr	Ile	Glu	Leu	Ala	Pro	Glu	Tyr	Ala	Glu	Ala	Ile	Ala	Thr	
				245					250					255		
Arg	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Gly	Ile	Ser	Pro	Met	Phe	Gln	Pro	Cys	Val	
			260					265					270			
Val	Pro	Pro	Lys	Pro	Trp	Thr	Gly	Ile	Thr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Trp	Ala	
		275					280					285				
Asn	Gly	Arg	Arg	Pro	Leu	Ala	Leu	Val	Arg	Thr	His	Ser	Lys	Lys	Ala	
	290					295					300					
Leu	Met	Arg	Tyr	Glu	Asp	Val	Tyr	Met	Pro	Glu	Val	Tyr	Lys	Ala	Ile	
	305				310					315					320	
Asn	Ile	Ala	Gln	Asn	Thr	Ala	Trp	Lys	Ile	Asn	Lys	Lys	Val	Leu	Ala	
				325					330					335		
Val	Ala	Asn	Val	Ile	Thr	Lys	Trp	Lys	His	Cys	Pro	Val	Glu	Asp	Ile	
			340					345					350			
Pro	Ala	Ile	Glu	Arg	Glu	Glu	Leu	Pro	Met	Lys	Pro	Glu	Asp	Ile	Asp	
		355					360					365				
Met	Asn	Pro	Glu	Ala	Leu	Thr	Ala	Trp	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	
	370					375					380					
Tyr	Arg	Lys	Asp	Lys	Ala	Arg	Lys	Ser	Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Glu	Phe	
	385				390					395					400	
Met	Leu	Glu	Gln	Ala	Asn	Lys	Phe	Ala	Asn	His	Lys	Ala	Ile	Trp	Phe	
				405					410					415		
Pro	Tyr	Asn	Met	Asp	Trp	Arg	Gly	Arg	Val	Tyr	Ala	Val	Ser	Met	Phe	
			420					425					430			
Asn	Pro	Gln	Gly	Asn	Asp	Met	Thr	Lys	Gly	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Lys	
		435					440					445				
Gly	Lys	Pro	Ile	Gly	Lys	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Leu	Lys	Ile	His	Gly	
	450					455					460					

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Phe Ala

<210> 35  
 <211> 2655  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido codificante sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2655)  
 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Val650Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 18 en la Tabla 3

<400> 35

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgetateccg 60  
 ttcaacacte tggctgacca ttacgggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggccttgag 120

catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaaa 180  
 gctggtgagg ttgcgataa cgctgcccgc aagcctetca tcaactacct actccctaag 240  
 atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcgcgg caagcgcgg 300  
 acagccttcc agttcctgca agaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag 360  
 accactctgg ettgectaac cagtgtgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca 420  
 atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggctgta tccgtgacct tgaagctaag 480  
 cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa 540  
 gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg 600  
 tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc 660  
 attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac 720  
 tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggeta tcgcaaccgg tgcaggtgcg 780  
 ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagtte ctctaagcc gtggactggc 840  
 attactggtg gtggetattg ggctaaccgt cgtcgtctc tggcgtggt gcgtactcac 900  
 agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt 960  
 aacattgccc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg cgcacaagta 1020  
 atcaccaagt ggaagcattg tccggctcag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggtc tcaccgctg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtctgttta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgtggc gaaaggtaa ccaatcggtg aggaaggtta ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag 1440  
 ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500  
 tgggtgggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgcgt tctgcttga gtaogctggg 1560  
 gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680  
 ttgcttcta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcaacta aggcactggc tggtaactgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920  
 tccaaagagt tcggcttccg tcaacaactg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatggt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040

```

atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggtta gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag 2100
tctgctgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc 2160
aagcgtagcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220
aagcctattc agacgcgott gaacctgatg ttctcggtc agttccgctt acagcctacc 2280
attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgctcct 2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgtgaaga ctgtagtgtg ggcacacgag 2400
aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cacgactcct tcggtacat tccggctgac 2460
gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtcttgtgat 2520
gtactggctg atttctacga ccagttcget gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580
atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctcctg acatcttaga gtcggacttc 2640
gcgttcgctg aataa 2655

```

5 <210> 36  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)

15 <223> Variante Cys723Ser, Val650Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 18 en la Tabla 3

<400> 36

```

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

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

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

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

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

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp



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

**Ala Phe Ala**

5 <210> 37  
 <211> 2655  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Polinucleótido codificante sintético

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2655)  
 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Thr654Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 19 en la Tabla 3

<400> 37

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg      60
ttcaacactc tggctgacca ttacggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggcccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaaa      180
gctggtgagg ttgoggataa cgctgccgcc aagcctctca tcactaccct actccctaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaaag ctaagcgcgg caagcgcgccg      300
acagccttcc agttcctgca agaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg cttgcctaac cagtgtgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca      420
atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag      480
cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgagggcg      600
tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgcctaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcaggtgcg      780
ctggttgcca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctccctaagcc gtggactggc      840
attactggtg gtggctattg ggctaacggt cgtcgtcctc tggcgctggt gcgtactcac      900
agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt      960
aacattgctc aaacaccgca atggaaaatc aacaagaaag tcttagcggg cgccaacgta     1020
atcaccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc     1080
ccgatgaaac cggagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct     1140
gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag cettgagttc     1200
atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg     1260
gactggcgcg gtcgtgttta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc     1320
  
```

ES 2 538 694 T3

```

aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggta aggaaggta ctactggctg 1380
aaaatccacg gtgcaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag 1440
ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500
tgggtgggctg agcaagatte tccgttctgc ttccttgcgt tetgctttga gtacgctggg 1560
gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttcgcg tggcgtttga cgggtcttgc 1620
tctggcatcc agcaettctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680
ttgcttcccta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740
attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800
aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactgga tggccaatgg 1860
ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920
tccaaagagt tcggcttccg tcaacaagtg ctggaagatc tgattcagcc agctattgat 1980
tccggcaagg gtctgatggt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040
atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggettaag 2100
tctgctgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc 2160
aagcgttgcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220
aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggtc agttccgctt acagcctacc 2280
attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tctcgtcct 2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac ctctgtaaga ctgtagtggt ggcacacgag 2400
aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cactgactcct teggtacat tccggctgac 2460
gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtcttgtgat 2520
gtactggctg atttctacga ccagttcgtc gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580
atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc 2640
gcgttcgctg aataa 2655

```

5 <210> 38  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)

15 <223> Variante Thr654Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 19 en la Tabla 3

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val  
 260 265 270  
 Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala  
 275 280 285  
 Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala  
 290 295 300  
 Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala  
 325 330 335  
 Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile  
 340 345 350  
 Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp  
 355 360 365  
 Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Ala Val  
 370 375 380  
 Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe  
 385 390 395 400  
 Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe  
 405 410 415  
 Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe  
 420 425 430  
 Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys  
 435 440 445  
 Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly  
 450 455 460  
 Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys  
 465 470 475 480  
 Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro  
 485 490 495  
 Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu  
 500 505 510  
 Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr

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

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

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

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

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

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

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

Ala Phe Ala

<210> 39  
<211> 2655  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Polinucleótido codificante sintético

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2655)

15 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Thr654Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 20 en la Tabla 3

<400> 39

```

atgaacaega ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tgaactggc tgctatcccg      60
ttcaacactc tggctgacca ttacggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggcccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaaa      180
gctggtgagg ttgeggataa cgctgcccgc aagcctetca tcaactacct actccctaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcggcg caagcgccccg      300
acagccttcc agttcctgca agaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg ettgcetaac cagtgctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca      420
atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggctgta tccgtgacct tgaagctaag      480
cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
    
```

20

gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg 600  
 tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc 660  
 attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac 720  
 tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccog tgcagggtgog 780  
 ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctccctaagcc gtggactggc 840  
 attactggtg gtggctattg ggctaaccgt cgctgcctc tggcgctggt gcgtactcac 900  
 agtaagaaag cactgatgog ctacgaagac gtttacatgc ctgagggtga caaagcgatt 960  
 aacattgcgc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg ccgcaacgta 1020  
 atcaccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaaac cgggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgctg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtcgtgttta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggta aggaaggtta ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag 1440  
 ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500  
 tgggtgggctg agcaagattc tccgtttctg ttccttgcgt tctgctttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc accgctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgtttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatec agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680  
 ttgcttecta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactggc tggccaatgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920  
 tccaaagagt tcggcttccg tcaacaagtg ctggaagatc tgattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatggt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040  
 atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag 2100  
 tctgctgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc 2160  
 aagcgtagcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220  
 aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggtc agttccgctt acagcctacc 2280  
 attaacacca acaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tategctcct 2340  
 aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgtaaaga ctgtagtgtg ggcacacgag 2400  
 aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cacgactcct tcggtaacct tccggtgac 2460  
 gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgogaa actatggttg acacatatga gtcttgtgat 2520

ES 2 538 694 T3

gtactggctg atttctacga ccagttcgcg gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580  
 atgccagcac ttcgggetaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc 2640  
 gcgttcgcgt aataa 2655

- 5 <210> 40
- <211> 883
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Variante polipeptídica sintética
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(883)
- 15 <223> Variante Cys723Ser, Thr654Leu de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a Nº 20 en la Tabla 3
- <400> 40

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His  
 165 170 175  
 Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser  
 180 190  
 Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp  
 195 200 205  
 Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr  
 210 215 220  
 Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp  
 225 230 235 240  
 Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr  
 245 250 255  
 Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val  
 260 265 270  
 Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala  
 275 280 285  
 Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala  
 290 295 300  
 Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala  
 325 330 335  
 Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile  
 340 345 350  
 Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp  
 355 360 365  
 Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val  
 370 375 380  
 Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe  
 385 390 395 400  
 Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe  
 405 410 415

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

	675		680		685														
	Val	Val	Ala	Ala	Val	Glu	Ala	Met	Asn	Trp	Leu	Lys	Ser	Ala	Ala	Lys			
	690						695					700							
	Leu	Leu	Ala	Ala	Glu	Val	Lys	Asp	Lys	Lys	Thr	Gly	Glu	Ile	Leu	Arg			
	705					710					715					720			
	Lys	Arg	Ser	Ala	Val	His	Trp	Val	Thr	Pro	Asp	Gly	Phe	Pro	Val	Trp			
					725					730					735				
	Gln	Glu	Tyr	Lys	Lys	Pro	Ile	Gln	Thr	Arg	Leu	Asn	Leu	Met	Phe	Leu			
				740					745					750					
	Gly	Gln	Phe	Arg	Leu	Gln	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Asn	Lys	Asp	Ser	Glu			
			755					760					765						
	Ile	Asp	Ala	His	Lys	Gln	Glu	Ser	Gly	Ile	Ala	Pro	Asn	Phe	Val	His			
	770						775					780							
	Ser	Gln	Asp	Gly	Ser	His	Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Val	Trp	Ala	His	Glu			
	785					790					795					800			
	Lys	Tyr	Gly	Ile	Glu	Ser	Phe	Ala	Leu	Ile	His	Asp	Ser	Phe	Gly	Thr			
					805					810					815				
	Ile	Pro	Ala	Asp	Ala	Ala	Asn	Leu	Phe	Lys	Ala	Val	Arg	Glu	Thr	Met			
				820					825					830					
	Val	Asp	Thr	Tyr	Glu	Ser	Cys	Asp	Val	Leu	Ala	Asp	Phe	Tyr	Asp	Gln			
			835					840					845						
	Phe	Ala	Asp	Gln	Leu	His	Glu	Ser	Gln	Leu	Asp	Lys	Met	Pro	Ala	Leu			
	850						855					860							
	Pro	Ala	Lys	Gly	Asn	Leu	Asn	Leu	Arg	Asp	Ile	Leu	Glu	Ser	Asp	Phe			
	865				870						875				880				
	Ala	Phe	Ala																

<210> 41  
 <211> 2655  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido codificante sintético

<220>  
 <221> misc\_feature

ES 2 538 694 T3

<222> (1)..(2655)

<223> Secuencia de ADN que codifica la variante Ala702Val de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 21 en la Tabla 3

5

<400> 41

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg      60
ttcaacactc tggctgacca ttacggtgag cgtttagctc gegaacagtt ggccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa      180
gctggtgagg ttgctgataa cgctgcccgc aagcctctca tcaactaccct actccctaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcgcgg caagcgcccg      300
acagccttc agttcctgca agaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg cttgcctaac cagtgtgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca      420
atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggctgta tccgtgacct tgaagtaag      480
cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg      600
tggtcttcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcaggtgcg      780
ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctctaagcc gtggactgga      840
attactggtg gtggetattg ggctaaccgt cgtcgtctc tggcgtggt gcgtactcac      900
agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt      960
aacattgcgc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag toctagcggc cgccaacgta     1020
atcaccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc     1080
ccgatgaaac cgaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct     1140
gccgtgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc     1200
atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca totggttccc ttacaacatg     1260
gactggcgcg gtcgtgttta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc     1320
aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggta aggaaggta ctactggctg     1380
aaaatccacg gtgcaaacctg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag     1440
ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact     1500
tggtgggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgcgt tctgcttga gtacgctggg     1560
gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tccctccgc tggcgttga cgggtcttgc     1620
tetggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac     1680
ttgcttccta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag     1740

```

ES 2 538 694 T3

```

attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag      1800
aacactgggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactggc tggccaatgg      1860
ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg      1920
tccaaagagt tcggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat      1980
tccggcaagg gtctgatggt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg      2040
atctgggaat ctgtgagcgt gacggtggta gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag      2100
tctgttgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc      2160
aagcgttgcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag      2220
aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttctctcggtc agttccgctt acagcctacc      2280
attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgctcct      2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac ctctcgtaaga ctgtagtgty ggcacacgag      2400
aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cactgactcct tcggtaacct tccggctgac      2460
gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtcttgatgat      2520
gtactggctg atttctacga ccagttcgct gaccagttgc acgagtctca attggacaaa      2580
atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc      2640
gcgttcgctg aataa

```

<210> 42

<211> 883

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Variante polipeptídica sintética

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(883)

15 <223> Variante Ala702Val de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 21 en la Tabla 3

<400> 42

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln

	<b>835</b>		<b>840</b>		<b>845</b>
	<b>Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu</b>				
	<b>850</b>		<b>855</b>		<b>860</b>
	<b>Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe</b>				
	<b>865</b>		<b>870</b>		<b>875</b>
					<b>880</b>
	<b>Ala Phe Ala</b>				

<210> 43  
 <211> 2655  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido codificante sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2655)

<223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Ala702Val de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 22 en la Tabla 3

<400> 43

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg      60
ttcaacactc tggctgacca ttacggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa      180
gctggtgagg ttgoggataa cgctgccgcc aagcctctca tcaactacct actccctaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaaag ctaagcgcg caagcgcccg      300
acagccttcc agttcctgca agaaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg cttgcctaac cagtgctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca      420
atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag      480
cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg      600
tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttaacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
totgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcaggtgcg      780
ctggctgcca tctctccgat gtccaacct tgcgtagttc ctcctaagcc gtggactggc      840
attactggtg gtggctattg ggctaaccgt cgtcgtcctc tggcgctggt gcgtactcac      900
agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt      960
aacattgcgc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggc cgccaacgta     1020
    
```

20

ES 2 538 694 T3

```

atcaccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080
ccgatgaaac cgggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct 1140
gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200
atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260
gactggcgcg gtcgtgttta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320
aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggtg aggaaggtta ctactggctg 1380
aaaatccacg gtgcaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag 1440
ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500
tggtgggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgctt tctgctttga gtacgctggg 1560
gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tccctccgc tggcgtttga cgggtcttgc 1620
tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggctg cgcggttaac 1680
ttgcttcta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740
attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800
aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggacta aggcactggc tggccaatgg 1860
ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920
tccaaagagt tccgcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980
tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040
atitgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggtt gaaagcaatgaa ctggcttaag 2100
tctgttgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttccg 2160
aagcgtagcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220
aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttctcggctc agttccgctt acagcctacc 2280
attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgcctcct 2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgtgaaga ctgtagtgtg ggcacacgag 2400
aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cacgactcct tccgtaccat tccggctgac 2460
gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtcttgtgat 2520
gtactggctg atttctacga ccagttcget gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580
atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc 2640
gcgttcgcgt aataa 2655

```

<210> 44  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

10

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)

ES 2 538 694 T3

<223> Variante Cys723Ser, Ala702Val de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 22 en la Tabla 3

<400> 44

5

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Phe Ala

<210> 45

<211> 2655

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polinucleótido codificante sintético

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(2655)

15 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Ala795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 23 en la Tabla 3

<400> 45

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccc 60

ttcaacactc tggtgacca ttacggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggccttgag 120

catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttcgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa 180

gctggtgagg ttgcggataa cgctgccgcc aagcctctca tcactaccct actccctaag 240

atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcgcgg caagcgcgg 300  
 acagccttcc agttcctgca agaaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag 360  
 accactctgg cttgcctaac cagtgetgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca 420  
 atcggctcgg ccattgagga cgaggetcgc ttcggctgta tccgtgacct tgaagctaag 480  
 cacttcaaga aaaacggtga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa 540  
 gcatttatgc aagttgtcga ggetgacatg ctctetaagg gtctactcgg tggcgaggcg 600  
 tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc 660  
 attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac 720  
 tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcagggtgcg 780  
 ctggctggca tctctocgat gttccaacct tgcgtagttc ctctaagcc gtggactggc 840  
 attactggtg gtggctattg ggctaaccgt cgtcgtcctc tggcgtggt gcgtactcac 900  
 agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgagggtga caaagcgatt 960  
 aacattgcgc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg cgccaacgta 1020  
 atcaccaagt ggaagcattg tccggctgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtcgtgttta cgtctgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggtg aggaaggtta ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag 1440  
 ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500  
 tgggtggctg agoaagatte tccgttctgc ttccttgcgt tctgcttga gtacgtggtg 1560  
 gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcacc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680  
 ttgcttcta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactggc tggtaaatgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920  
 tccaaagagt tggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040  
 atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag 2100  
 tctgetgeta agctgetggc tgetgaggtc aaagataaga agactggaga gattctctgc 2160  
 aagcgttgcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220

ES 2 538 694 T3

```

aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttctcgggtc agttccgctt acagcctacc      2280
attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg taccgctcct      2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgttaaga ctatcgtgtg ggcacacgag      2400
aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt caccgactcct tcggtacat tccggctgac      2460
gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatgggtg acacatatga gtcttgtgat      2520
gtactggetg atttctacga ccagttcget gaccagttgc acgagtctca attggacaaa      2580
atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc      2640
gcgttcgctt aataa                                                              2655

```

- 5 <210> 46
- <211> 883
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> Variante polipeptídica sintética
  
- 15 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(883)
- <223> Variante Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 23 en la Tabla 3
  
- <400> 46

```

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

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

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

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

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

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

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

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser

```



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu  
740 745 750

Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu  
755 760 765

Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His  
770 775 780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Ile Val Trp Ala His Glu  
785 790 795 800

Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr  
805 810 815

Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met  
820 825 830

Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln  
835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu  
850 855 860

Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe  
865 870 875 880

Ala Phe Ala

<210> 47

<210> 1  
 <211> 2655  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido codificante sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2655)

<223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 24 en la Tabla 3

<400> 47

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg      60
ttcaacactc tggctgacca ttacggtgag cgttttagctc gcgaacagtt ggcccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaaa      180
gctggtgagg ttgoggataa cgctgccgcc aagcctctca tcactaccct actccetaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaaag ctaagcgcg caagcgcccc      300
acagccttcc agttcctgca agaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg cttgcctaac cagtgcctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca      420
atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag      480
cacttcaaga aaaacggtga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg      600
tggtcttcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaacccg tgcaggtgcg      780
ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctectaagcc gtggactggc      840
attactggtg gtggctattg ggctaaccgt cgctcgtctc tggcgctggt gcgtactcac      900
agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt      960
aacattgcgc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcttagcggc cgccaacgta     1020
atcaccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc     1080
ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct     1140
gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgatcag ccttgagttc     1200
atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg     1260
gactggcgcg gtcgtgttta cgtgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc     1320
aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggtg aggaaggta ctactggctg     1380
aaaatccacg gtgcaaacgt tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga ggcgatcaag     1440
    
```

20

```

ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact      1500
tggtgggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgcgt tctgctttga gtaegetggg      1560
gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgtttga cgggtcttgc      1620
tctggcatcc agcaacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac      1680
ttgcttccta gtgaaacogt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag      1740
attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag      1800
aacactgggt aaatctctga gaaagtcaag ctgggcaacta aggcactggc tggcfaatgg      1860
ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg      1920
tccaaagagt tcggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat      1980
tccggcaagg gtctgatggt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg      2040
atitgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag      2100
tctgctgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc      2160
aagcgtagcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag      2220
aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggtc agttccgctt acagcctacc      2280
attaacacca acaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tctcgtcct      2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac ctctcgtgta ctatcgtgtg ggcacacgag      2400
aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt caccactcct togttaccat tccggtgac      2460
gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtcttgtgat      2520
gtactggctg atttctacga ccagttcgtt gaccagttgc acgagtctca attggacaaa      2580
atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctcctg acatctttaga gtcggacttc      2640
gcgttcgctg aataa

```

5 <210> 48  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)

15 <223> Variante Cys723Ser, Va1795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 24 en la Tabla 3

<400> 48

**Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu**  
**1 5 10 15**

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu  
 20 25 30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu  
 35 40 45

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val  
 50 55 60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys  
 65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg  
 85 90 95

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu  
 100 105 110

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser  
 115 120 125

Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala  
 130 135 140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys  
 145 150 155 160

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His  
 165 170 175

Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser  
 180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp  
 195 200 205

Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr  
 210 215 220

Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp  
 225 230 235 240

Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr  
 245 250 255

Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val  
 260 265 270

Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala



His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn  
 545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys  
 565 570 575

Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn  
 580 585 590

Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys  
 595 600 605

Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly  
 610 615 620

Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly  
 625 630 635 640

Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln  
 645 650 655

Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln  
 660 665 670

Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr  
 675 680 685

Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys  
 690 695 700

Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg  
 705 710 715 720

Lys Arg Ser Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp  
 725 730 735

Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu  
 740 745 750

Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu  
 755 760 765

Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His  
 770 775 780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Ile Val Trp Ala His Glu  
 785 790 795 800

Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr  
 805 810 815

Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met  
 820 825 830

Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln  
 835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu  
 850 855 860

Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe  
 865 870 875 880

Ala Phe Ala

<210> 49  
 <211> 2655  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido codificante sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2655)

<223> Secuencia de ADN que codifica la variante Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 25 en la Tabla 3

<400> 49

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg 60  
 tteaacactc tggctgacca ttacgggtgag cgtttagctc gccaacagtt ggccttgag 120  
 catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttcgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa 180  
 gctggtgagg ttgaggataa cgctgcgcgc aagcctctca tcaactaccct actccctaag 240  
 atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaaag ctaagcgagg caagcgcccg 300  
 acagccttc agttcctgca agaaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag 360  
 accactctgg cttgcctaac cagtgctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca 420  
 atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag 480  
 cacttcaaga aaaacggtga ggaacaacte aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa 540  
 gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctetaagg gtctactcgg tggcgaggcg 600  
 tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc 660  
 attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac 720

tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcaggtgcg 780  
 ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagtto ctectaagcc gtggactggc 840  
 attactggtg gtggctattg ggctaacggg cgtcgtcctc tggcgtggtg gcgtactcac 900  
 agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt 960  
 aacattgctc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcttagcggg cgccaacgta 1020  
 atcaccaagt ggaagcattg tccggctcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaacte 1080  
 ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgctg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtctgtgtta cgtctgttca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggta aggaaggtta ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaacctg tgcgggtgct gataaggctc cgttccctga gcgcatcaag 1440  
 ttcatgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500  
 tgggtgggctg agcaagatct tccgttctgc ttccttgcgt tctgcttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680  
 ttgcttcta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aatctctga gaaagtcaag ctgggcaacta aggcactggc tggtaactgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920  
 tccaagagt tccgcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatggt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040  
 atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggta gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag 2100  
 tctgttgcta agctgctggc tgcgtgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttccg 2160  
 aagcgttgcg ctgtgcattg ggtaacctct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacasg 2220  
 aagectatc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggctc agttccgctt acagcctacc 2280  
 attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgtctct 2340  
 aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgttaaga ctatcgtgtg ggcacacgag 2400  
 aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cactgactctc tcggtaccat tccggctgac 2460  
 gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatgggtg acacatatga gtcttgtgat 2520  
 gtactggctg atttctacga ccagtccgct gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580  
 atgccagcac ttcgggctaa aggtaaactg aacctccgtg acatcttaga gtccgacttc 2640  
 gcgttcgctg aataa 2655

<210> 50  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

10

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)  
 <223> Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 25 en la Tabla 3

15

<400> 50

```

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu
 1           5           10           15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu
 20           25           30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu
 35           40           45

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val
 50           55           60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys
 65           70           75           80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg
 85           90           95

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu
 100          105          110

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser
 115          120          125

Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala
 130          135          140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys
 145          150          155          160

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His
 165          170          175
    
```

Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser  
 180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp  
 195 200 205

Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr  
 210 215 220

Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp  
 225 230 235 240

Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr  
 245 250 255

Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val  
 260 265 270

Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Tyr Trp Ala  
 275 280 285

Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala  
 290 295 300

Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile  
 305 310 315 320

Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala  
 325 330 335

Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile  
 340 345 350

Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp  
 355 360 365

Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val  
 370 375 380

Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe  
 385 390 395 400

Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe  
 405 410 415

Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe  
 420 425 430

Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys

	435						440									445
Gly	Lys	Pro	Ile	Gly	Lys	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Leu	Lys	Ile	His	Gly	
	450					455					460					
Ala	Asn	Cys	Ala	Gly	Val	Asp	Lys	Val	Pro	Phe	Pro	Glu	Arg	Ile	Lys	
465					470					475					480	
Phe	Ile	Glu	Glu	Asn	His	Glu	Asn	Ile	Met	Ala	Cys	Ala	Lys	Ser	Pro	
				485					490					495		
Leu	Glu	Asn	Thr	Trp	Trp	Ala	Glu	Gln	Asp	Ser	Pro	Phe	Cys	Phe	Leu	
			500					505					510			
Ala	Phe	Cys	Phe	Glu	Tyr	Ala	Gly	Val	Gln	His	His	Gly	Leu	Ser	Tyr	
		515					520					525				
Asn	Cys	Ser	Leu	Pro	Leu	Ala	Phe	Asp	Gly	Ser	Cys	Ser	Gly	Ile	Gln	
530						535					540					
His	Phe	Ser	Ala	Met	Leu	Arg	Asp	Glu	Val	Gly	Gly	Arg	Ala	Val	Asn	
545					550					555					560	
Leu	Leu	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Gln	Asp	Ile	Tyr	Gly	Ile	Val	Ala	Lys	
				565					570					575		
Lys	Val	Asn	Glu	Ile	Leu	Gln	Ala	Asp	Ala	Ile	Asn	Gly	Thr	Asp	Asn	
			580					585					590			
Glu	Val	Val	Thr	Val	Thr	Asp	Glu	Asn	Thr	Gly	Glu	Ile	Ser	Glu	Lys	
		595					600					605				
Val	Lys	Leu	Gly	Thr	Lys	Ala	Leu	Ala	Gly	Gln	Trp	Leu	Ala	Tyr	Gly	
	610					615					620					
Val	Thr	Arg	Ser	Val	Thr	Lys	Arg	Ser	Val	Met	Thr	Leu	Ala	Tyr	Gly	
625					630					635					640	
Ser	Lys	Glu	Phe	Gly	Phe	Arg	Gln	Gln	Val	Leu	Glu	Asp	Thr	Ile	Gln	
				645					650					655		
Pro	Ala	Ile	Asp	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu	Met	Phe	Thr	Gln	Pro	Asn	Gln	
			660					665					670			
Ala	Ala	Gly	Tyr	Met	Ala	Lys	Leu	Ile	Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Val	Thr	
		675					680					685				
Val	Val	Ala	Ala	Val	Glu	Ala	Met	Asn	Trp	Leu	Lys	Ser	Val	Ala	Lys	
690						695					700					

Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg  
705 710 715 720

Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp  
725 730 735

Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu  
740 745 750

Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu  
755 760 765

Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His  
770 775 780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Ile Val Trp Ala His Glu  
785 790 795 800

Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr  
805 810 815

Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met  
820 825 830

Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln  
835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu  
850 855 860

Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe  
865 870 875 880

Ala Phe Ala

<210> 51  
<211> 2655  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Polinucleótido codificante sintético

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(883) (2655)

15 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a Nº 26 en la Tabla 3

<400> 51

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tccaactggc tgctatcccc 60  
 ttcaacactc tggctgacca ttacggtgag cgttttagctc gcgaacagtt ggcccttgag 120  
 catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa 180  
 gctggtgagg ttgcgataa cgctgccgcc aagcctctca tcaactacct actccctaag 240  
 atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcggg caagegccc 300  
 acagccttc agttcctgca agaaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag 360  
 accactctgg cttgcctaac cagtgtgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgc 420  
 atcggtcggg ccattgagga cgggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag 480  
 cacttcaaga aaaacggtga ggaacaactc aacaagcggc tagggcacgt ctacaagaaa 540  
 gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg 600  
 tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc 660  
 attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac 720  
 tctgagacta tccaactcgc acctgaatac gctgaggcta tccaaccgc tgcaggtgcg 780  
 ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctctaagcc gtggactgge 840  
 attactggtg gtggctattg ggctaaccgt cgtcgtcctc tggcgctggt gcgtactcac 900  
 agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgagggtga caaagcgatt 960  
 aacattgctc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tccatagcggc cgccaacgta 1020  
 atcaccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaaac ccggaagacat cgacatgaat cctgaggctc taccgcgctg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtcgtgttta cgtgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaa ccaatcggtg aggaagggtg ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag 1440  
 ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgccgta agtctccact ggagaacact 1500  
 tggtaggctg agcaagattc tccgttctgc ttcttgctg tctgcttga gtaegetggg 1560  
 gtacagcaac accgcctgag ctataactgc tccctccgc tggcgttga egggtctgc 1620  
 tctggcacc agcaacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggtaac 1680  
 ttgcttcta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggactggc tggccaatgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920

```

tccaaagagt tccgcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat      1980
tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggetg ctggatacat ggctaagctg      2040
atltgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag      2100
tctgttgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc      2160
aagcgtagcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag      2220
aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggtc agttccgctt acagcctacc      2280
attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgctcct      2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgttaaga ctatcgtgtg ggcacacgag      2400
aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt caccactcct tcggtacctat tccggctgac      2460
gctgcgaacc tgttcaaage agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtcttgtgat      2520
gtactggctg atttctacga ccagttcgct gaccagttgc acgagtctca attggacaaa      2580
atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctcogtg acatcttaga gtcggacttc      2640
gcgttcgctg aataa

```

5 <210> 52  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)

15 <223> Variante Cys723Ser, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 26 en la Tabla 3

<400> 52

```

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu
1           5           10           15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu
20           25           30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu
35           40           45

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val
50           55           60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys
65           70           75           80

```

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg  
85 90 95

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu  
100 105 110

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser  
115 120 125

Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala  
130 135 140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys  
145 150 155 160

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His  
165 170 175

Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser  
180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp  
195 200 205

Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr  
210 215 220

Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp  
225 230 235 240

Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr  
245 250 255

Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val  
260 265 270

Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala  
275 280 285

Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala  
290 295 300

Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile  
305 310 315 320

Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala  
325 330 335

Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile  
 340 345 350

Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp  
 355 360 365

Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Ala Val  
 370 375 380

Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe  
 385 390 395 400

Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe  
 405 410 415

Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe  
 420 425 430

Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys  
 435 440 445

Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly  
 450 455 460

Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys  
 465 470 475 480

Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro  
 485 490 495

Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu  
 500 505 510

Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr  
 515 520 525

Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln  
 530 535 540

His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn  
 545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys  
 565 570 575

Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn  
 580 585 590

Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys

	595					600						605			
Val	Lys	Leu	Gly	Thr	Lys	Ala	Leu	Ala	Gly	Gln	Trp	Leu	Ala	Tyr	Gly
	610					615					620				
Val	Thr	Arg	Ser	Val	Thr	Lys	Arg	Ser	Val	Met	Thr	Leu	Ala	Tyr	Gly
	625					630				635					640
Ser	Lys	Glu	Phe	Gly	Phe	Arg	Gln	Gln	Val	Leu	Glu	Asp	Thr	Ile	Gln
				645					650					655	
Pro	Ala	Ile	Asp	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu	Met	Phe	Thr	Gln	Pro	Asn	Gln
			660					665					670		
Ala	Ala	Gly	Tyr	Met	Ala	Lys	Leu	Ile	Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Val	Thr
		675					680					685			
Val	Val	Ala	Ala	Val	Glu	Ala	Met	Asn	Trp	Leu	Lys	Ser	Val	Ala	Lys
	690					695					700				
Leu	Leu	Ala	Ala	Glu	Val	Lys	Asp	Lys	Lys	Thr	Gly	Glu	Ile	Leu	Arg
	705				710					715					720
Lys	Arg	Ser	Ala	Val	His	Trp	Val	Thr	Pro	Asp	Gly	Phe	Pro	Val	Trp
				725					730					735	
Gln	Glu	Tyr	Lys	Lys	Pro	Ile	Gln	Thr	Arg	Leu	Asn	Leu	Met	Phe	Leu
			740					745					750		
Gly	Gln	Phe	Arg	Leu	Gln	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Asn	Lys	Asp	Ser	Glu
		755					760					765			
Ile	Asp	Ala	His	Lys	Gln	Glu	Ser	Gly	Ile	Ala	Pro	Asn	Phe	Val	His
	770					775					780				
Ser	Gln	Asp	Gly	Ser	His	Leu	Arg	Lys	Thr	Ile	Val	Trp	Ala	His	Glu
	785				790					795					800
Lys	Tyr	Gly	Ile	Glu	Ser	Phe	Ala	Leu	Ile	His	Asp	Ser	Phe	Gly	Thr
				805					810					815	
Ile	Pro	Ala	Asp	Ala	Ala	Asn	Leu	Phe	Lys	Ala	Val	Arg	Glu	Thr	Met
			820					825					830		
Val	Asp	Thr	Tyr	Glu	Ser	Cys	Asp	Val	Leu	Ala	Asp	Phe	Tyr	Asp	Gln
		835					840					845			
Phe	Ala	Asp	Gln	Leu	His	Glu	Ser	Gln	Leu	Asp	Lys	Met	Pro	Ala	Leu
	850					855					860				

**Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe**  
**865 870 875 880**

**Ala Phe Ala**

5 <210> 53  
 <211> 2655  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Polinucleótido codificante sintético

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2655)  
 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Val426Leu, Ala702Val de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 27 en la Tabla 3

<400> 53

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg      60
ttcaacactc tggctgacca ttacggtgag cgttttagctc gcgaacagtt ggcccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaaa      180
gctggtgagg ttgoggataa cgctgccgcc aagcctctca tcactaccet actccctaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaaag ctaagcgcgg caagcgcccc      300
acagcettcc agttcctgca agaaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg cttgcctaac cagtgctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca      420
atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag      480
cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg      600
tggtcttcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
tctgagacta tgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcaggtgcg      780
ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctctaagcc gtggactggc      840
attactggtg gtggctattg ggctaacggt cgtcgtcctc tggcgctggt gcgtactcac      900
agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt      960
aacattgccc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg cgccaacgta     1020
atcaccaagt ggaagcattg tcoggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc     1080
ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct     1140
    
```

20

**gcegctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200**  
**atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260**  
**gactggcgcg gtcgtctgta cgctgtgtca atggtcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320**  
**aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggta aggaaggta ctactggctg 1380**  
**aaaatccacg gtgcaaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga ggcgatcaag 1440**  
**ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500**  
**tgggtgggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgcgt tctgctttga gtacgctggg 1560**  
**gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgtttga cgggtcttgc 1620**  
**tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680**  
**ttgcttcccta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740**  
**attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800**  
**aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcaacta aggcactggc tggccaatgg 1860**  
**ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920**  
**tccaaagagt tccgcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980**  
**tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040**  
**atctgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag 2100**  
**tctgttgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc 2160**  
**aagcgttgcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220**  
**aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggtc agttccgctt acagcctacc 2280**  
**attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tategctcct 2340**  
**aactttgtac acagccaaga cggtagccac ctctgtaaga ctgtagtggt ggcacacgag 2400**  
**aagtacggaa tcgaatcttt tgcaactgatt cacgactcct tcggtaccat tccggctgac 2460**  
**gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtcttgtgat 2520**  
**gtactggctg atttctacga ccagttcgcgt gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580**  
**atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc 2640**  
**gcgttcgctg aataa 2655**

<210> 54  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)

<223> Variante Val426Leu, Ala702Val de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a Nº 27 en la Tabla 3

<400> 54

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu  
1 5 10 15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu  
20 25 30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu  
35 40 45

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val  
50 55 60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys  
65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg  
85 90 95

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu  
100 105 110

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser  
115 120 125

Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala  
130 135 140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys  
145 150 155 160

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His  
165 170 175

Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser  
180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp  
195 200 205

Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr  
210 215 220

Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp  
225 230 235 240

Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr  
 245 250 255

Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val  
 260 265 270

Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala  
 275 280 285

Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala  
 290 295 300

Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile  
 305 310 315 320

Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala  
 325 330 335

Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile  
 340 345 350

Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp  
 355 360 365

Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Ala Val  
 370 375 380

Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe  
 385 390 395 400

Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe  
 405 410 415

Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Leu Tyr Ala Val Ser Met Phe  
 420 425 430

Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys  
 435 440 445

Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly  
 450 455 460

Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys  
 465 470 475 480

Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro  
 485 490 495

Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu  
 500 505 510

Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr  
 515 520 525

Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln  
 530 535 540

His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn  
 545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys  
 565 570 575

Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn  
 580 585 590

Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys  
 595 600 605

Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly  
 610 615 620

Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly  
 625 630 635 640

Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln  
 645 650 655

Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln  
 660 665 670

Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr  
 675 680 685

Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Val Ala Lys  
 690 695 700

Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg  
 705 710 715 720

Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp  
 725 730 735

Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu  
 740 745 750

Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu



atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag 480  
 cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa 540  
 gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg 600  
 tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc 660  
 attgagtcaa ccggaatggg tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac 720  
 tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcaggtgcg 780  
 ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctcttaagcc gtggactggc 840  
 attactggtg gtggctattg ggctaacggg cgtcgtcctc tggcgtggt gcgtactcac 900  
 agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt 960  
 aacattgcbc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaaag tcctagcggg cgccaacgta 1020  
 atcaccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtcgtctgta cgtctgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggtg aggaaggtta ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaacgt tgcgggtgtc gataaggttc cgttecctga gcgcatcaag 1440  
 ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500  
 tgggtgggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgctg tctgcttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc accggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680  
 ttgcttcta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcaactggc tggccaatgg 1860  
 ctggcttacg gtgttaactg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920  
 tccaaagagt tcggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatggt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040  
 atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcgggtg aagcaatgaa ctggcttaag 2100  
 tctgttgcta agctgctggc tgetgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttccg 2160  
 aagcgtagcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220  
 aagectattc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggtc agttccgctt acagcctacc 2280  
 attaacacca acaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tctcgtcct 2340

ES 2 538 694 T3

aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgttaaga ctgtagtgtg ggcacacgag 2400  
 aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cagcactcct tcggtacat tccggtgac 2460  
 gctgcgaacc tgttcaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtcttctgat 2520  
 gtactggctg atttctacga ccagttcgtt gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580  
 atgccagcac ttccggetaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc 2640  
 gcgttcgcgt aataa 2655

- <210> 56
- <211> 883
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Variante polipeptídica sintética
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(883)
- <223> Variante Cys723Ser, Val426Leu, Ala702Val de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 28 en la Tabla 3
- <400> 56

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu  
 1 5 10 15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu  
 20 25 30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu  
 35 40 45

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val  
 50 55 60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys  
 65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg  
 85 90 95

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu  
 100 105 110

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser  
 115 120 125

Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala  
 130 135 140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys  
 145 150 155 160

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His  
 165 170 175

Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser  
 180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp  
 195 200 205

Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr  
 210 215 220

Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp  
 225 230 235 240

Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr  
 245 250 255

Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val  
 260 265 270

Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala  
 275 280 285

Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala  
 290 295 300

Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile  
 305 310 315 320

Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala  
 325 330 335

Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile  
 340 345 350

Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp  
 355 360 365

Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val  
 370 375 380

Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe  
 385 390 395 400

Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe  
 405 410 415

Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Leu Tyr Ala Val Ser Met Phe  
 420 425 430

Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys  
 435 440 445

Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly  
 450 455 460

Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys  
 465 470 475 480

Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro  
 485 490 495

Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu  
 500 505 510

Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr  
 515 520 525

Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln  
 530 535 540

His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn  
 545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys  
 565 570 575

Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn  
 580 585 590

Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys  
 595 600 605

Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly  
 610 615 620

Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly  
 625 630 635 640

Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln  
 645 650 655

Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln  
                                 660  665  670

Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr  
                                 675  680  685

Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Val Ala Lys  
                                 690  695  700

Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg  
 705  710  715  720

Lys Arg Ser Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp  
   725  730  735

Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu  
   740  745  750

Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu  
   755  760  765

Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His  
   770  775  780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu  
 785  790  795  800

Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr  
   805  810  815

Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met  
   820  825  830

Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln  
   835  840  845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu  
   850  855  860

Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe  
 865  870  875  880

Ala Phe Ala

<210> 57  
 <211> 2655  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido codificante sintético

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2655)  
 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Val426, Val 795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de  
 10 ADN de tipo silvestre, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a  
 N° 29 en la Tabla 3

<400> 57

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg      60
ttcaacactc tggctgacca ttacggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggcccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa      180
gctggtgagg ttgctgataa cgctgccgcc aagcctctca tcaactacct actccctaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaaag ctaagcgcgg caagcgcgg      300
acagccttcc agttcctgca agaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg cttgcctaac cagtgtgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca      420
atcggctcgg ccattgagga cgaggctcgc ttccggtcgt tccgtgacct tgaagctaa      480
cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg      600
tggtcttctg ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcaagtgcg      780
ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctccctaagcc gtggactggc      840
attactggtg gtggtattg ggctaaccgt cgtcgtcctc tggcgctggt gcgtactcac      900
agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt      960
aacattgcgc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg cgccaacgta      1020
atcaaccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc      1080
ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct      1140
gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc      1200
atgcttgagc aagccaataa gtttgetaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg      1260
gactggcgcg gtcgtctgta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc      1320
aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggtg aggaaggtta ctactggctg      1380
aaaatccacg gtgcaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag      1440
ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgccgta agtctccact ggagaacact      1500
tgggtgggctg agcaagattc tccgttctgc ttccctgcgt tctgctttga gtacgctggg      1560
gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgtttga cgggtcttgc      1620
    
```

```

tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac      1680
ttgcttccta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag      1740
attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag      1800
aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactggc tggtaaatgg      1860
ctggettacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg      1920
tccaaagagt tcggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat      1980
tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg      2040
at ttgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag      2100
tctgtgctta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc      2160
aagcgttgcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag      2220
aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttctctggtc agttccgctt acagcctacc      2280
attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgctcct      2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac ctctgtaaga ctatcgtgtg ggcacacgag      2400
aagtacggaa tcgaatcttt tgcaactgatt cacgactcct tcggtaccat tccggtgac      2460
gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatgggtg acacatatga gtcttgtgat      2520
gtactggetg atttctacga ccagttegct gaccagttgc acgagtctca attggacaaa      2580
atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtoggacttc      2640
gcgttcgcgt aataa

```

- 5 <210> 58
- <211> 883
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> Variante polipeptídica sintética
  
- 15 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(883)
- <223> Variante Val426Leu, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a Nº 29 en la Tabla 3
  
- <400> 58

```

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu
1           5           10           15

```

```

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu
          20           25           30

```

```

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu

```



Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala  
 325 330 335  
 Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile  
 340 345 350  
 Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp  
 355 360 365  
 Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val  
 370 375 380  
 Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe  
 385 390 395 400  
 Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe  
 405 410 415  
 Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Leu Tyr Ala Val Ser Met Phe  
 420 425 430  
 Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys  
 435 440 445  
 Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly  
 450 455 460  
 Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys  
 465 470 475 480  
 Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro  
 485 490 495  
 Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu  
 500 505 510  
 Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr  
 515 520 525  
 Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln  
 530 535 540  
 His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn  
 545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys  
 565 570 575

Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn  
 580 585 590

Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys  
 595 600 605

Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly  
 610 615 620

Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly  
 625 630 635 640

Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln  
 645 650 655

Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln  
 660 665 670

Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr  
 675 680 685

Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys  
 690 695 700

Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg  
 705 710 715 720

Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp  
 725 730 735

Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu  
 740 745 750

Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu  
 755 760 765

Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His  
 770 775 780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Ile Val Trp Ala His Glu  
 785 790 795 800

Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr  
 805 810 815

Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met  
 820 825 830

Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln  
 835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu  
 850 855 860

Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe  
 865 870 875 880

Ala Phe Ala

- 5 <210> 59
- <211> 2655
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Polinucleótido codificante sintético
- 15 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1)..(2655)
- <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Val426Leu, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a Nº 30 en la Tabla 3
- <400> 59

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg      60
ttcaacactc tggctgacca ttacgggtgag cgtttagctc gcgaaacagtt ggccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa      180
gctggtgagg ttgctgataa cgctgccgcc aagcctctca tcactaccct actccctaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaaag ctaagcgcgg caagcgcccg      300
acagccttcc agttcctgca agaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg ettgctaac cagtgtctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca      420
atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag      480
cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg      600
tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcaggtgcg      780
ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctccctaagcc gtggactggc      840
    
```

20

attactggtg gtggctattg ggctaacggt cgtcgtcctc tggcgctggt gcgtactcac 900  
 agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt 960  
 aacattgctc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg cgccaacgta 1020  
 atcaccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgctg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtcgtctgta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggtg aggaaggta ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaactg tgcgggtgct gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag 1440  
 tcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500  
 tgggtgggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgcgt tctgctttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgtttga cgggtettgc 1620  
 tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggctg cgcggttaac 1680  
 ttgcttcta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcaacta aggcactggc tggccaatgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactog cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920  
 tccaagaggt tccgcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatggt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040  
 atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag 2100  
 tctgctgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttgcg 2160  
 aagcgtagcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220  
 aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttccctcggtc agttccgctt acagcctacc 2280  
 attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgctcct 2340  
 aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttegttaaga ctatcgtgtg ggcacacgag 2400  
 aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cagcactcct tcggtacat tccggctgac 2460  
 gctgcgaacc tgttcaaagc agtgccgcaa actatggttg acacatatga gtcttgtgat 2520  
 gtactggetg atttctacga ccagttcgtc gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580  
 atgccagcac tccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc 2640  
 gcgttcgctg aataa 2655

<210> 60  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>

<223> Variante polipeptídica sintética

<220>

<221> MISC\_FEATURE

5 <222> (1)..(883)

<223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Val426Leu, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 30 en la Tabla 3

10 <400> 60

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu  
1 5 10 15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu  
20 25 30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu  
35 40 45

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val  
50 55 60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys  
65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg  
85 90 95

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu  
100 105 110

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser  
115 120 125

Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala  
130 135 140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys  
145 150 155 160

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His  
165 170 175

Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser  
180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp

195		200		205											
Ser 210	Ile	His	Val	Gly	Val	Arg	Cys	Ile	Glu	Met	Leu	Ile	Glu	Ser	Thr
Gly 225	Met	Val	Ser	Leu	His	Arg	Gln	Asn	Ala	Gly	Val	Val	Gly	Gln	Asp
Ser	Glu	Thr	Ile	Glu	Leu	Ala	Pro	Glu	Tyr	Ala	Glu	Ala	Ile	Ala	Thr
				245					250					255	
Arg	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Gly	Ile	Ser	Pro	Met	Phe	Gln	Pro	Cys	Val
			260					265					270		
Val	Pro	Pro	Lys	Pro	Trp	Thr	Gly	Ile	Thr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Trp	Ala
		275					280						285		
Asn	Gly	Arg	Arg	Pro	Leu	Ala	Leu	Val	Arg	Thr	His	Ser	Lys	Lys	Ala
290						295					300				
Leu	Met	Arg	Tyr	Glu	Asp	Val	Tyr	Met	Pro	Glu	Val	Tyr	Lys	Ala	Ile
305					310					315					320
Asn	Ile	Ala	Gln	Asn	Thr	Ala	Trp	Lys	Ile	Asn	Lys	Lys	Val	Leu	Ala
				325					330					335	
Val	Ala	Asn	Val	Ile	Thr	Lys	Trp	Lys	His	Cys	Pro	Val	Glu	Asp	Ile
			340					345					350		
Pro	Ala	Ile	Glu	Arg	Glu	Glu	Leu	Pro	Met	Lys	Pro	Glu	Asp	Ile	Asp
		355					360					365			
Met	Asn	Pro	Glu	Ala	Leu	Thr	Ala	Trp	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Ala	Val
370						375					380				
Tyr	Arg	Lys	Asp	Lys	Ala	Arg	Lys	Ser	Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Glu	Phe
385					390					395					400
Met	Leu	Glu	Gln	Ala	Asn	Lys	Phe	Ala	Asn	His	Lys	Ala	Ile	Trp	Phe
				405					410					415	
Pro	Tyr	Asn	Met	Asp	Trp	Arg	Gly	Arg	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Met	Phe
			420					425					430		
Asn	Pro	Gln	Gly	Asn	Asp	Met	Thr	Lys	Gly	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Lys
		435					440					445			
Gly	Lys	Pro	Ile	Gly	Lys	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Leu	Lys	Ile	His	Gly
450						455					460				

Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys  
 465 470 475 480

Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro  
 485 490 495

Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu  
 500 505 510

Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr  
 515 520 525

Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln  
 530 535 540

His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn  
 545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys  
 565 570 575

Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn  
 580 585 590

Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys  
 595 600 605

Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly  
 610 615 620

Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly  
 625 630 635 640

Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln  
 645 650 655

Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln  
 660 665 670

Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr  
 675 680 685

Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys  
 690 695 700

Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg  
 705 710 715 720

Lys Arg Ser Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp  
 725 730 735

Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu  
 740 745 750

Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu  
 755 760 765

Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His  
 770 775 780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Ile Val Trp Ala His Glu  
 785 790 795 800

Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr  
 805 810 815

Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met  
 820 825 830

Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln  
 835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu  
 850 855 860

Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe  
 865 870 875 880

Ala Phe Ala

- 5 <210> 61
- <211> 2655
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Polinucleótido codificante sintético
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1)..(2655)
- 15 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Val426Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a Nº 31 en la Tabla 3
- <400> 61

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tgaactggc tgctatcccc 60  
 ttcaacactc tggetgacca ttacggtgag cgttttagctc gcgaacagtt ggccttgag 120  
  
 catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa 180  
 gctggtgagg ttgcgataa cgtgcccgc aagcctctca tcactaccct actccctaag 240  
 atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcgcgg caagcgcgg 300  
 acagccttcc agttcctgca agaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag 360  
 accactctgg cttgcctaac cagtgtgac aatacaaccg ttcaggetgt agcaagcgc 420  
 atcggctcgg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgt tccgtgacct tgaagctaag 480  
 cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgc tagggcacgt ctacaagaa 540  
 gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg 600  
 tggcttctgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc 660  
 attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac 720  
 tctgagacta tgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tgcgaaccgg tgcaggtgcg 780  
 ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagtte ctctaagcc gtggactggc 840  
 attactgggt gtggctattg ggctaaccgt cgtcgtcctc tggcctggt gcgtactcac 900  
 agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttcatgc ctgaggtgta caaagcgatt 960  
 aacattgcbc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg cgccaacgta 1020  
 atcaccaagt ggaagcattg tccggtcggag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgatcag ccttgagtte 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggtccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtgctctgta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatagacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggtg aggaaggta ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag 1440  
 ttattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500  
 tgggtggctg agcaagatte tccgttctgc ttccttgcgt tctgctttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc accgcctgag ctataactgc tccttccgc tggcgtttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680  
 ttgcttcceta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactgggt aaatctctga gaaagtcaag ctgggcaacta aggcactggc tggtaaatgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920  
 tccaaagagt tccgcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040

```

atttgggaat ctgtgagcgt gacggtgga gctgcggtg aagcaatgaa ctggcttaag      2100
tctgttgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc      2160
aagcgttgcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag      2220
aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggtc agttccgctt acagcctacc      2280
attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tategctcct      2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgttaaga ctatcgtgtg ggcacacgag      2400
aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cagcactcct tcggtaccat tccggctgac      2460
gctgogaacc tgttcaaagc agtgccggaa actatggttg acacatatga gtcttgtgat      2520
gtactggctg atttctacga ccagttcgtc gaccagttgc acgagtctca attggacaaa      2580
atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc      2640
gcggttcgct aataa                                          2655
    
```

- 5 <210> 62
- <211> 883
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> Variante polipeptídica sintética
  
- 15 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(883)
- <223> Variante Val426Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 31 en la Tabla 3
  
- <400> 62

```

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu
 1                   5                   10                   15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu
                20                   25                   30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu
                35                   40                   45

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val
 50                   55                   60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys
 65                   70                   75                   80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg
                85                   90                   95
    
```

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu  
 100 105 110  
 Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser  
 115 120 125  
 Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala  
 130 135 140  
 Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys  
 145 150 155 160  
 His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His  
 165 170 175  
 Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser  
 180 185 190  
 Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp  
 195 200 205  
 Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr  
 210 215 220  
 Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp  
 225 230 235 240  
 Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr  
 245 250 255  
 Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val  
 260 265 270  
 Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala  
 275 280 285  
 Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala  
 290 295 300  
 Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala  
 325 330 335  
 Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile  
 340 345 350  
 Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp



Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly  
 625 630 635 640  
 Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln  
 645 650 655  
 Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln  
 660 665 670  
 Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr  
 675 680 685  
 Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Val Ala Lys  
 690 695 700  
 Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg  
 705 710 715 720  
 Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp  
 725 730 735  
 Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu  
 740 745 750  
 Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu  
 755 760 765  
 Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His  
 770 775 780  
 Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Ile Val Trp Ala His Glu  
 785 790 795 800  
 Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr  
 805 810 815  
 Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met  
 820 825 830  
 Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln  
 835 840 845  
 Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu  
 850 855 860  
 Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe  
 865 870 875 880

**Ala Phe Ala**

5 <210> 63  
 <211> 2655  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Polinucleótido codificante sintético

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2655)  
 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Val426Leu, Ala702Val, V795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 32 en la Tabla 3

<400> 63

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tgaactggc tgctatcccg      60
ttcaacactc tggtgacca ttacggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggcccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa      180
gctggtgagg ttgcgataa cgctgccgcc aagcctctca tcaactacct actccctaag      240
atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaaag ctaagcgcgg caagcgcccg      300
acagccttcc agttcctgca agaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg cttgcctaac cagtgctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca      420
atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag      480
cacttcaaga aaaacggtga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg      600
tggtcttcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
totgagacta tgaactcgc acctgaatac gctgaggeta tgcgaacccg tgcaggtgcg      780
ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagtte ctctaagcc gtggactggc      840
attactggtg gtggctattg ggctaacggt cgtcgtctc tggcgctggt gcgtactcac      900
agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt      960
aacattgcgc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tctagcgggt cgccaacgta     1020
atcaccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc     1080
ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggetc tcaccgctg gaaacgtgct     1140
gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc     1200
atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg     1260

```

20

**gactggcgcg gtcgtctgta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320**  
**aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggta aggaaggtta ctactggctg 1380**  
**aaaatccacg gtgcaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga ggcgatcaag 1440**  
**ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact 1500**  
**tggtgggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgcgt tctgctttga gtacgctggg 1560**  
**gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgtttga cgggtcttgc 1620**  
**tctggcatcc agcacttctc cgcgatgtc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680**  
**ttgcttccta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740**  
**attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800**  
**aacactgggtg aatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactggc tggccaatgg 1860**  
**ctgggttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920**  
**tccaaagagt tgggttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980**  
**tccggcaagg gtctgatggt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040**  
**atttgggaat ctgtgagcgt gacgggtgta gctgcgggtg aagcaatgaa ctggcttaag 2100**  
**tctgttgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttgc 2160**  
**aagcgtagcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220**  
**aagcctatc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggtc agttccgctt acagcctacc 2280**  
**attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgtcct 2340**  
**aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgttaaga ctatcgtgtg ggcacacgag 2400**  
**aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cacgactcct tcggtacat tccggtgac 2460**  
**gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatgggtg acacatatga gtcttgtgat 2520**  
**gtactggctg atttctacga ccagttcgct gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580**  
**atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctcogtg acatcttaga gtcggacttc 2640**  
**gcgttcgctg aataa 2655**

<210> 64  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)

<223> Variante Cys723Ser, Val426Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 32 en la Tabla 3

<400> 64

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu  
 1 5 10 15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu  
 20 25 30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu  
 35 40 45

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val  
 50 55 60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys  
 65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg  
 85 90 95

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu  
 100 105 110

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser  
 115 120 125

Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala  
 130 135 140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys  
 145 150 155 160

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His  
 165 170 175

Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser  
 180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp  
 195 200 205

Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr  
 210 215 220

Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp  
 225 230 235 240

Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr  
 245 250 255

Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val  
 260 265 270  
 Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala  
 275 280 285  
 Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala  
 290 295 300  
 Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala  
 325 330 335  
 Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile  
 340 345 350  
 Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp  
 355 360 365  
 Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Ala Val  
 370 375 380  
 Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe  
 385 390 395 400  
 Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe  
 405 410 415  
 Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Leu Tyr Ala Val Ser Met Phe  
 420 425 430  
 Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys  
 435 440 445  
 Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly  
 450 455 460  
 Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys  
 465 470 475 480  
 Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro  
 485 490 495  
 Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu  
 500 505 510

Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr  
515 520 525

Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln  
530 535 540

His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn  
545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys  
565 570 575

Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn  
580 585 590

Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys  
595 600 605

Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly  
610 615 620

Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly  
625 630 635 640

Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln  
645 650 655

Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln  
660 665 670

Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr  
675 680 685

Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Val Ala Lys  
690 695 700

Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg  
705 710 715 720

Lys Arg Ser Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp  
725 730 735

Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu  
740 745 750

Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu  
755 760 765

Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His

770	775	780
<b>Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Ile Val Trp Ala His Glu</b>		
<b>785</b>	<b>790</b>	<b>795</b>
<b>Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr</b>		
	<b>805</b>	<b>810</b>
<b>Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met</b>		
	<b>820</b>	<b>825</b>
<b>Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln</b>		
	<b>835</b>	<b>840</b>
<b>Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu</b>		
	<b>850</b>	<b>855</b>
<b>Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe</b>		
	<b>865</b>	<b>870</b>
		<b>875</b>
		<b>880</b>
<b>Ala Phe Ala</b>		

<210> 65

<211> 2655

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polinucleótido codificante sintético

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(2655)

15 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser, Cys723Ser, Cys839Ser, Val426Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 33 en la Tabla 3

<400> 65

<b>atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg</b>	<b>60</b>
<b>ttcaaacactc tggctgacca ttacggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggcccttgag</b>	<b>120</b>
<b>catgagtett acgagatggg tgaagcacgc ttcgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa</b>	<b>180</b>
<b>gctggtgagg ttgaggataa cgctgccgcc aagcctctca tcaactaccct actccctaag</b>	<b>240</b>
<b>atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaaag ctaagcgogg caagcgcccc</b>	<b>300</b>
<b>acagccttcc agttcctgca agaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag</b>	<b>360</b>
<b>accactctgg ctagcctaac cagtgtctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca</b>	<b>420</b>
<b>atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag</b>	<b>480</b>

20

cacttcaaga aaaacgttga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa 540  
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctetaagg gtctactcgg tggcgaggcg 600  
tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc 660  
attgagctaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac 720  
tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccog tgcaggtgcg 780  
ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctcttaagcc gtggactggc 840  
attactggtg gtggctattg ggctaacggt cgtcgtcctc tggcgctggt gcgtactcac 900  
agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt 960  
aacattgctc aaaacaccgc atggaaaate aacaagaaag tcttagcggg cgcacaagta 1020  
atcaccaagt ggaagcatag cccggctcag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgctg gaaacgtgct 1140  
gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
gactggcgcg gtcgtctgta cgtctgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggtg aggaaggta ctactggctg 1380  
aaaatecacg gtgcaaaactg tgcgggtgct gataaggttc cgttccctga gcgcacaag 1440  
ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gctagcctc agtctccact ggagaacact 1500  
tgggtggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgcgt tcagctttga gtacgctggg 1560  
gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tccttccgc tggcgtttga cgggtcttgc 1620  
tctggcatcc agcaactctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680  
ttgcttecta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
attetacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcaactgg tggccaatgg 1860  
ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920  
tccaaagagt tcggcttccg tcaacaagtg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
tcgggcaagg gtctgatggt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040  
atthgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag 2100  
tctgttgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttccg 2160  
aagcgtagcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220  
aagcctatc agacgcgctt gaacctgatg ttcctcggtc agttccgctt acagcctacc 2280  
attaacacca acaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgtcctc 2340  
aactttgtac acagccaaga cggtagccac ctctgtaaga ctatcgtgtg ggcacacgag 2400  
aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cacgactcct tcggtaacct tcggctgac 2460

ES 2 538 694 T3

**gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtctagcgat 2520**  
**gtactggctg atttctacga ccagttcgct gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580**  
**atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctcogtg acatcttaga gtcggacttc 2640**  
**gcgttcogct aataa 2655**

- 5 <210> 66
- <211> 883
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Variante polipeptídica sintética
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(883)
- 15 <223> Variante Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser, Cys723Ser, Cys839Ser, Val426Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 33 en la Tabla 3
- <400> 66

**Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu**  
**1 5 10 15**

**Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu**  
**20 25 30**

**Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu**  
**35 40 45**

**Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val**  
**50 55 60**

**Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys**  
**65 70 75 80**

**Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg**  
**85 90 95**

**Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu**  
**100 105 110**

**Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Ser Leu Thr Ser**  
**115 120 125**

**Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala**  
**130 135 140**

20

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys  
 145 150 155 160  
 His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His  
 165 170 175  
 Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser  
 180 185 190  
 Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp  
 195 200 205  
 Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr  
 210 215 220  
 Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp  
 225 230 235 240  
 Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr  
 245 250 255  
 Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val  
 260 265 270  
 Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala  
 275 280 285  
 Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala  
 290 295 300  
 Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala  
 325 330 335  
 Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Ser Pro Val Glu Asp Ile  
 340 345 350  
 Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp  
 355 360 365  
 Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val  
 370 375 380  
 Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe  
 385 390 395 400  
 Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe

				405						410						415
Pro	Tyr	Asn	Met	Asp	Trp	Arg	Gly	Arg	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Met	Phe	
			420					425					430			
Asn	Pro	Gln	Gly	Asn	Asp	Met	Thr	Lys	Gly	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Lys	
		435					440					445				
Gly	Lys	Pro	Ile	Gly	Lys	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Leu	Lys	Ile	His	Gly	
	450					455					460					
Ala	Asn	Cys	Ala	Gly	Val	Asp	Lys	Val	Pro	Phe	Pro	Glu	Arg	Ile	Lys	
465					470					475					480	
Phe	Ile	Glu	Glu	Asn	His	Glu	Asn	Ile	Met	Ala	Ser	Ala	Lys	Ser	Pro	
				485					490					495		
Leu	Glu	Asn	Thr	Trp	Trp	Ala	Glu	Gln	Asp	Ser	Pro	Phe	Cys	Phe	Leu	
			500					505					510			
Ala	Phe	Ser	Phe	Glu	Tyr	Ala	Gly	Val	Gln	His	His	Gly	Leu	Ser	Tyr	
		515					520					525				
Asn	Cys	Ser	Leu	Pro	Leu	Ala	Phe	Asp	Gly	Ser	Cys	Ser	Gly	Ile	Gln	
	530					535					540					
His	Phe	Ser	Ala	Met	Leu	Arg	Asp	Glu	Val	Gly	Gly	Arg	Ala	Val	Asn	
545					550					555					560	
Leu	Leu	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Gln	Asp	Ile	Tyr	Gly	Ile	Val	Ala	Lys	
				565					570						575	
Lys	Val	Asn	Glu	Ile	Leu	Gln	Ala	Asp	Ala	Ile	Asn	Gly	Thr	Asp	Asn	
			580					585					590			
Glu	Val	Val	Thr	Val	Thr	Asp	Glu	Asn	Thr	Gly	Glu	Ile	Ser	Glu	Lys	
		595					600					605				
Val	Lys	Leu	Gly	Thr	Lys	Ala	Leu	Ala	Gly	Gln	Trp	Leu	Ala	Tyr	Gly	
	610					615					620					
Val	Thr	Arg	Ser	Val	Thr	Lys	Arg	Ser	Val	Met	Thr	Leu	Ala	Tyr	Gly	
625					630					635					640	
Ser	Lys	Glu	Phe	Gly	Phe	Arg	Gln	Gln	Val	Leu	Glu	Asp	Thr	Ile	Gln	
				645					650					655		
Pro	Ala	Ile	Asp	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu	Met	Phe	Thr	Gln	Pro	Asn	Gln	
			660					665					670			

Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr  
675 680 685

Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Val Ala Lys  
690 695 700

Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg  
705 710 715 720

Lys Arg Ser Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp  
725 730 735

Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu  
740 745 750

Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu  
755 760 765

Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His  
770 775 780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Ile Val Trp Ala His Glu  
785 790 795 800

Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr  
805 810 815

Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met  
820 825 830

Val Asp Thr Tyr Glu Ser Ser Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln  
835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu  
850 855 860

Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe  
865 870 875 880

Ala Phe Ala

<210> 67  
<211> 2655  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polinucleótido codificante sintético

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2655)

ES 2 538 694 T3

<223> Secuencia de ADN que codifica la variante Val426Leu, Val650Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 34 en la Tabla 3

5 <400> 67

```

atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg      60
ttcaacactc tggctgacca ttacggtgag cgttttagctc gcgaacagtt ggcccttgag      120
catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaaa      180
gctggtgagg ttgcgataa cgetgccgcc aagcctctca tcaactaccct actcctaag      240
atgattgca ccatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcgcgg caagcgcgg      300
acagccttc agttcctgca agaaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag      360
accactctgg cttgcctaac cagtgctgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcga      420
atcggtcggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggtcgta tccgtgacct tgaagctaag      480
cacttcaaga aaaacggtga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa      540
gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg      600
tggtcttcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc      660
attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac      720
tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaacccg tgcaggtgcg      780
ctggctggca tctctcogat gttccaacct tgcgtagtcc ctactaagcc gtggaactgga      840
attactggtg gtggctattg ggctaaccgt cgctcgtcctc tggcgctggt gcgtaactcac      900
agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt      960
aacattgcgc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggg cgccaacgta     1020
atcaccaagt ggaagcattg tccggctcag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc     1080
ccgatgaaac ccggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct     1140
gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc     1200
atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg     1260
gactggcgcg gtcgtctgta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc     1320
aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggta aggaaggtta ctactggctg     1380
aaaatccacg gtgcaaactg tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag     1440
ttcattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccact ggagaacact     1500
tggtgggctg agcaagatte tccgttctgc ttccctgctg tctgctttga gtacgctggg     1560
gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgtttga cgggtctgca     1620

```

```

tctggcatcc agcaacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680
ttgcttccta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740
attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800
aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactggc tggccaatgg 1860
ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920
tccaaagagt tcggcttccg tcaacaactg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980
tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040
atitgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag 2100
tctgttgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc 2160
aagcgttcg cgtgtcattg ggtaactcct gatgggttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220
aagcctatc agacgcgctt gaacctgatg ttectcggtc agttccgctt acagcctacc 2280
attaacacca acaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tatcgcctct 2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgttaaga ctatcgtgtg ggcacacgag 2400
aagtacggaa tcgaatctt tgcaactgatt caccactcct tcggtacat tccggctgac 2460
gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatgggtg acacatatga gtcttgtgat 2520
gtactggctg atttctacga ccagttcget gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580
atgccagcac ttcggctaa aggttaactg aacctcgtg acatcttaga gtcggacttc 2640
gcgttcgctg aataa 2655

```

- <210> 68
- <211> 883
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- 10 <223> Variante polipeptídica sintética
  
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(883)
- 15 <223> Variante Val426Leu, Val650Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 34 en la Tabla 3
  
- <400> 68

```

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu
 1                   5                   10                   15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu
                   20                   25                   30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu
 35                   40                   45

```

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val  
50 55 60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys  
65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg  
85 90 95

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu  
100 105 110

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser  
115 120 125

Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala  
130 135 140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys  
145 150 155 160

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His  
165 170 175

Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser  
180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp  
195 200 205

Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr  
210 215 220

Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp  
225 230 235 240

Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr  
245 250 255

Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val  
260 265 270

Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala  
275 280 285

Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala  
290 295 300

Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile  
 305 310 315 320

Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala  
 325 330 335

Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile  
 340 345 350

Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp  
 355 360 365

Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Ala Val  
 370 375 380

Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe  
 385 390 395 400

Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe  
 405 410 415

Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Leu Tyr Ala Val Ser Met Phe  
 420 425 430

Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys  
 435 440 445

Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly  
 450 455 460

Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys  
 465 470 475 480

Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro  
 485 490 495

Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu  
 500 505 510

Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr  
 515 520 525

Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln  
 530 535 540

His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn  
 545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys  
 565 570 575

Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn  
 580 585 590

Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys  
 595 600 605

Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly  
 610 615 620

Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly  
 625 630 635 640

Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Leu Leu Glu Asp Thr Ile Gln  
 645 650 655

Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln  
 660 665 670

Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr  
 675 680 685

Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Val Ala Lys  
 690 695 700

Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg  
 705 710 715 720

Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp  
 725 730 735

Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu  
 740 745 750

Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu  
 755 760 765

Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His  
 770 775 780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Ile Val Trp Ala His Glu  
 785 790 795 800

Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr  
 805 810 815

Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met

	820		825		830
	Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln				
	835		840		845
	Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu				
	850		855		860
	Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe				
	865		870		875
					880
	Ala Phe Ala				

5 <210> 69  
 <211> 2655  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Polinucleótido codificante sintético

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2655)  
 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante Cys723Ser, Val426Leu, Val650Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a Nº 35 en la Tabla 3

<400> 69

	atgaacacga ttaacatcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg	60
	ttcaacactc tggetgacca ttacggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggccttgag	120
	catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaa	180
	gctggtgagg ttgctgataa cgetgcccgc aagcctctca tcaactacct actccctaag	240
	atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcgcgg caagcgcgg	300
	acagccttcc agttcctgca agaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag	360
	accactctgg cttgcctaac cagtgetgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca	420
	atcggctogg ccattgagga cgaggctcgc ttccgctgta tccgtgacct tgaagctaag	480
	cacttcaaga aaaacggtga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa	540
	gcatttatgc aagttgtcga ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg	600
	tggtcttcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc	660
	attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgccaaaatg ctggcgtagt aggtcaagac	720
	tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcaggtgcg	780
20	ctggctggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctcctaagcc gtggactggc	840

attactggtg gtggctattg ggetaacggt cgctgcctc tggcgtggt gcgtactcac 900  
 agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgaggtgta caaagcgatt 960  
 aacattgctc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggc cgccaacgta 1020  
 atcaccaagt ggaagcattg tccggtcgag gacatccctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaaac cggaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtcgtctgta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggtg aggaaggta ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaactg tgcgggtgct gataaggctc cgttccctga ggcgatcaag 1440  
 ttattgagg aaaaccacga gaacatcatg gcttgcgcta agtctccaet ggagaacact 1500  
 tggtaggctg agcaagattc tccgttctgc ttccttgctt tctgcttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tccctccgc tggcgttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatcc agcaactctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg cgcggttaac 1680  
 ttgcttcta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aaatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactggc tggtaaatgg 1860  
 ctggcttacg gtgttactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920  
 tccaaagagt teggcttccg tcaacaactg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040  
 atttggaat ctgtgagcgt gacggtggta gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag 2100  
 tctgtgcta agctgctggc tgetgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttccg 2160  
 aagcgtagcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaatacaag 2220  
 aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttctcggctc agttccgctt acagcctacc 2280  
 attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tctcgtcct 2340  
 aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttcgtgaaga ctatcgtgtg ggcacacgag 2400  
 aagtacggaa tcgaatcttt tgcaactgatt caagactcct tcggtaecat tccggctgac 2460  
 gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtcttgtgat 2520  
 gtactggctg atttctacga ccagttcgtc gaccagttgc acgagtctca attggacaaa 2580  
 atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc 2640  
 gcgttcgctg aataa 2655

<210> 70  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante polipeptídica sintética

<220>

5 <221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(883)

<223> Variante Cys723Ser, Val426Leu, Val650Leu, Ala702Val, Val795Ile de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN; secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 35 en la Tabla 3

10 <400> 70

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu  
1 5 10 15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu  
20 25 30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu  
35 40 45

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val  
50 55 60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys  
65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg  
85 90 95

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu  
100 105 110

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser  
115 120 125

Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala  
130 135 140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys  
145 150 155 160

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His  
165 170 175

Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser  
180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp



Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys  
465 470 475 480

Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro  
485 490 495

Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu  
500 505 510

Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr  
515 520 525

Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln  
530 535 540

His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn  
545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys  
565 570 575

Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn  
580 585 590

Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys  
595 600 605

Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly  
610 615 620

Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly  
625 630 635 640

Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Leu Leu Glu Asp Thr Ile Gln  
645 650 655

Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln  
660 665 670

Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr  
675 680 685

Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Val Ala Lys  
690 695 700

Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg  
705 710 715 720

Lys Arg Ser Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp  
 725 730 735

Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu  
 740 745 750

Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu  
 755 760 765

Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His  
 770 775 780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Ile Val Trp Ala His Glu  
 785 790 795 800

Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr  
 805 810 815

Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met  
 820 825 830

Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln  
 835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu  
 850 855 860

Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe  
 865 870 875 880

Ala Phe Ala

<210> 71  
 <211> 2655  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido codificante sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2655)  
 <223> Secuencia de ADN que codifica la variante C125Ser, C347S, C492S, C515S, C723S, C839S, V426L, V650L, A702V, V795I de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN, incluyendo el codón de iniciación que codifica la metionina N-terminal; correspondiente a N° 36 en la Tabla 3

<400> 71

atgaacaega ttaacstcgc taagaacgac ttctctgaca tcgaactggc tgctatcccg 60

tteaacaactc tggctgacca ttacggtgag cgtttagctc gcgaacagtt ggcccttgag 120  
 catgagtctt acgagatggg tgaagcacgc ttccgcaaga tgtttgagcg tcaacttaaa 180  
 gctggtgagg ttgctgataa cgctgcgcgc aagcctctca tcaactacct actccctaag 240  
 atgattgcac gcatcaacga ctggtttgag gaagtgaag ctaagcgcg caagcgcccc 300  
 acagccttcc agttectgca agaaatcaag ccggaagccg tagcgtacat caccattaag 360  
 accactctgg ctagectaac cagtgtgac aatacaaccg ttcaggctgt agcaagcgca 420  
 atcggctggg ccattgagga cgaggctcgc ttcggctgta tccgtgacct tgaagctaag 480  
 cacttcaaga aaaacggtga ggaacaactc aacaagcgcg tagggcacgt ctacaagaaa 540  
 gcatttatgc aagtgtgca ggctgacatg ctctctaagg gtctactcgg tggcgaggcg 600  
 tggctctcgt ggcataagga agactctatt catgtaggag tacgctgcat cgagatgctc 660  
 attgagtcaa ccggaatggt tagcttacac cgcctaaatg ctggcgtagt aggtcaagac 720  
 tctgagacta tcgaactcgc acctgaatac gctgaggcta tcgcaaccgg tgcagggtgcg 780  
 ctggtggca tctctccgat gttccaacct tgcgtagttc ctctaagcc gtggactggc 840  
 attactggtg gtggctattg ggctaaccgt cgtcgtctc tggcgtggt gcgtactcac 900  
 agtaagaaag cactgatgcg ctacgaagac gtttacatgc ctgagggtga caaagcgatt 960  
 aacattgcgc aaaacaccgc atggaaaatc aacaagaaag tcctagcggc cccaacgta 1020  
 atcaccaagt ggaagcatag cccggtcgag gacatcctg cgattgagcg tgaagaactc 1080  
 ccgatgaaac cgaagacat cgacatgaat cctgaggctc tcaccgcgtg gaaacgtgct 1140  
 gccgctgctg tgtaccgcaa ggacaaggct cgcaagtctc gccgtatcag ccttgagttc 1200  
 atgcttgagc aagccaataa gtttgctaac cataaggcca tctggttccc ttacaacatg 1260  
 gactggcgcg gtcgtctgta cgctgtgtca atgttcaacc cgcaaggtaa cgatatgacc 1320  
 aaaggactgc ttacgctggc gaaaggtaaa ccaatcggtg aggaaggta ctactggctg 1380  
 aaaatccacg gtgcaaacgt tgcgggtgtc gataaggttc cgttccctga gcgcatcaag 1440  
 ttattgagg aaaaccacga gaacatcatg gctagcgtca agtctccact ggagaacact 1500  
 tggtaggctg agcaagatc tccgttctgc ttccttgcgt tcagcttga gtacgctggg 1560  
 gtacagcacc acggcctgag ctataactgc tcccttccgc tggcgttga cgggtcttgc 1620  
 tctggcatcc agcacttctc cgcgatgctc cgagatgagg taggtggtcg ccgggttaac 1680  
 ttgcttcta gtgaaaccgt tcaggacatc tacgggattg ttgctaagaa agtcaacgag 1740  
 attctacaag cagacgcaat caatgggacc gataacgaag tagttaccgt gaccgatgag 1800  
 aacactggtg aatctctga gaaagtcaag ctgggcacta aggcactgac tggtaaatgg 1860  
 ctggttacg gtgtactcg cagtgtgact aagcgttcag tcatgacgct ggcttacggg 1920  
 tccaagagt tcggcttccg tcaacaactg ctggaagata ccattcagcc agctattgat 1980  
 tccggcaagg gtctgatgtt cactcagccg aatcaggctg ctggatacat ggctaagctg 2040

```

atttgggaat ctgtgagcgt gacggtggtg gctgcggttg aagcaatgaa ctggcttaag      2100
tctgttgcta agctgctggc tgctgaggtc aaagataaga agactggaga gattcttcgc      2160
aagcgtagcg ctgtgcattg ggtaactcct gatggtttcc ctgtgtggca ggaataacaag      2220
aagcctattc agacgcgctt gaacctgatg ttectcggtc agttccgctt acagcctacc      2280
attaacacca acaaagatag cgagattgat gcacacaaac aggagtctgg tategctcct      2340
aactttgtac acagccaaga cggtagccac cttecgtaaga ctatcggttg ggcacacgag      2400
aagtacggaa tcgaatcttt tgcactgatt cactgactcct tcggtaccat tccggtgac      2460
gctgcgaacc tgttcaaagc agtgcgcgaa actatggttg acacatatga gtctagcgat      2520
gtactggetg atttctacga ccagttcget gaccagttgc acgagtctca attggacaaa      2580
atgccagcac ttccggctaa aggtaacttg aacctccgtg acatcttaga gtcggacttc      2640
gcgttcgcgt aataa                                          2655
    
```

5 <210> 72  
 <211> 883  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Variante polipeptídica sintética

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(883)

15 <223> Variante C125S, C347S, C492S, C515S, C723S, C839S, V426L, V650L, A702V, V795I de la T7 ARN polimerasa dependiente de ADN de tipo silvestre, secuencia de aminoácidos incluyendo la metionina N-terminal; correspondiente a N° 36 en la Tabla 3

<400> 72

```

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu
 1           5           10           15
    
```

```

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu
          20           25           30
    
```

```

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu
          35           40           45
    
```

```

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val
          50           55           60
    
```

```

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys
          65           70           75           80
    
```

```

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg
          85           90           95
    
```

20

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu  
 100 105 110

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Ser Leu Thr Ser  
 115 120 125

Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala  
 130 135 140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys  
 145 150 155 160

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His  
 165 170 175

Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser  
 180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp  
 195 200 205

Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr  
 210 215 220

Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp  
 225 230 235 240

Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr  
 245 250 255

Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val  
 260 265 270

Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala  
 275 280 285

Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala  
 290 295 300

Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile  
 305 310 315 320

Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala  
 325 330 335

Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Ser Pro Val Glu Asp Ile  
 340 345 350

Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp  
 355 360 365

Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Ala Val  
 370 375 380

Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe  
 385 390 395 400

Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe  
 405 410 415

Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Leu Tyr Ala Val Ser Met Phe  
 420 425 430

Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys  
 435 440 445

Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly  
 450 455 460

Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys  
 465 470 475 480

Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Ser Ala Lys Ser Pro  
 485 490 495

Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu  
 500 505 510

Ala Phe Ser Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr  
 515 520 525

Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln  
 530 535 540

His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn  
 545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys  
 565 570 575

Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn  
 580 585 590

Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys  
 595 600 605

Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly  
 610 615 620

Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly  
 625 630 635 640

Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Leu Leu Glu Asp Thr Ile Gln  
 645 650 655

Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln  
 660 665 670

Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr  
 675 680 685

Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Val Ala Lys  
 690 695 700

Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg  
 705 710 715 720

Lys Arg Ser Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp  
 725 730 735

Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu  
 740 745 750

Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu  
 755 760 765

Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His  
 770 775 780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Ile Val Trp Ala His Glu  
 785 790 795 800

Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr  
 805 810 815

Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met  
 820 825 830

Val Asp Thr Tyr Glu Ser Ser Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln  
 835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu  
 850 855 860

Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe

865

870

875

880

**Ala Phe Ala**

5 <210> 73  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> ADN que codifica el marcador de Histidina N-terminal (His6) con una secuencia enlazadora, fusionada a los dos primeros aminoácidos N-terminales de T7 (Met y Asn)

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (28)..(33)  
 <223> codones que codifican los dos primeros aminoácidos de T7 Met y Asn

25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (31)..(33)  
 <223> codón correspondiente a las posiciones de 4 a 6 en cada una de las SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71

30 <400> 73  
 atgcatcacc atcatcacca cggatcatg aac 33

35 <210> 74  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Secuencia de aminoácidos del marcador de Histidina N-terminal (His6) con una secuencia enlazadora, fusionada a los dos primeros aminoácidos N-terminales de T7 (Met y Asn)

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(11)  
 <223> Aminoácido Asn que corresponde a la Asn de la posición 2 de cada una de las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(7)  
 <223> Marcador de histidina (His6)

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(9)  
 <223> Secuencia enlazadora

**Met His His His His His His Gly Ser Met Asn**  
**1 5 10**

60

5 <210> 75  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Marcador His sintética

10 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> véase la memoria descriptiva tal como se expidió para la descripción detallada de las sustituciones y de las realizaciones preferentes

15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(7)  
<223> Esta región puede abarcar de 3 a 7 restos "His"

20 <400> 75

**His His His His His His His**  
**1 5**

25 <210> 76  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Marcador 6xHis sintética (His6)

<400> 76

**His His His His His His**  
**1 5**

35

## REIVINDICACIONES

1. Una solución acuosa en la que está ausente un agente reductor con un grupo tiol, comprendiendo la solución acuosa un polipéptido, comprendiendo el polipéptido una variante de la T7 ARN polimerasa (variante de T7),  
 5 teniendo la variante de T7 las propiedades de (i) actividad de ARN polimerasa dependiente de ADN, y (ii) una composición distinta de aminoácidos en comparación con el polipéptido de 883 aminoácidos de la T7 ARN polimerasa de SEC ID N°: 2 (referencia de tipo silvestre),  
 en la que en una posición seleccionada de la 510 a la 530 de la variante de T7, numerada a partir del extremo N-terminal de la referencia de tipo silvestre, está presente un resto de Cisteína,  
 10 en la que la variante de T7 comprende una o más sustituciones de aminoácidos de las cuales una (o la primera) está en la posición 723 y donde la Serina sustituye al resto de Cisteína (Cys723Ser),  
 y en la que está ausente la formación de homomultímeros en la solución acuosa de la variante de T7 como resultado de uno o más enlaces disulfuro intermoleculares.
- 15 2. La solución acuosa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que en el polipéptido el número de aminoácidos sustituidos en la variante de T7 es de 1 a 10.
3. La solución acuosa de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el polipéptido de la variante de T7 además comprende una sustitución de Cisteína-Serina seleccionada del grupo que consiste en Cys125Ser, Cys347Ser,  
 20 Cys492Ser, Cys515Ser y Cys839Ser.
4. La solución acuosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, en la que el polipéptido de la variante de T7 además comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en  
 25 Val426Leu, Val426Ile, Val426Phe, Ser633Val, Ser633Met, Val650Leu, Thr654Leu, Ala702Val y Val795Ile.
5. La solución acuosa de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el polipéptido de la variante de T7 comprende las sustituciones de aminoácidos Val426Leu, Val650Leu, Ala702Val y Val795Ile.
6. La solución acuosa de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el polipéptido de la variante de T7 comprende las  
 30 sustituciones de aminoácidos Val426Leu, Ala702Val y Val795Ile.
7. La solución acuosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el polipéptido comprende la variante de T7 y un marcador His N-terminal.
- 35 8. La solución acuosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el polipéptido comprende la variante de T7 con una Metionina N-terminal.
9. Una solución acuosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el agente reductor ausente con un grupo tiol se selecciona del grupo que consiste en mercaptoetanol, ditiotreitól, ditiogeritritol.
- 40 10. Un método para producir una solución acuosa con un polipéptido que comprende una variante de la T7 ARN polimerasa (variante de T7), teniendo la variante de T7 las propiedades de (i) actividad de ARN polimerasa dependiente de ADN, y (ii) una composición distinta de aminoácidos en comparación con el polipéptido de 883 aminoácidos de la T7 ARN polimerasa de SEC ID N°: 2 (referencia de tipo silvestre), en la que está ausente la  
 45 formación de homomultímeros en la solución acuosa como un resultado de uno o más enlaces disulfuro intermoleculares, comprendiendo el método las etapas de:
- (a) proporcionar la variante de T7 sustituyendo la Cys723 en la referencia de tipo silvestre, numerada a partir del extremo N-terminal por Serina (Cys723 Ser);  
 50 (b) opcionalmente incluir además en la variante de T7 una o más sustitución(es) de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Cys125Ser, Cys347Ser, Cys492Ser, Cys515Ser y Cys839Ser;  
 (c) opcionalmente incluir además en la variante de T7 una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Val426Leu, Val426Ile, Val426Phe, Ser633Val, Ser633Met, Val650Leu, Thr654Leu,  
 55 Ala702Val y Val795Ile;  
 (d) retrotranscribir la secuencia de aminoácidos del polipéptido, comprendiendo el polipéptido la variante de T7 obtenida en las etapas (a), (b) y (c), obteniendo de ese modo una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido;  
 (e) expresar una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la etapa (d) en un sistema de expresión, y posteriormente purificar el polipéptido expresado a partir del sistema de expresión por  
 60 medio de una cromatografía usando una fase móvil acuosa en la que está ausente un agente reductor con un grupo tiol;
- obteniendo de ese modo una solución acuosa con el polipéptido que comprende la variante de T7.
- 65 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la solución acuosa obtenida en la etapa (e) se almacena en ausencia de un agente reductor con un grupo tiol.

12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, en el que una cantidad de aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  a 3  $\mu\text{g}$  de la proteína de la variante de T7 purificada de la solución acuosa está libre de un modo detectable de homomultímeros tal como se determina mediante electroforesis en SDS poliacrilamida y tinción del gel de electroforesis con el Kit Colorante Simply Blue Safe de Invitrogen.

5 13. Un método para sintetizar una molécula de ARN, que comprende las etapas de

(a) proporcionar una solución acuosa con un polipéptido de la variante de la T7 ARN polimerasa (variante de T7) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;

10 (b) proporcionar una molécula de ADN molde que comprende un promotor de T7, estando el promotor de T7 ligado funcionalmente a una secuencia de nucleótidos diana para su transcripción;

(c) poner en contacto en la solución acuosa el ADN molde de la etapa (b) con la variante de T7 de la etapa (a) en presencia de ribonucleósidos trifosfato, formando de ese modo una mezcla de reacción;

15 (d) incubar la mezcla de reacción en condiciones que permitan la actividad de la ARN polimerasa;

sintetizando de ese modo la molécula de ARN.

14. Una mezcla de reacción que comprende una solución acuosa con un polipéptido de la variante de la T7 ARN polimerasa (variante de T7) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la solución acuosa además comprende una molécula molde de ADN que comprende un promotor de T7 ligado funcionalmente a una secuencia de nucleótidos diana para la transcripción, y ribonucleósidos trifosfato.

20

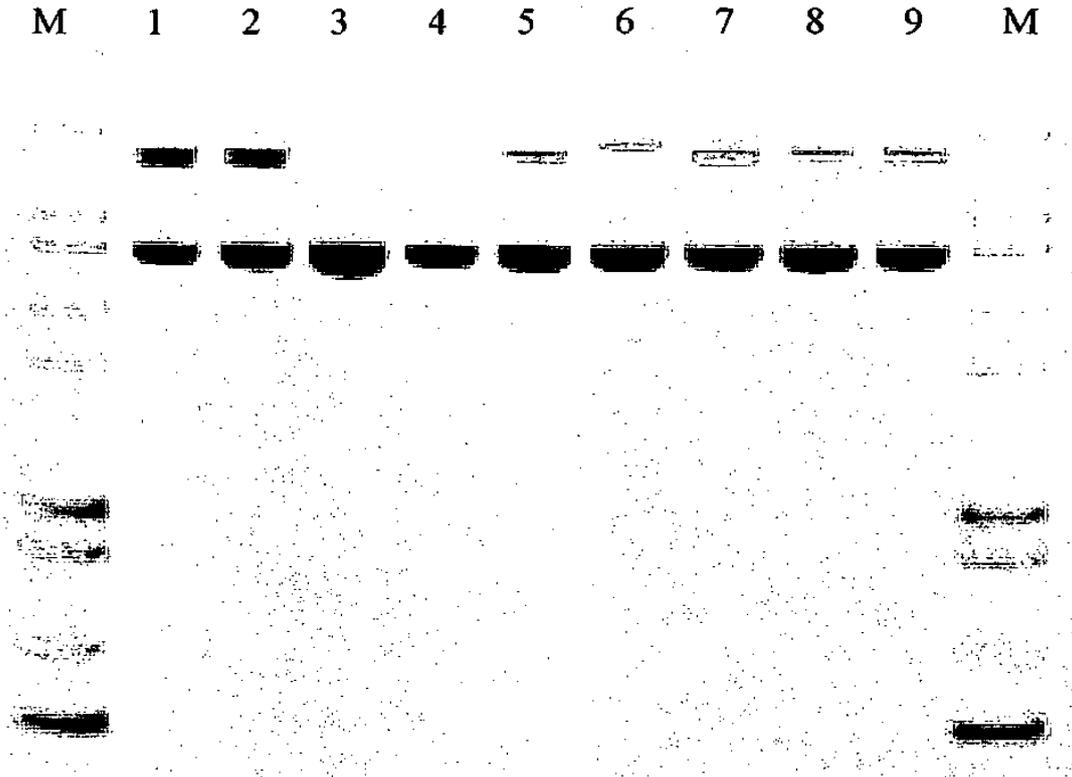
15. Un kit que comprende, en envases separados, una solución acuosa con una variante del polipéptido de la T7 ARN polimerasa (variante de T7) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un tampón con uno o más ribonucleósidos trifosfato.

25

**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**

